

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Biologie Moléculaire et Structurale, Biochimie

Par

Audrey LEJART

Caractérisation du rôle de la protéine Ten-eleven translocation1 (TET1) dans la dynamique de l'organisation de la chromatine

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 02 juillet 2021

Unité de recherche : Institut de Génétique et Développement de Rennes-UMR6290

Rapporteurs avant soutenance :

Dr. Emmanuelle Fabre Directrice de recherche, Université Paris-Diderot
Dr. Claire Francastel Directrice de recherche, Université de Paris

Composition du Jury :

Président :	Dr. Emmanuelle Fabre	Directrice de recherche, Université Paris-Diderot
Examineurs :	Dr. Claire Francastel Dr. Ignacio Izzedin	Directrice de recherche, Université de Paris Enseignant-chercheur, Université Paris Sciences et Lettres
Dir. de thèse :	Pr. Gilles Salbert	Professeur, Université de Rennes1
Co-dir. de thèse :	Dr. Sébastien Huet	Maître de conférence, Université de Rennes1

Remerciements

A mon fils, Gwen,

Ce projet n'aurait pu être réalisé convenablement sans la présence d'un environnement optimal. Tout au long de la réalisation de mon projet de thèse, j'ai été soutenue et encouragée que ce soit par mes collègues, ma famille ou mes amis. C'est dans cette section que je souhaite sincèrement les remercier.

A mes collègues,

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Gilles Salbert, de m'avoir permis d'effectuer mon stage de master 2 au sein de son équipe du côté de Beaulieu et d'avoir conservé la confiance qu'il avait envers moi et mon travail en me proposant d'effectuer mon projet de thèse. Si je devais retenir une phrase de Gilles ce serait : « On est large !! ».

Je remercie ensuite, Sébastien Huet, mon co-directeur de thèse, qui a été très présent tout au long de ma thèse. Si initialement, je devais être partagée sur les deux sites Beaulieu et Villejean pour la réalisation de mon projet, la science m'a contrainte à rediriger mon axe d'étude. Sébastien a su être présent dans mes doutes et dans mes peurs face à la réorientation de ma question biologique. Son implication, ses conseils et son soutien ont été une grande force dans la réalisation de ce projet et dans ma motivation. D'un point de vue scientifique, je remercie également Sébastien de m'avoir fait découvrir son monde de la microscopie.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler dans un environnement optimal et agréable ce qui a été principalement représenté par la cohésion dans l'équipe.

Ainsi, je remercie la sirène de notre équipe, Catherine Chapuis, sans qui la biologie moléculaire resterait encore un mystère pour moi. Catherine a grandement contribué à la réussite de ce projet et je lui en suis entièrement reconnaissante ! En plus de ses compétences exceptionnelles, Catherine a été une confidente et une amie avec qui il est possible de travailler aussi bien sa culture scientifique que sa culture musicale (spéciale dédicace à Jean-Jacques). Merci Catherine pour tous ces bons moments !

The 4th person I would like to thank is Rebecca Smith. She was all the time supportive and gave me lot of good advices. Arrived one year after me at the lab, I discovered that it is possible to be more talkative and loud than I am. Rebecca makes me improved my english « ahhh shhiiiiivveess !! » as I did for her with the french sometimes. She was always a source of happiness in our office shared with Catherine and I. More than a good friend, she is a talented researcher with multiple skills in biology and microscopy. Her determination and her involvement in science impressed me a lot and were a model for me all along my PhD. Thank you Rebecca for all your advices and help but also for all the funniest moments !

Je remercie l'intégralité de l'équipe SPARTE localisée sur le campus de Beaulieu et de Villejean. J'ai initialement rencontré les membres de l'équipe du côté de Beaulieu durant mon stage de Master 2 et j'ai énormément apprécié travailler avec eux. Du côté de Villejean, je remercie Eva Pinto, Siham, Ostiane, Nicolas et Marine pour tous les échanges et la bonne humeur qu'on a pu partager ensemble. Merci particulièrement à Siham Zentout et à Marine Jacquier notamment pour leur aide sur R studio, à Ostiane D'Augustin que j'ai grandement embêtée pour son aide sur la macro, et à Nicolas Bigot pour ses conseils avisés sur la mise en forme des résultats et ses remarques pertinentes. A tous, je vous souhaite une bonne continuation dans vos projets respectifs !

En dehors de mon équipe, je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger au cours de ma thèse notamment le groupe MicBioPhys qui comprend l'équipe de Marc Tramier et de Jacques Pécréaux. J'ai pu notamment partager de nombreuses choses avec Nina Soler, Seyta Ley-Ngardigal, Marc Tramier, Laurent Chesneau, Gilles Lemarchand et Begum Gokerkucuk. En dehors de ces équipes, je remercie également des collègues proches, Erwan Watrin, Flora Demouchy et « chef » alias Philippe Gouriou, pour leur soutien et les échanges incroyables qu'on a pu avoir.

Je remercie tout autant l'équipe de choc de la plateforme de microscopie confocale, Stéphanie Dutertre et Xavier Pinson que j'ai dû déranger maintes et maintes fois pour régler des problèmes techniques. Je remercie également les membres de la

plateforme de microscopie électronique, Agnès Burel et Aurélien Dupont pour leur collaboration dans ce projet.

Je remercie également ma petite fleur, Géraldine Le Provost, qui a été d'une grande aide dans le monde de l'administratif et qui m'a fait des lègues à multiples reprises de poissons. Merci pour tes rires incontrôlés surtout lors de deuils de mes poissons et de mes axolotls...

Je remercie le directeur du laboratoire, Reynald Gillet de m'avoir accueillie au sein de cet institut afin de réaliser mon projet de thèse. Les membres de l'IGDR ont été très accueillants et lors de mes présentations j'ai pu obtenir de nombreux retours constructifs. Je ne peux malheureusement pas citer toutes les personnes avec qui j'ai échangé, je remercie ainsi l'intégralité de l'institut.

Toutes les personnes présentes au sein de l'IGDR ont contribué d'une certaine manière à la réussite de ce projet. Je vous souhaite à tous une bonne continuation et de ne pas oublier cette passion qui nous anime tous !!!

Aux membres de mon comité de thèse,

Merci à Aurélien Sérandour, Rémy Pedoux et Judith Miné-Hattab d'avoir été présents à mes trois comités. Les discussions à la fois scientifiques et sur mon « après thèse » ont été très utiles et appréciables.

Aux membres de mon jury de thèse,

Je remercie également les membres de mon jury de thèse, Emmanuelle Fabre, Claire Francastel et Ignacio Izeddin d'avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse.

A mes amis,

Je remercie également mon entourage, qui a connu mes débuts dans la science et qui continue à suivre mon évolution dans ce domaine. Je remercie particulièrement mes amies, Marine Lemoine et Yaëlle Dubois que j'ai connues à l'université et qui me soutiennent depuis toujours. Malgré nos vies différentes et parfois compliquées, leur écoute et leur compréhension dans la réalisation de ma thèse m'ont été d'une grande aide.

Certaines étapes de ma thèse ont été difficiles et ça a été particulièrement le cas lors du confinement. Pendant cette période, certaines amitiés ont été renforcées. Je tiens à remercier spécifiquement Seyta et Siham qui m'ont grandement permis de garder ma motivation à travers de nombreux appels téléphoniques. Un grand merci à ma voisine Siham, avec laquelle de multiples péripéties nous sont arrivées. Merci Siham d'avoir rendu une période de ma vie rocambolesque. Pendant le confinement, j'ai également fait la connaissance de Quentin Coulon qui m'a soutenue dans l'écriture de ma thèse lors du confinement.

A ma famille,

Je remercie enfin ma famille, en particulier mes parents et ma sœur qui ont toujours cru en moi et en ma réussite. Que ce soit financièrement lors de mes 5 années universitaires ou moralement lors de la réalisation de mon projet de thèse, ma famille a toujours été présente et à mes côtés. Je remercie également mon compagnon Etienne Boulais et sa famille de m'avoir également soutenue. Etienne est apparu lors de ma dernière année de thèse. Il a su faire preuve de compréhension face au travail qu'une thèse implique et je lui en suis énormément reconnaissante.

Enfin, je dédie l'ensemble de mes 5 années d'études et de mes 4 ans de thèse à mon fils, Gwen Klépec. Le choix de poursuivre mes études dans le domaine scientifique a été l'objet de nombreux sacrifices notamment sur les temps de partage avec Gwen. Malgré cela, Gwen a su prendre son mal en patience et a accepté avec enthousiasme de découvrir ma passion pour la science.

Table des matières

Remerciements	1
Abréviations.....	12
Résumé	15
INTRODUCTION	18
I. Organisation de la chromatine.....	19
A. L'acide désoxyribonucléique (ADN).....	20
i. La structure des bases nucléiques	20
ii. La structure des nucléotides.....	20
iii. De la séquence nucléotidique à l'organisation 3D de l'ADN.....	21
iv. La forme hélicoïdale de l'ADN : petit et grand sillon.....	22
B. Le premier état de structuration de la chromatine dit « en collier de perles » 24	
i. L'unité de base de la chromatine : le nucléosome.....	24
ii. Les propriétés des histones.....	25
iii. Les interactions histones-histones	26
iv. Les interactions histones-ADN	27
C. La fibre chromatinienne de 10 à 30nm	28
i. La fibre solénoïde (« one-start organization »)	28
ii. La fibre en zig-zag.....	29
iii. La fibre chromatinienne <i>in vivo</i>	30
iv. La soupe de polymères	31

v.	Les facteurs impliqués dans la compaction de la fibre en collier de perles	31
D.	Les « Topologically-Associated Domains » et les « Lamina-Associated Domains.....	32
E.	Les compartiments subchromosomiques	35
F.	Les territoires chromosomiques.....	36
G.	La chromatine et la séparation de phase.....	38
H.	La dynamique de la chromatine.....	40
i.	La modulation de l'organisation de la fibre à l'échelle des histones via l'incorporation de variants d'histones.....	40
ii.	La modulation de l'organisation de la fibre à l'échelle des histones via la présence de modifications post-traductionnelles.....	43
iii.	Les acteurs protéiques modulant le positionnement des nucléosomes ...	46
iv.	La modulation de l'organisation de la chromatine à l'échelle des « Topologically-Associated Domains ».....	47
v.	La modulation de l'organisation de la chromatine à l'échelle des territoires chromosomiques	48
II.	Les marques épigénétiques	49
A.	Les modifications d'histones.....	49
i.	Les marques d'histone présentent dans les régions euchromatiniennes	49
ii.	Les marques d'histones présentent dans les régions hétérochromatiniennes	52
B.	Les marques épigénétiques de l'ADN	53
i.	Les caractéristiques biochimiques de la méthylation des cytosines	54

ii.	Effet de 5mC sur la structure de la molécule de l'ADN.....	57
iii.	Effet de la 5mC sur les nucléosomes.....	58
iv.	La localisation des cytosines méthylées : CpG versus CGi.....	59
v.	Les protéines de liaison « readers » de la 5mC	61
vi.	Les marques d'histones associées aux régions CGi.....	63
vii.	Les rôles biologiques de la 5mC	65
viii.	Les voies de déméthylation.....	69
III.	Les protéines Ten-eleven translocation	73
A.	La structure des protéines TET	74
B.	Les produits d'activité des TET.....	76
i.	La 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC)	76
ii.	La 5-formylcytosine (5fC)	80
iii.	La 5-carboxylcytosine (5caC).....	81
C.	Le rôle de TET1 dans la transcription.....	82
D.	Les isoformes de TET1	83
i.	Les caractéristiques des isoformes de TET1.....	83
ii.	Les fonctions de TET1-courte	85
	MATERIELS ET METHODES	87
I.	Biologie moléculaire : Création, amplification et purification des plasmides	88
A.	Création des plasmides	88
B.	Amplification des plasmides	89
i.	Transformation bactérienne.....	89

ii.	Purification des plasmides à partir des bactéries	90
iii.	Mesure de la concentration de plasmides purifiés	91
iv.	Vérification de la présence des mutations par séquençage	91
II.	Biologie cellulaire.....	92
A.	Culture cellulaire.....	92
i.	Décongélation des cellules.....	92
ii.	Maintien des lignées cellulaires et passage des cellules.....	92
iii.	Congélation des cellules	93
iv.	Transfection des cellules.....	93
v.	Le traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	94
B.	Marquage par immunofluorescence	94
i.	5hmC.....	94
ii.	Chaînes de PARylation	95
iii.	γH2AX, ARN polymérase II phosphorylée et H3K27me3.....	95
iv.	ARN néosynthétisés.....	96
III.	Microscopie.....	97
A.	Microscopie électronique.....	97
i.	Fixation des cellules et le marquage de l'ADN	97
ii.	Photo-oxydation.....	97
iii.	Déshydratation des échantillons	98
iv.	Inclusion des cellules en résine.....	98
v.	Coupe et imagerie	99

B.	Imagerie des cellules par microscopie confocale	99
C.	Analyse de la dynamique d'organisation de la chromatine au cours de l'expression de TET1	99
D.	Analyse de dynamique des protéines par retour de fluorescence (FRAP)	100
i.	Imagerie du retour de fluorescence après photoblanchiment.....	100
ii.	Analyse de la dynamique de retour de fluorescence	101
E.	Analyse de la diffusion de H1 par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)	102
	RESULTATS	103
I.	Analyse de l'effet des protéines TET sur l'organisation chromatinienne.....	106
A.	La surexpression de TET1 et de TET2 mais pas TET3 induit une réorganisation de la chromatine	106
B.	La surexpression de TET1 favorise la ségrégation de la chromatine du nucléoplasme.....	107
C.	La dynamique d'apparition du réarrangement chromatinien est dépendante du niveau d'expression de TET1.....	109
D.	Le réarrangement chromatinien n'est pas le résultat de l'activité catalytique de TET1	110
E.	La région N-terminale de TET1 est responsable de la restructuration de la chromatine	110
F.	L'expression du domaine N-terminal de TET1 altère la dynamique des histones H1 et H2B	115
G.	Le niveau de transcription se trouve diminué en présence du domaine NTER de TET1 et de la protéine TET1 longue	119
II.	Etude de la relation entre TET1 et la réparation de dommages dans l'ADN ...	123

A.	Analyse des niveaux de γ H2AX et de poly-ADP-ribosylation en présence de TET1	123
B.	Etude de l'implication du remodeleur ALC1 dans la réorganisation chromatinienne induite par la surexpression de TET1	128
C.	Etude des liens entre activité catalytique de TET1 et induction de la signalisation par PARylation	132
	DISCUSSION	137
I.	Relation entre le domaine N-terminal de TET1 et la dynamique d'organisation de la chromatine	138
A.	Le domaine N-terminal de TET1 semble participer à la condensation de la chromatine	138
B.	Comment le NTER pourrait-il affecter l'architecture de la chromatine ?	141
C.	Les potentielles fonctions du domaine N-terminal de TET1	146
II.	Relation entre TET1 et la réparation des dommages à l'ADN	147
A.	Lien entre les réarrangements chromatinien induit par le NTER et l'apparition de lésions	148
B.	Lien entre l'activité enzymatique de TET1 et la présence de dommages à l'ADN	149
III.	Les effets observés à l'échelle du noyau peuvent être le reflet d'événements se déroulant à l'échelle d'un locus	154
	Références	156

Abréviations

aa : acide aminé

AID : Activation induced deaminase

ANC : Compartiment nucléaire actif

APOBEC : Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide

ARNpol II : ARN polymérase II

BER : réparation par excision de base

ChIP : immunoprécipitation de la chromatine

CGi : îlot CpG

CpG : dinucléotide où une cytosine précède une guanine

CT : Territoire chromosomique

CTCF : CCCTC-binding factor

CT-IC : Territoire chromosomique-compartiment interchromatinien

CXXC : domaine en doigt de zinc

DNMT : DNA-méthyltransférase

ESC : cellule souche embryonnaire

FCS : spectroscopie de corrélation de fluorescence

FL : protéine longue TET1

FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching

FRET : Fluorescence resonance energy transfer

γ H2AX : forme phosphorylée de H2AX sur la sérine 139

GFP : green fluorescent protein

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HP1 : Heterochromatin protein 1

HDAC : histone déacétylase

ICN : réseau interchromatinien

INC : Compartiment nucléaire inactif

Kb : kilobase

LAD : Lamina-associated domain

LCR : région de contrôle du locus

LLPS : séparation de phase liquide-liquide

mESC : cellules souches embryonnaires de souris

NPC : cellules progénitrice neurales

NTER : domaine N-terminale de TET1

OGT : O-linked N-acetylglucosamine transferase

PARP1 : Poly(ADP-ribose) polymérase1

PAR/PARYlation : Poly-ADP ribosylation

pb: paire de bases

PFA : paraformaldéhyde

PGC : cellule germinale primordiale

PPPS : Séparation de phase polymère-polymère

PR : Région périchromatinienne

PRC1/PRC2 : complexe répresseur polycomb

PTM : modification post-traductionnelle

TAD : Topologically-associated domain

TDG : Thymine-DNA glycosylase

TET : Ten-eleven translocation

TET1-court (=CTER) : isoforme courte de TET1

TET1-long (=FL) : isoforme longue de TET1

TF : facteur de transcription

TSS : site d'initiation de la transcription

5mC : 5-méthylcytosine

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

5fC : 5-formylcytosine

5CaC : 5-carboxycytosine

5meCpG : cytosine méthylée précédant une guanine

Résumé

La chromatine, composée d'ADN et de protéines appelées histones, est une structure multi-échelle hautement dynamique et finement organisée. Son état de compaction est en partie régulé par des modifications épigénétiques trouvées sur la queue des histones mais aussi sur l'ADN. L'une des bases de l'ADN la plus étudiée est la 5-méthylcytosine (5mC). La méthylation de la cytosine au sein d'îlots CpG localisés dans les promoteurs des gènes, induit une répression de la transcription. La 5mC peut être oxydée par les enzymes Ten-eleven translocation (TET). Ces dioxygénases sont composées d'un domaine N-terminal (NTER), dont la fonction reste mal définie, et d'une région C-terminale responsable de l'activité catalytique. Cette dernière consiste en l'oxydation successive de la 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), en 5-formylcytosine (5fC) puis en 5-carboxycytosine (5caC). Alors que les deux derniers dérivés oxydés de la 5mC, la 5fC et la 5CaC, sont rapidement excisés de l'ADN pour être remplacés par une cytosine non modifiée, la 5hmC apparaît quant à elle plus stable au sein des cellules. L'augmentation du niveau de 5hmC au niveau de régions régulatrices de gènes est associée à l'activation de la transcription et un état « ouvert » de la chromatine. Récemment, il a été démontré qu'une isoforme de TET1 tronquée en partie N-terminale (TET1-courte) est sur-exprimée dans le cancer du sein et du poumon au détriment de la protéine TET1 longue (TET1-longue). Bien que l'activité catalytique de ces deux isoformes soit préservées, il apparaît clairement que les cibles de déméthylation sont différentes entre TET1-longue et TET1-courte, suggérant que la partie N-terminale participe à la régulation de l'activité de TET1. Outre cet impact positif sur la transcription via l'oxydation de la 5mC, TET semble aussi pouvoir inhiber ce processus via le recrutement sur la chromatine de facteurs favorisant un état condensé de la chromatine. Il nous reste cependant à comprendre comment ces deux fonctions opposées des TETs sur la transcription et la structure chromatinienne sont régulées. Dans le cadre de mes travaux de thèse, je me suis tout d'abord intéressée aux fonctions potentielles du domaine N-terminal de TET1 du point de vue à la fois de la régulation de la structure chromatinienne et du contrôle de la transcription. Par ailleurs, j'ai aussi cherché à mieux comprendre les liens entre activité d'oxydation de la 5mC par les enzymes TET et la réparation de l'ADN.

Mes résultats montrent que l'expression ectopique de l'isoforme TET1-longue se traduit par une réorganisation globale de la chromatine. Les images en microscopie confocale montrent qu'en présence de TET1, la chromatine apparaît concentrée au sein de domaines denses entourées de régions largement dépourvues de chromatine au lieu d'être dispersée de manière homogène au sein du noyau. Ce phénomène de « séparation de phase » entre la chromatine et le reste du nucléoplasme a pu être confirmé par des observations en microscopie électronique. J'ai pu montrer que le phénomène de réorganisation chromatinienne était indépendant de l'activité catalytique de TET1 ainsi que de son adressage aux îlots CpG via le domaine CXXC. Mes résultats montrent que c'est le domaine N-terminal de TET1, qui est absent de l'isoforme TET1-courte, qui induit le remodelage chromatinien. En lien avec cette activité de remodelage, j'ai pu mettre en évidence une interaction forte entre ce domaine et la chromatine. L'expression altère non seulement la répartition de la chromatine au sein du noyau mais modifie également la dynamique de ses composants protéiques. Ainsi l'histone de cœur H2B voit sa dynamique d'échange ralentie en présence du domaine N-terminal de TET1 comparé aux cellules contrôle alors que c'est l'inverse pour l'histone de liaison H1. Je me suis aussi intéressée à l'impact physiologique de cette réorganisation chromatinienne induite par le domaine N-terminal de TET1. J'ai ainsi pu montrer que cette réorganisation est associée à une diminution globale de l'activité transcriptionnelle ainsi qu'à une élévation des niveaux de la marque épigénétique H3K27me3, caractéristique de l'hétérochromatine facultative.

En parallèle de cet impact de TET1 sur l'architecture chromatinienne, j'ai aussi analysé l'activation des processus de réparation de l'ADN en lien avec l'activité d'oxydation des 5mC induite par TET1. J'ai pu constater que l'apparition de dérivés oxydés, 5hmC, 5fC et 5caC, résultant de l'activité enzymatique de TET1 induit une augmentation des dommages à l'ADN mise en évidence par une élévation du taux de γ H2AX et de la signalisation par poly-ADP-ribosylation (PARylation). Ces deux types de marques signalent la lésion et initient le processus de réparation par le recrutement de protéines effectrices. Mes résultats montrent que l'augmentation de la signalisation par PARylation en réponse à l'action de déméthylation de TET1 est médiée par l'activité catalytique de PARP1 et que la présence des chaînes de PAR

permet le recrutement du remodeleur de la chromatine ALC1, un des effecteurs de la PARylation. Ces résultats suggèrent qu'à la suite de l'excision des formes 5fC et 5caC par la thymine DNA glycosylase (TDG), la signalisation par PARylation pourrait contribuer à la restauration de l'intégrité génomique.

Au cours de ce projet, j'ai ainsi pu mettre en évidence une nouvelle fonction du domaine N-terminal de TET1 dans la réorganisation de la chromatine, processus ayant une influence sur l'activité transcriptionnelle. Ces résultats nous permettent de mieux comprendre l'origine de l'impact différencié des deux isoformes de TET1, qui se distinguent par la présence ou non du domaine N-terminal, sur la physiologie cellulaire. J'ai aussi mis en évidence que la déméthylation des cytosines induites par TET1 était associée à une activation de la signalisation par PARylation, les liens entre ces deux processus restant encore à explorer plus en détails.

INTRODUCTION

L'ADN contient les instructions de fonctionnement de la cellule dont la dynamique de lecture se doit d'être finement régulée. Si certaines parties sont mal interprétées/lues cela peut aboutir à une altération d'un ou de plusieurs processus cellulaires. Ainsi au-delà de l'importance de la séquence nucléotidique, la caractérisation des mécanismes de régulation de l'expression des séquences géniques est essentielle à la compréhension de processus biologiques et de leurs dérèglements. Un des mécanismes participant à la régulation de la lecture de l'ADN consiste à apporter ou enlever des modifications pouvant se trouver sur l'ADN lui-même, comme la méthylation des cytosines. Ce projet de thèse se focalise sur le rôle des protéines Ten-eleven translocation (TET), qui régulent la durée de vie de la 5-méthylcytosine, dans l'organisation de la chromatine.

I. Organisation de la chromatine

La chromatine, composée d'ADN et d'histones, représente l'unité d'organisation et de régulation de l'information génétique. La séquence nucléotidique entièrement déroulée peut mesurer jusqu'à 2 mètres et est donc environ 100 000 fois plus grande que la taille d'un noyau qui est de l'ordre d'une dizaine de micromètres. L'ADN, au sein du noyau apparaît donc compacté et enroulé autour de protéines histones qui, ensemble, forment la chromatine. La chromatine est une structure multi-échelle complexe et dont le degré d'organisation est finement régulé. Les caractéristiques des composants de la chromatine ainsi que les différents niveaux de son organisation allant du premier état de structuration en collier de perles, à celui du territoire chromosomique, en passant par la formation de structures plus complexes et de boucles, seront abordés ci-après (Illustration 1).

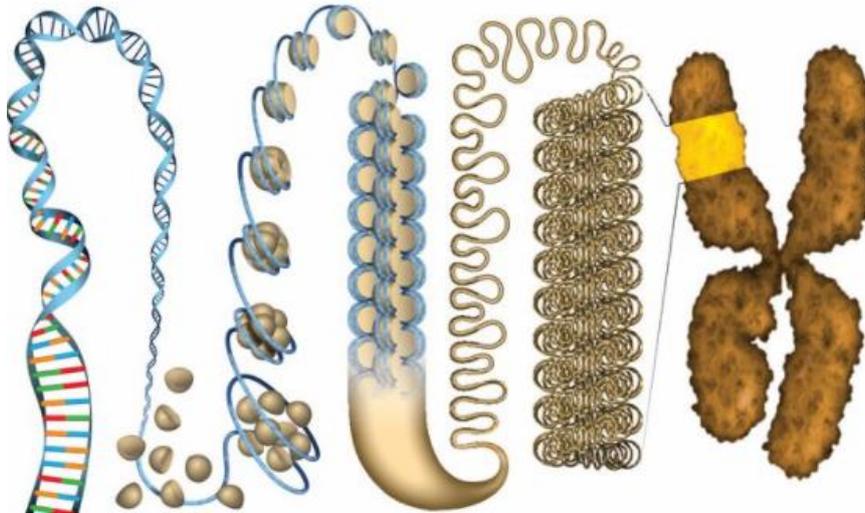


Illustration 1. Les différents niveaux d'organisation de la chromatine. De gauche à droite : la molécule d'ADN s'enroulant autour de protéines histones formant la fibre chromatinienne. Celle-ci peut être organisée selon l'échelle d'intérêt, sous forme de collier de perle, ou avec un diamètre de 30nm, formant des boucles trouvées au sein d'un chromosome. Image issue de (Ou et al. 2017).

A. L'acide désoxyribonucléique (ADN)

i. La structure des bases nucléiques

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique. Il est constitué d'une séquence de bases nucléiques puriques qui sont l'adénine et la guanine, et pyrimidiques qui sont la cytosine et la thymine. Les pyrimidines sont des composés aromatiques hétérocycliques comportant un cycle constitué d'atomes de carbone et d'azote tandis que les purines contiennent quant à elles deux cycles à atomes de carbone et d'azote (Illustration 2).

ii. La structure des nucléotides

Ces bases azotées sont associées de manière covalente à un 2'-désoxyribose au niveau du carbone 1' de ce dernier, formant ainsi des nucléosides. Ceux-ci sont liés entre eux via une liaison phosphodiester 3'-5' établie entre les désoxyriboses de deux nucléosides successifs. La présence de groupements phosphates entre chaque base purique et/ou pyrimidique confère une charge globale négative à la molécule

d'ADN. La base azotée associée à l'ose et aux groupements phosphates constituent le nucléotide (Illustration 2).

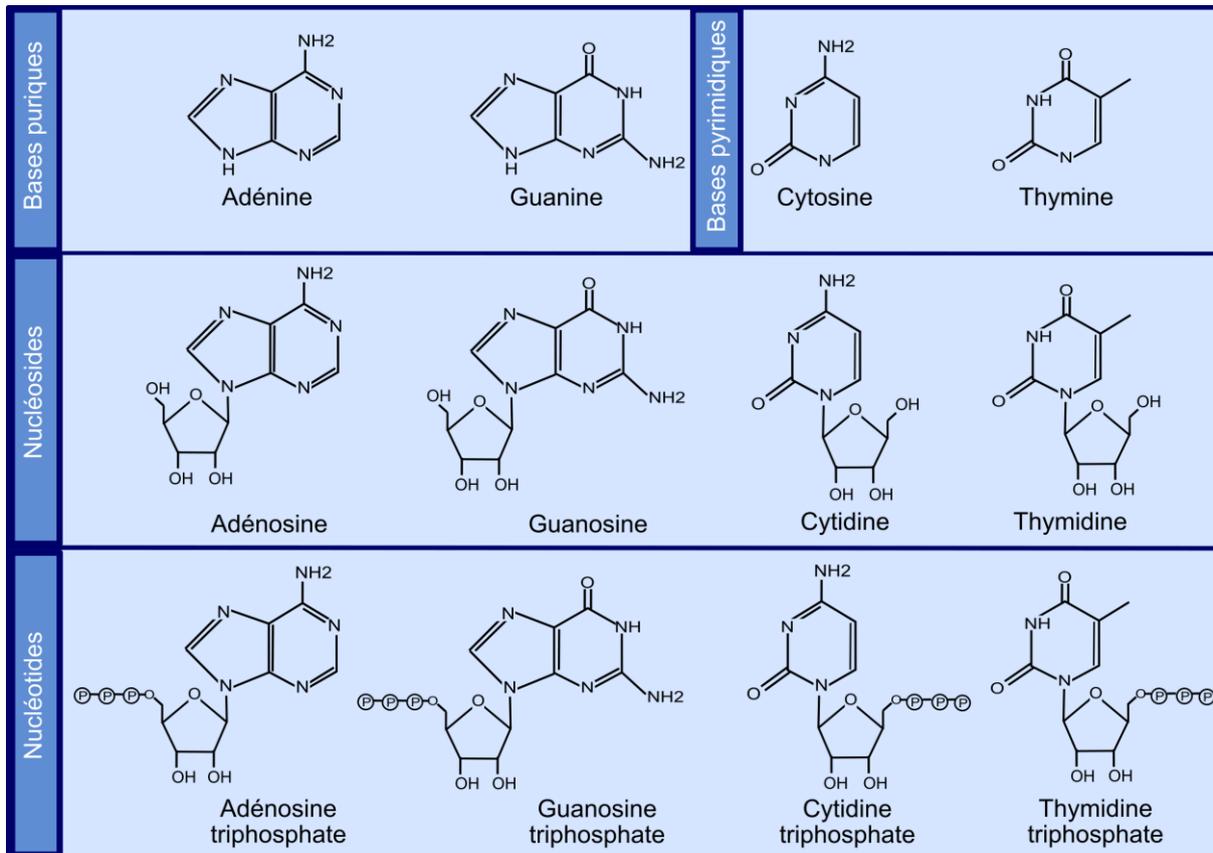


Illustration 2. Représentation des bases azotées puriques et pyrimidiques, des nucléosides et des nucléotides.

La succession des nucléotides dans le génome constitue une signature propre à chaque individu. La transcription de ce code génétique en ARNm puis sa traduction en protéines permet de produire les briques de base nécessaires à la vie. Initié en 1990, un projet de collaboration internationale « le Projet Génome Humain » a abouti au séquençage intégral des 46 chromosomes humains en avril 2003. La généralisation du séquençage du génome permet notamment l'identification de variants pouvant être à l'origine de différentes maladies.

iii. De la séquence nucléotidique à l'organisation 3D de l'ADN

L'ADN est composé de deux brins polynucléotidiques liés entre eux via des liaisons hydrogènes établies entre les cytosines et les guanines, et entre les adénines et les

thymines. Dans des conditions physiologiques et en l'absence de contraintes mécaniques, l'appariement entre les deux brins de l'ADN génère une structure en double-hélice proposée par Watson et Crick en 1953 (Watson et Crick 1953) suite notamment aux travaux de cristallographie aux rayons X menés par Rosalind Franklin. Cette technique est basée sur la diffraction d'un rayonnement X incident lors de sa rencontre avec des atomes. Ainsi, les figures de diffraction obtenue pour l'ADN présentent une forme de croix caractéristique d'échantillons hélicoïdaux. D'autres techniques complémentaires comme la microscopie électronique ont permis de compléter cette caractérisation de la structure en double hélice de l'ADN. La structure majoritaire de l'ADN au sein des cellules est l'hélice de type B. L'ADN de type B est formé d'une hélice droite avec environ 10 paires de bases par tour (34 Å) et d'un diamètre de 20 Å (Harteis et Schneider 2014; Marini, Falqui, et Di Fabrizio 2016; Wing et al. 1980). Il existe également des formes alternatives à l'ADN de type B qui sont l'ADN A et l'ADN Z. L'ADN de type A est formé d'une hélice droite tout comme l'ADN de type B. L'hélice de type A diffère de celle de type B par le nombre de paires de bases par tour qui est de 11 à 12 et d'un diamètre de 23 Å. La conformation en hélice A de la molécule d'ADN peut être le résultat de la liaison de protéines ou de la séquence nucléotidique. L'ADN de type Z est constitué d'une hélice gauche, contrairement au type A et B, avec 12 paires de bases par tour et un diamètre de 18 Å. Cette structuration en zigzag de l'ADN est observable en présence de haute concentrations salines. Énergétiquement, l'ADN de type B est favorisé au détriment de la conformation en Z (A. H. Wang et al. 1979).

iv. La forme hélicoïdale de l'ADN : petit et grand sillon

En analysant la structure tri-dimensionnelle de la molécule d'ADN, il est possible de distinguer un grand (d'environ 12 Å de largeur) et un petit sillon (d'environ 8 Å de largeur) (Neidle 2001). Les sillons sont formés à partir de la géométrie induite par l'association de deux bases complémentaires des deux brins d'ADN. En vue longitudinale, l'appariement de deux bases complémentaires, se fait de manière perpendiculaire à l'axe de l'hélice formé. En analysant l'association de deux bases en vue de dessus, il est possible de distinguer la présence de deux angles situés de part et d'autre des liaisons glycosidiques des deux bases : un grand angle au niveau

de la partie supérieure des bases appariées et un angle moins important au niveau de la partie inférieure des bases associées. Le fait que les liaisons glycosidiques de deux bases appariées soient en face l'une de l'autre, crée une asymétrie d'exposition de la partie du dessus et du dessous des bases au sein de l'hélice. Le grand angle exposant la partie supérieure des bases associées correspond au grand sillon. À l'inverse le plus petit angle qui expose la partie inférieure des bases représente le petit sillon (Illustration 3).

Au niveau du grand sillon, les groupements physico-chimiques exposés dans le cas d'un appariement A-T entre l'adénine et la thymine forment une séquence ou « code » spécifique de type ADAM (ou MADA pour la paire T-A) qui correspond à la présence d'un atome d'azote accepteur (A) d'hydrogène en position 7 de l'adénine, à la liaison hydrogène entre le groupement amino-exocyclique sur le carbone 6 de l'adénine (donneur (D)) et le groupe carbonyle C4 de la thymine (accepteur (A)) et enfin au groupement méthyle (M) sur le carbone 5 de la thymine qui confère une surface hydrophobe (Illustration 3). Pour l'appariement G-C de la guanine et la cytosine, ce code est de type AADH (ou HDAA pour la paire C-G) pour accepteur-accepteur-donneur-hydrogène au niveau du grand sillon (Alberts et al. 2002). Suivant la même logique, les groupements physico-chimiques exposés du côté du petit sillon suivent le code AHA pour les paires T-A ou A-T et le code ADA pour les paires C-G ou G-C. Ainsi, contrairement au grand sillon, les groupements exposés au niveau du petit sillon possèdent une séquence symétrique (AHA ou ADA) qui ne permet pas de distinguer les deux bases nucléotidiques. Les protéines qui se lient de manière dépendante de la séquence nucléotidique seront donc retrouvées enrichies au sein du grand sillon (Alberts et al. 2002).

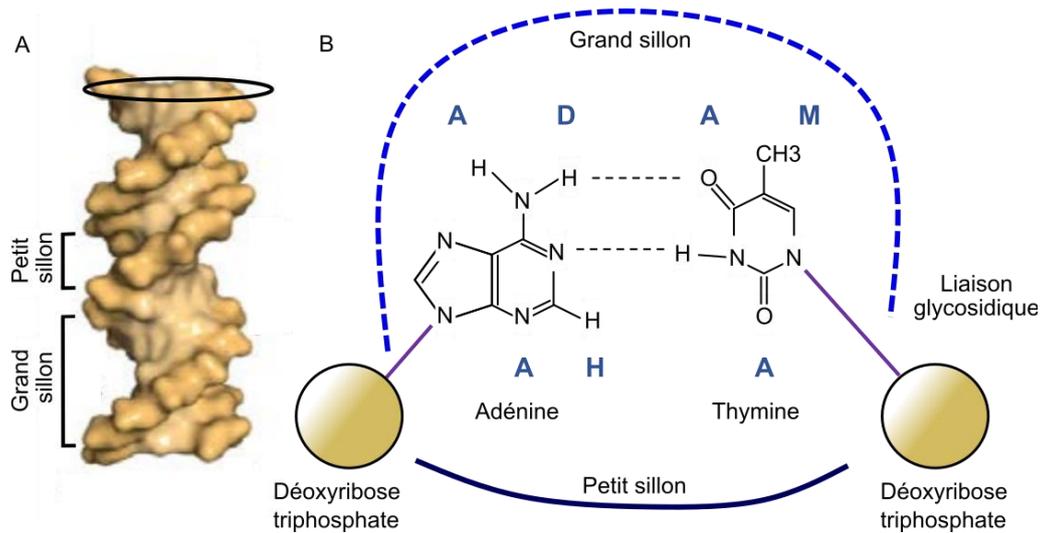


Illustration 3. Représentation du petit et du grand sillon de l'ADN B. A) vue longitudinale de la molécule d'ADN (Harteis et Schneider 2014). B) Schéma en vue du dessus d'un appariement d'une adénine et d'une thymine. Le grand sillon correspond à la face supérieure des bases azotées exposées, tandis que le petit sillon représente la face inférieure des bases appariées.

Ainsi, l'information génétique s'organise en hélice droite constituée de grands et de petits sillons. Seulement, au sein du noyau, la double hélice de l'ADN ne se trouve pas sous une forme libre. La longue molécule d'ADN est associée à des protéines qui modulent son état de compaction.

B. Le premier état de structuration de la chromatine dit « en collier de perles »

i. L'unité de base de la chromatine : le nucléosome

Au sein du noyau, les deux mètres d'information génétique sont associés à des protéines spécifiques appelées histones. Albrecht Kossel a découvert ces protéines en 1884 en les isolant à partir de noyaux d'érythrocytes (Detlef Doenecke, Peter Karlson 1984). On distingue les histones de cœur qui sont H2A, H2B, H3, H4 et l'histone de liaison H1. L'association de deux copies de chaque histone de cœur compose une structure octamérique autour de laquelle s'enroule une séquence d'ADN d'environ 147 paires de bases, formant ainsi un nucléosome. L'histone de

liaison H1 vient quant à lui se positionner au niveau du site d'entrée/sortie de l'ADN sur le nucléosome.

ii. Les propriétés des histones

Globalement, les histones de cœur sont constituées de deux domaines principaux : une longue queue flexible en N-terminal composée majoritairement d'acides aminés basiques et qui constitue le substrat de nombreuses modifications post-traductionnelles, et une région globulaire centrale de type « histone-fold ». Les histones H2A et H2B possèdent par ailleurs un domaine supplémentaire partiellement structuré au niveau de l'extrémité C-terminale et l'histone H3 présente en plus une hélice appelée αN en région N-terminale qui semble être impliquée dans la stabilisation du nucléosome (Ferreira et al. 2007). Le domaine histone-fold est structurellement conservé et est constitué de 3 hélices alpha reliées par 2 boucles formant ainsi la succession suivante : $\alpha 1$ -L1- $\alpha 2$ -L2- $\alpha 3$ (Luger 1997). Cette région est impliquée dans l'interaction des histones avec l'ADN mais permet également l'association des histones entre-elles. Au sein du nucléosome (Illustration 4), les histones H3 et H4 s'organisent sous forme d'hétérotétramère flanqué par deux dimères d'histones H2A et H2B (Luger 1997).

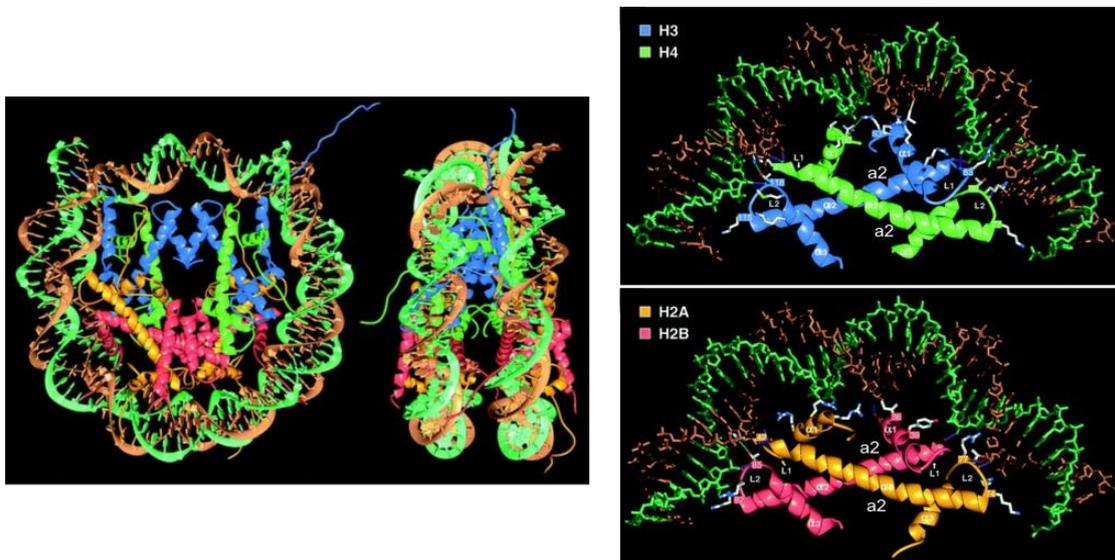


Illustration 4. Organisation des histones de cœur, H2A (jaune), H2B (rouge), H3 (bleu), H4 (vert) au sein du nucléosome à gauche. A droite, représentation des interactions médianes par l'association des deux hélices alpha 2 « a2 » entre un monomère de H3 et de H4 (en haut) et de H2A et H2B (en bas) (Luger 1997).

Cet agencement spécifique des histones au sein du nucléosome est médié par un certain nombre d'interactions entre celles-ci.

iii. Les interactions histones-histones

Comme évoqué précédemment, la formation de l'octamère d'histone se fait via l'association de dimères entre-eux. L'assemblage des monomères en dimères est médié par la présence d'interactions principalement via le domaine « histone-fold ». Plus précisément, les deux histones H3 et H4 s'associent entre elles via des interactions dites en poignées de main entre leur deux hélices alpha2 tout comme H2A et H2B (Illustration 4). Les histones H3 et H4 ne se trouvent pas seulement sous leur forme dimérique au sein du nucléosome (Illustration 4). En effet, les deux dimères de (H3-H4) se trouvent associés formant ainsi un tétramère. La formation du tétramère de H3-H4 est réalisée par la présence d'interactions au niveau des hélices alpha 2 et alpha3 de H3' et H3, formant un groupe en quatre hélices alpha entre les deux dimères (H3-H4) et (H3'-H4'). Cette association est favorisée par des interactions hydrophobes et des interactions impliquant l'acide aspartique 123 (D123) de H3 (H3-D123) et l'histidine 113 de H3' (H3'-H113) avec l'autre copie de H3. La combinaison de ces liaisons entre H3 et H3' des dimères (H3-H4) et (H3'-H4') participe à la création du cœur de l'octamère.

Au sein du nucléosome, les deux hétérodimères (H2A-H2B) interagissent avec l'hétérotétramère (H3-H4) comme suit : (H2A'-H2B')-(H4'-H3')-(H3-H4)-(H2B-H2A) (Luger 1997). L'association des deux dimères (H2A-H2B) de part et d'autre de l'hétérotétramère (H4'-H3'-H3-H4) est médiée par la structuration en groupement de quatre hélices alpha entre les hélices alpha2 et alpha3 de H2B et de H4 et stabilisée par une interaction hydrogène entre l'histidine de H4 (H4-H75) et l'acide glutamique de H2B (H2B-E90) (Luger 1997). Enfin, les deux histones H2A présents au sein de l'octamère interagissent entre eux via leur boucle L1 (Chakravarthy et Luger 2006), participant également à la stabilisation du nucléosome.

L'association des histones au sein de l'octamère d'histone est ainsi maintenue grâce à des interactions entre les dimères impliquant des liaisons hydrogènes mais aussi

au travers de liaisons impliquant des ions phosphates et chlorure et des molécules d'eau (Chantalat et al. 2003).

iv. Les interactions histones-ADN

S'il existe des interactions entre les histones afin de maintenir la structure de l'octamère, il existe également des associations spécifiques entre les histones et l'ADN.

Tout comme les interactions entre histones, les liaisons Histone-ADN sont principalement réalisées via le domaine « histone-fold ». Ces protéines interagissent via les acides aminés basiques arginine et lysine avec le squelette de l'ADN. Plus précisément, sur la chaîne latérale de l'arginine se trouve un groupement guanidinium avec lequel est établi un pont salin avec le groupement phosphate de l'ADN. Ce type d'association implique une combinaison d'interactions. D'une part, il se crée une attraction électrostatique entre le guanidinium chargé positivement et le phosphate chargé négativement. D'autre part, des liaisons hydrogènes associent les deux atomes d'azote situés sur le groupement guanidinium et les deux atomes d'oxygènes localisés sur le groupe phosphate du squelette d'ADN (Yusufaly et al. 2014).

En cristallographie, il est difficile de démontrer des interactions entre la partie N-terminale des histones et la molécule d'ADN. En effet, cette région est déstructurée et est donc difficilement cristallisable. Il apparaît cependant, par une étude d'interaction, que les extrémités N-terminales des histones pourraient interagir également avec l'ADN et en particulier avec l'ADN de liaison situé entre deux nucléosomes (Angelov et al. 2001).

Même si les bases de l'ADN n'interagissent pas directement avec les histones, la séquence de l'ADN peut néanmoins influencer le positionnement du nucléosome le long de la séquence génomique. Ainsi, une périodicité d'environ 10 bp de dinucléotides tels que AA, TT en alternance avec des GC semble favoriser la stabilité des nucléosomes (Guan, Zhou, et Yan 2012; Zhou et Yan 2010). Cet effet est vraisemblablement lié au fait que l'ADN, qui doit être courbé pour s'enrouler autour du cœur d'histone, établit une conformation optimale (sillon mineur élargi côté

solvant et sillon mineur rétréci côté histones) avec une telle périodicité des dinucléotides.

C. La fibre chromatinienne de 10 à 30nm

La structure en collier de perles où il est possible de distinguer les nucléosomes individuels reliés entre eux par un filament d'ADN (ADN de liaison), représente le premier état d'organisation de la chromatine. A une échelle supérieure à cette organisation, des études menées *in vitro* et *in vivo* révèlent que la chromatine peut avoir un diamètre plus élevé que celle de la structure en collier de perles de 10nm. Il a ainsi été décrit que les nucléosomes peuvent se regrouper pour former des structures chromatiniennes plus denses.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'observation *in vitro* d'une fibre de 30 nm : une formation en solénoïde et une structure en zig-zag (wu, Bassett, et Travers 2008).

i. La fibre solénoïde (« one-start organization »)

Selon le modèle solénoïde classique, les nucléosomes apparaissent organisés entre eux de manière parallèle en suivant une forme d'hélice linéaire. Ainsi, le nucléosome N1 se trouve près du nucléosome N2 qui est proche du nucléosome N3 etc, en suivant le même axe qui définit le centre de l'hélice chromatinienne et environ 6 à 8 nucléosomes par tour (Finch et Klug 1976; P. J. J. Robinson et al. 2006) Il existe un modèle alternatif au modèle précédemment décrit qui est le modèle « interdigitated solenoid ». D'après celui-ci, les nucléosomes du tour supérieur peuvent interpénétrer entre les nucléosomes localisés en dessous (comme présenté dans l'illustration 5. A). Autrement dit, la succession de nucléosomes N6-N7-N8-N9 se retrouve au sein des espaces entre les nucléosomes respectifs (N1-N2), (N2-N3), (N3-N4) et (N4-N5) (P. J. Robinson et Rhodes 2006). Les caractéristiques de l'organisation de la fibre chromatinienne en solénoïde sont : l'invariabilité du diamètre de la fibre vis-à-vis de la longueur de l'ADN liant les nucléosomes entre eux ainsi qu'une forte courbure de l'ADN de liaison.

Cependant, plusieurs études *in vitro* suggèrent que la fibre de 30nm peut adopter une autre conformation dite en zig-zag ou en « hélice à deux départs ».

ii. La fibre en zig-zag

Dans le modèle en zig-zag, la fibre chromatinienne serait organisée à partir de deux rangées de nucléosomes qui s'enroulent telles la double hélice d'ADN. D'après ce modèle, l'association des nucléosomes est alternée. Plus précisément, le nucléosome N1 se trouve face à N2, N3 se positionne près de N1 et fait face à N4, N5 sera en face de N4 et près de N3 etc.... Ainsi le positionnement des nucléosomes deux par deux et de manière décalée forme des zigzags de nucléosomes autour d'un axe (Illustration 5. B). Les caractéristiques de ce modèle sont différentes de celui du modèle solénoïde. En effet, le diamètre de la fibre chromatinienne est dépendant de la longueur de l'ADN de liaison et cet ADN n'apparaît pas fortement courbé dans ce contexte. Une différence majeure entre le modèle solénoïde et en zigzag réside dans la localisation de l'ADN liant les nucléosomes entre eux. En effet, dans le modèle zigzag, l'ADN liant les nucléosomes traverse le centre de la fibre chromatinienne ce qui n'est pas le cas dans le modèle solénoïde (Dorigo et al. 2004; Schalch et al. 2005).

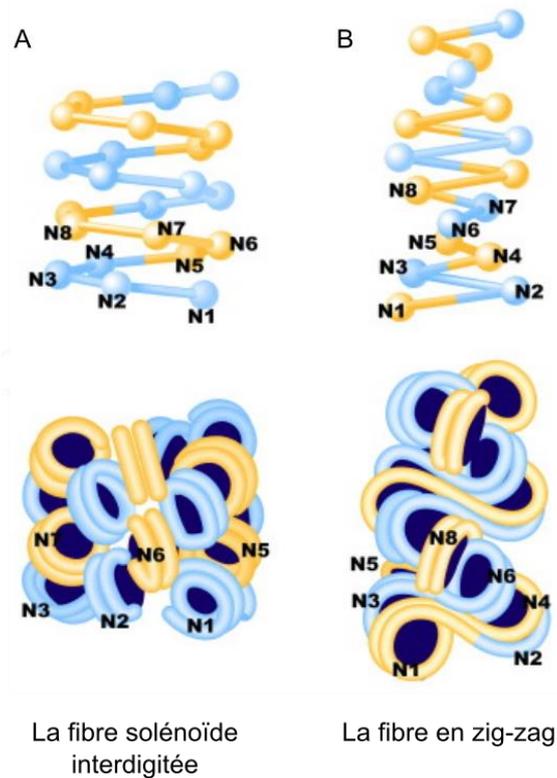


Illustration 5. Représentation des deux modèles d'organisation de la fibre chromatinienne de 30nm : A) la fibre solénoïde interdigitée et B) la fibre en zigzag (Maeshima, Ide, et Babokhov 2019).

iii. La fibre chromatinienne *in vivo*

Au sein de la cellule, la fibre chromatinienne est hétérogène et ne semble pas organisée en fibre de 30nm.

Par SAXS (small angle xray scattering), il a été possible de constater la présence de fibres ayant un diamètre de 6 et 11 nm (Nishino et al. 2012). Récemment, il a également été décrit par Ou et al que l'organisation de la chromatine issue de cellules HeLa ou U2OS pouvait varier de 8 à 24nm de diamètre par imagerie en microscopie électronique (Ou et al. 2017). La chromatine n'est donc pas organisée de manière uniforme au sein même du noyau. Selon les processus cellulaires engagés le niveau d'accumulation des nucléosomes varie. Les nucléosomes peuvent s'agréger entre eux formant des « clutches » qui sont des groupes hétérogènes d'accumulation de nucléosomes. La présence de larges et denses regroupements de

nucléosomes est associée à un enrichissement d'histones H1 et la formation de région d'hétérochromatine, un statut chromatinien réfractaire à la transcription (Ricci et al. 2015).

iv. La soupe de polymères

La divergence entre les observations *in vivo* et *in vitro* pourrait résulter d'une différence de densité en matériel soumis aux expérimentations. Ainsi, il est supposé que la faible concentration en nucléosomes dans les systèmes *in-vitro* faciliterait les interactions intra-fibre tandis qu'une forte concentration de nucléosomes favoriserait quant à elle, une association inter-fibres (Maeshima, Ide, et Babokhov 2019). Du fait de l'augmentation de la présence de fibres nucléosomales proches les unes des autres, les interactions inter-fibres deviendraient le système d'association préférentiel au détriment des interactions intra-fibres, menant à la formation « d'une soupe de polymères ». Ces données suggèrent que les nucléosomes ont la capacité de s'associer les uns aux autres de manière organisée, que ce soit au sein d'une même fibre nucléosomale ou entre fibres chromatiniennes voisines.

v. Les facteurs impliqués dans la compaction de la fibre en collier de perles

L'histone de liaison H1, qui se trouve aux bornes d'entrée et de sortie du nucléosome, est constituée d'une région globulaire encadrée par deux domaines non structurés en partie N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter). Les deux régions N-ter et C-ter sont capable d'interagir, soit séparément soit en même temps, avec l'ADN reliant deux nucléosomes (Syed et al. 2010). Au-delà de son rôle dans la stabilisation des nucléosomes (Pennings, Meersseman, et Bradbury 1994), H1 est également impliqué dans l'organisation en fibre avec un diamètre plus important *in vitro*. La formation d'une fibre de 30nm de diamètre peut être induite par augmentation de la concentration ionique mais uniquement en présence de H1. L'histone de liaison H1 est donc nécessaire à la formation de la fibre de 30nm *in vitro* (Hizume, Yoshimura, et Takeyasu 2005; Thoma, Koller, et Klug 1979). De plus, l'état de condensation de cette fibre est dépendante de la quantité de H1 présente en solution (Hizume, Yoshimura, et Takeyasu 2005).

Par ailleurs, il a en plus été décrit dans la littérature qu'une interaction internucléosomale peut se faire via un contact entre la lysine 16 située sur la queue de l'histone 4 (H4K16) et le domaine acide (constitué de 7 acides aminés acides) du dimère H2A-H2B du nucléosome voisin (P. J. J. Robinson et al. 2008; R. Zhang, Erler, et Langowski 2017). L'ajout d'un groupement acétyl, qui constitue une modification post-traductionnelle, sur H4K16, modifie les interactions électrostatiques entre H4K16 et le domaine acide du dimère (H2A-H2B), empêchant l'association entre les deux nucléosomes voisins (P. J. J. Robinson et al. 2008).

Ainsi, à une échelle supérieure de la structure en collier de perles, les nucléosomes peuvent se trouver plus ou moins associés entre-eux via la présence ou l'absence de modifications post-traductionnelles sur la queue des histones.

D. Les « Topologically-Associated Domains » et les « Lamina-Associated Domains

Dans les années 70, des recherches centrées sur l'architecture de la chromatine mitotique ont démontrées la présence de boucles de fibres de chromatine mesurant de 30 à 90 kilobase (Kb) après extraction des protéines incluant les histones, et formant un halo ancré au chromosome (Illustration 6. A) (Bickmore et Oghene 1996; Paulson et Laemmli 1977). Les boucles d'ADN observées également en interphase pourraient ainsi être le reflet d'une organisation particulière de la chromatine dans la cellule en association avec la régulation de certains processus tels que la réplication ou la transcription (Gerdes et al. 1994). Ces boucles au sein du noyau ne sont généralement pas retrouvées isolées les unes des autres. Elles apparaissent regroupées entre-elles formant une sorte de « pelote » (globule fractal) constituée d'une structure multi-boucles. Des analyses par capture de conformation de chromosome, méthode qui définit la fréquence d'interaction de loci, ont révélé qu'au sein de cette « pelote », les boucles interagissent entre-elles (Illustration 6. B). En revanche, très peu d'interactions semblent présentes aux bordures des « pelotes », révélant un probable isolement des pelotes les unes par rapport aux autres (Dixon et al. 2012).

Ces pelotes sont définies comme étant des domaines topologiques. Deux types de domaines ont été décrits dans la littérature : les « Topologically-Associated Domain » (TADs) et les « Lamina-Associated Domains » (LADs).

Les TADs constituent un regroupement de boucles chromatiniennes d'une taille allant de 40Kb à 3Mb et participent à la régulation de la transcription via la modulation des interactions entre les régions régulatrices proximales et distales des gènes. Du fait de l'existence de barrières physiques impliquant l'engagement de protéines spécifiques à la frontière entre TADs voisins, les régulations transcriptionnelles intra-TAD sont favorisées alors que les régulations inter-TAD sont empêchées. Confirmant un rôle des TADs dans la coordination de l'expression de gènes voisins, les gènes localisés au sein d'un même TAD ont tendance à avoir une même dynamique de régulation d'expression (Gibcus et Dekker 2013).

En complément des TADs, il existe également des LADs qui sont retrouvés au niveau de la périphérie nucléaire. Les LADs sont des domaines interagissant directement ou indirectement avec des protéines filamenteuses, les lamines, associées entre-elles à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire. Les LADs constituent des domaines enrichis en gènes non exprimés et localisés près de la périphérie nucléaire. Ils sont caractérisés par une faible densité de gènes et une absence de transcription (Guelen et al. 2008; Peric-Hupkes et al. 2010).

L'apparition de boucles et de regroupements de boucles apparaissent importante dans la coordination et la régulation de la transcription. Certaines protéines régulant la transcription et/ou l'architecture chromatinienne pourraient être à l'origine de ces structures.

La protéine CCCTC-binding factor (CTCF) a principalement été décrite comme ayant un rôle régulateur de la transcription notamment via sa fonction d'isolateur, en empêchant physiquement l'association entre deux régions régulatrices de l'expression génique (Phillips et Corces 2009). Dans ce contexte, CTCF serait également impliquée dans la formation et le maintien des TADs (A. S. Hansen et al. 2017; A. S. Hansen 2020). En effet, par immunoprécipitation de la chromatine, CTCF est retrouvé enrichie aux sites de délimitation des TADs. Par ailleurs, 90% des

domaines de liaison de CTCF qui sont à la base des TADs sont orientés de manière inversée (Chang, Ghosh, et Noordermeer 2020). L'orientation de ces motifs de liaison de CTCF impacte l'orientation même de la protéine CTCF et donc guiderait la formation des TADs en définissant les sites d'émergence d'une grande boucle de TADs (Chang, Ghosh, et Noordermeer 2020). Par ailleurs, CTCF ayant un rôle d'isolateur, il permettrait d'empêcher des interactions ectopiques entre régions régulatrices et promoteurs de gènes situés normalement dans des TADs distincts (Chang, Ghosh, et Noordermeer 2020; Nanni, Ceri, et Logie 2020).

CTCF n'est pas la seule protéine impliquée dans la formation des TADs. La cohésine est un complexe protéique en forme d'anneau et qui est composé de Smc1, Smc3, Rad21 et Sa1/2. Ce complexe est impliqué dans de nombreux processus tels que la cohésion des chromatides sœur lors de la mitose, la régulation de la transcription et la recombinaison homologue pendant la réparation des dommages à l'ADN (Watrinn et Peters 2009). En complément de ces rôles, la cohésine semble également avoir une fonction dans l'organisation des TADs. En effet, par immunoprécipitation de la chromatine, l'ensemble des protéines formant le complexe cohésine est retrouvé enrichi aux sites de liaison de CTCF (A. S. Hansen et al. 2017; Pugacheva et al. 2020). Dans la formation des TADs, la cohésine aurait un rôle d'extrusion de la fibre d'ADN. L'anneau de cohésine, en s'associant à la chromatine liée à CTCF, ferait "sortir" une portion de la fibre chromatinienne de manière bidirectionnelle (Illustration 6.C). Ce processus d'extrusion de la chromatine nécessite de l'énergie et est dépendant du domaine ATPase de la cohésine, Smc3 (Chang, Ghosh, et Noordermeer 2020; Davidson et al. 2019). L'association de CTCF à ses sites de liaison va bloquer le processus d'extrusion de la chromatine uniquement si la cohésine rencontre la partie N-terminale de CTCF. Cette « rencontre » est de ce fait dépendante de l'orientation de la protéine CTCF qui elle-même est régulée par l'orientation de ses sites de liaison (A. S. Hansen 2020).

Si le processus d'extrusion de la chromatine a été caractérisé *in vitro* (Davidson et al. 2019), celui-ci n'a pas encore été démontré *in vivo*. De même, le mécanisme moléculaire impliquant la cohésine et CTCF dans ce processus n'a pas été formellement établi (A. S. Hansen 2020).

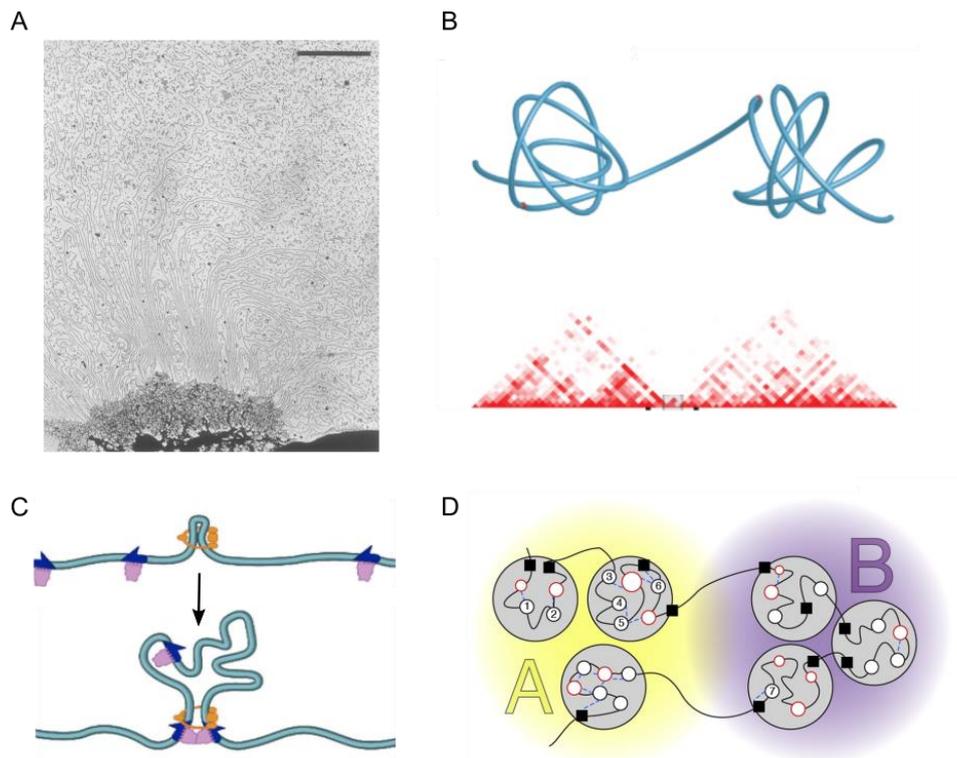


Illustration 6. A) Microscopie électronique d'un halo (en haut de l'image) de fibre d'ADN accroché au chromosome métaphasique (en bas de l'image) après extraction de protéines (Paulson et Laemmli 1977); B) Représentation de deux "pelotes" de TADs reliées entre-elles et de résultats obtenues par la méthode de capture de chromosome (Dixon et al. 2012); C) Schéma du modèle de formation d'un TAD, la cohésine (en jaune) "sort" la chromatine jusqu'à rencontrer CTCF (en rose) qui se trouve associée à ses sites de liaison (en bleu) (Sanborn et al. 2015); D) Les TADs (cercles gris) sont regroupés dans des compartiments actifs A (en jaune) ou inactifs transcriptionnellement B (en violet) (Gibcus et Dekker 2013).

E. Les compartiments subchromosomiques

A un niveau d'organisation supérieur à celui des TADs, des données obtenues par Hi-C ont permis l'identification de compartiments subchromosomiques appelés compartiment A et compartiment B et associant entre eux des TADs d'activité transcriptionnelle similaire (Illustration 6. D).

Les compartiments de type A sont caractérisés par un état de la chromatine de type euchromatine globalement ouverte et où l'expression génique est importante. Ainsi au sein du compartiment A sont retrouvés des regroupement de régions riches en gènes transcriptionnellement actifs, sensibles à la DNase et enrichis en ARN

polymérase ainsi que d'autres régulateurs de la transcription (Lieberman-Aiden et al. 2009; Osborne et al. 2004). Par opposition, l'état chromatinien présent au sein des compartiments de type B correspond à de l'hétérochromatine apparaissant densément organisée et où la transcription est faible ou absente. De ce fait, les compartiments B sont formés par l'association de régions peu transcrites, souvent situées en périphérie du noyau, des nucléoles ou d'autres sites nucléaires tels que les corps PcG qui sont des regroupements de foci de protéines appartenant au groupe polycomb « polycomb group protein » chez la drosophile (Gibcus et Dekker 2013; Lieberman-Aiden et al. 2009; Osborne et al. 2004).

F. Les territoires chromosomiques

Les compartiments A et B se trouvent au sein de territoires chromosomiques. Ce concept de territoire chromosomique, qui postule que chaque chromosome occupe un volume distinct au sein du noyau, a initialement été proposé par Carl Rabl et Theodor Boveri. Theodor Boveri a notamment décrit les CT comme ayant une structure d'éponge avec un réseau de faisceaux de chromatine. Par la suite, ce concept a été oublié car aucun chromosome individuel n'avait pu être mis en évidence par microscopie électronique. Ainsi, dans les années 70-80, le noyau était considéré comme rempli de fibres de chromatine et de boucles qui se mélangent tel un plat de spaghetti.

Les territoires chromosomiques ont été mis en évidence par Cremer et al en 1982 via l'induction de dommages par irradiations laser. Dans l'hypothèse où les différentes fibres chromosomiques sont répandues aléatoirement et mélangées entre-elles dans le noyau, une irradiation locale devrait permettre d'induire des dommages dans plusieurs chromosomes. En revanche si ceux-ci se distribuent dans des zones distinctes du noyau, les dommages ne devraient être présents que sur un ou deux chromosomes. Il s'avère que chaque irradiation locale n'affecte qu'un petit nombre de chromosomes, suggérant que les chromosomes occupent des zones distinctes au sein du noyau (T. Cremer et al. 1982). En marquant l'intégralité des chromosomes au sein d'un noyau de fibroblaste humain par fluorescent hybridation in situ (FISH), les 22 chromosomes autosomaux et les deux chromosomes sexuel X et Y ont pu être montrés comme occupant des régions nucléaires distinctes définissant ainsi des

territoires chromosomiques. Par ailleurs, il semblerait que les chromosomes les moins volumineux aient tendance à être localisés près du centre du noyau, tandis que les grands chromosomes se situeraient vers la périphérie du noyau (Bolzer et al. 2005).

Bien que les territoires chromosomiques aient pu être mis en évidence, l'existence d'une interface organisée entre ces territoires reste controversée.

Plusieurs modèles ont été suggérés concernant l'organisation des chromosomes en interphase. Tout d'abord, le modèle de territoire chromosomique-compartiment interchromatinien (CT-IC) décrit un réseau interconnecté et organisé de chromosomes, CT, ainsi qu'un deuxième réseau spatial, IC, dont l'ADN est absent et qui commence des pores nucléaires pour s'étendre entre les fibres chromatiniennes (Illustration 7. A) (Münkel et al. 1999; Visser et al. 2000). Dans ce compartiment interchromatinien, on retrouve des structures subnucléaires appelées « speckles » qui contiennent principalement des facteurs d'épissage d'ARNm et des corps nucléaires qui participent au transport de complexes macromoléculaires. Dans ce modèle, deux zones distinctes relatives à l'activité génique ont été décrites: le compartiment nucléaire actif (ANC) et inactif (INC). Le compartiment INC se trouve sous la forme condensée et est transcriptionnellement inactif, il se situe au centre des agrégats chromatiniens. A l'inverse, le compartiment ANC est quant à lui favorable au processus d'expression génique et se situe à la périphérie des regroupements des domaines de chromatine, autrement appelés la région périchromatinienne (PR) (Kurz et al. 1996). L'ANC comprend l'IC ainsi que la PR et représente des lieux de transcription, d'épissage des ARN, de réplication et potentiellement de réparation de l'ADN (Thomas Cremer et Cremer 2010).

Il existe également un autre modèle qui est le réseau interchromatinien (ICN) (Illustration 7.B). Celui-ci suggère que les fibres chromatiniennes et les boucles se mélangent de manière uniforme à l'intérieur d'un CT mais aussi entre les CT voisins. Il n'existerait ainsi pas à proprement parlé de compartiment interchromatinien mais des boucles de chromatine décondensées et mélangées entre elles (Branco et Pombo 2006). Ce mélange inter-chromosomal semble être impliqué dans la régulation de la transcription (Maharana et al. 2016).

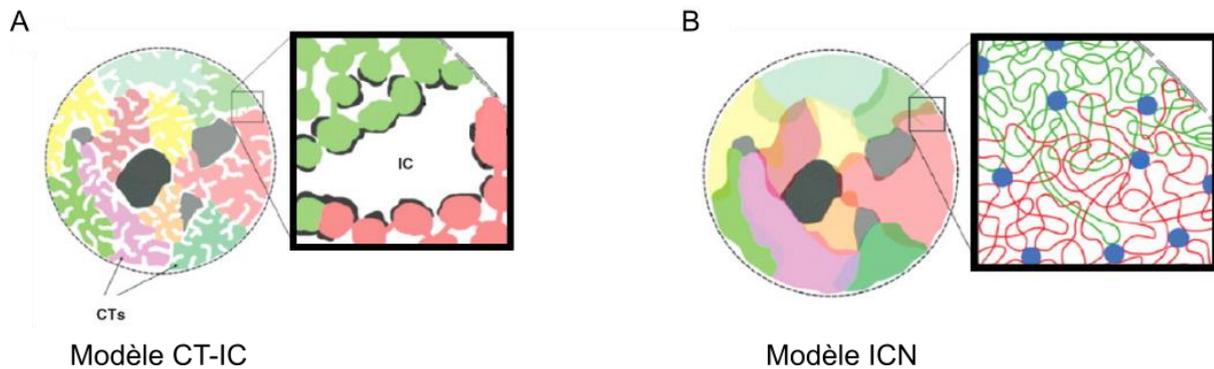


Illustration 7. Représentation A) du modèle CT-IC où les territoires chromosomiques se trouvent séparés par un espace nucléoplasmique et B) du modèle ICN où le compartiment interchromatinien se trouve absent et où les fibres chromatiniennes se mélangent à l'interface des territoires chromosomiques (Thomas Cremer et Cremer 2010).

G. La chromatine et la séparation de phase

Le noyau contenant la chromatine est délimité spatialement par une enveloppe nucléaire. Le noyau est donc un compartiment cellulaire où les macromolécules nucléaires sont séparées physiquement du cytoplasme et au sein duquel elles diffusent librement afin d'y réaliser des réactions biochimiques. A l'intérieur du noyau, et à différentes échelles, la chromatine est organisée *via*, entre autres, des liaisons protéines-protéines et ADN-protéines. Cependant, ces dernières ne semblent pas être les seuls mécanismes impliqués dans la structuration de la chromatine. En effet, un autre mécanisme appelé séparation de phase pourrait participer en plus des événements précédemment cités à la conformation de la chromatine au sein du noyau. La séparation de phase aboutit à la formation de sous domaines sans délimitations membranaires. Cette dernière est régie par les propriétés physicochimiques des protéines qui vont tendre à s'agréger entre elles en formant « des gouttelettes ». Il a été décrit deux types de séparation de phase à même de promouvoir la formation de domaines chromatiniens au sein du noyau : la séparation de phase polymère-polymère (PPPS) et la séparation de phase liquide-liquide (LLPS) (Erdel et Rippe 2018).

La PPS implique des interactions entre régions distales de la chromatine via la présence de protéines. Ces dernières, qui n'interagissent pas forcément entre-elles, agissent comme des ponts entre les segments de chromatine. Il en résulte une séparation de portions de chromatine du reste de celle-ci. Notamment, certaines régions comportant le même type de modifications d'histones et via l'association de protéines de liaison de ces marques, auraient tendance à s'accumuler les unes avec les autres (Michieletto, Orlandini, et Marenduzzo 2016). Par simulation moléculaire, il a été décrit que la chromatine peut s'organiser de manière enroulée ou sous forme de globule en fonction du nombre de protéines de liaison. Le modèle *in-silico* corrèle avec les données expérimentales obtenues par capture de conformation de chromosome (Conte et al. 2020). Ainsi, la formation des TADs et probablement des compartiments actifs et inactifs pourraient être réalisées par un mécanisme différent de ce qui a été proposé pour le modèle cohésine-CTCF (Nicodemi et Prisco 2009; Marenduzzo, Micheletti, et Cook 2006).

Un autre modèle régit par la thermodynamique décrivant l'organisation de la chromatine a été décrit : la LLPS. La LLPS correspond à l'agrégation de protéines ou de plus gros composés formant une structure ayant des propriétés similaires à un liquide. La LLPS peut être expliquée à travers la représentation d'une goutte d'huile dans l'eau. Ces deux liquides qui ne sont pas séparés physiquement entre-eux, ne se mélangent cependant pas. C'est ce phénomène qui caractérise la séparation de phase liquide-liquide. La principale caractéristique de la LLPS constitue la formation de « gouttelettes » qui peuvent se déformer et fusionner entre-elles *in vitro* et/ou au sein des cellules. L'organisation sphérique de ces gouttelettes minimise la surface de contact entre celles-ci et l'environnement extérieur.

In vitro et dans des conditions ioniques physiologiques, la chromatine, formée à partir d'une séquence nucléotidique Widom's 601 et d'octamère d'histones, est capable de former des gouttelettes (Gibson et al. 2019). Ainsi, la plus petite organisation de la chromatine posséderait des caractéristiques favorisant la formation de LLPS. Ce phénomène est dépendant de la partie N-terminale de l'histone H4 (Gibson et al. 2019) mais également de l'histone de liaison H1 (Gibson et al. 2019; Shakya et al. 2020) qui ont déjà été décrites comme impliquées dans la formation de structure

chromatinienne. L'histone H1 par lui-même est capable de promouvoir la LLPS (Turner et al. 2018). En effet, il a été décrit que les protéines ayant des régions désordonnées et des domaines riches en résidus chargés sont capable d'induire de la séparation de phase. L'histone de liaison H1 possède un grand domaine désorganisé composé d'acides aminés chargés en C-terminale. Une autre protéine Heterochromatin protein 1 (HP1a), retrouvée enrichie tout comme l'histone H1 aux régions hétérochromatiniennes, est impliquée dans la séparation de phase. Une hypothèse suggère que la LLPS, promue par H1 et HP1 et permettant la formation de régions d'hétérochromatine, soit un événement facilitant la répression génique (Larson et al. 2017; Strom et al. 2017; Shakya et al. 2020). Cependant, la fonction de HP1 dans la formation de LLPS au sein de l'hétérochromatine reste controversée. Une récente étude décrit que la maintenance de l'hétérochromatine serait indépendante de la LLPS formée par HP1 au sein du noyau (Erdel et al. 2020).

D'autres structures nucléaires, non chromatinienne au sein du noyau ont également été décrites comme étant formées par LLPS telles que les centrosomes, centre de nucléation des microtubules, les cajal bodies, qui sont le centre de création du spliceosome et le nucléole, principalement dédié à la synthèse d'ARN ribosomiques (Erdel et Rippe 2018).

Ainsi la structuration de la chromatine apparaît être, au-delà des interactions protéine-protéine, également régie par les lois de la physique et est donc soumise aux conditions environnantes.

H. La dynamique de la chromatine

i. La modulation de l'organisation de la fibre à l'échelle des histones via l'incorporation de variants d'histones

Le rôle des histones dans la régulation des caractéristiques de la fibre chromatinienne était initialement considéré comme uniquement lié à la formation des nucléosomes. Néanmoins, via l'incorporation de variants d'histones et de modifications post-traductionnelles, ces protéines sont également impliquées dans

des processus dynamiques (Stedman et Stedman 1950) permettant de réguler l'accessibilité de l'ADN aux protéines.

Les nucléosomes ne sont pas des éléments fixes et immobiles. Ils peuvent en effet « glisser », être évincés, partiellement désassemblés et être plus ou moins associés à la molécule d'ADN.

L'incorporation et l'éviction des histones au sein de la chromatine est médiée par l'activité de protéines spécifiques appelées chaperonnes. Les chaperonnes semblent avoir une spécificité au regard de l'incorporation de certaines histones plutôt que d'autre. Par exemple, le complexe multi-chaperonnes CAF-1 incorpore les histones H3-H4 spécifiquement (Sauer et al. 2017). A l'inverse, les histones peuvent également être enlevées de la structure chromatinienne par les chaperonnes pour être remplacées par leur équivalent ou un variant. Au sein de la cellule, la dynamique d'échange des histones de cœur, déterminée par des techniques d'analyse de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), apparaît être moins rapide que celle de l'histone de liaison H1, suggérant que leur dépôt et éviction sont régulées distinctement (D. Chen et al. 2005; Kimura et Cook 2001; Misteli et al. 2000; Lever et al. 2000). En plus des histones canoniques qui sont H2A, H2B, H3 et H4, les chaperonnes peuvent également déposer des variants d'histones. Il existe plusieurs variants de l'histone H2A notamment H2A.1, H2A.X, H2A.Z, H2A.B (H2A-Bbd) et macro-H2A (Biterge et Schneider 2014). Des variants de H3 ont également été décrits : H3.2, H3.3, H3.4, et centromeric protein A (CENP-A) et récemment un variant H4 a été caractérisé (M. Long et al. 2019). Ces variants peuvent moduler l'architecture de la fibre de chromatine en affectant les interactions histones-histones et/ou histone-ADN. En effet, certains variants tels que macro-H2A et H2A-Bbd modifient les interactions normalement constituées en présence des histones canoniques au sein du nucléosome. Le variant macro-H2A possède 65% de similarité avec l'histone canonique H2A. Il contient, en plus de la partie N-terminale flexible et du domaine histone-fold caractéristiques des histones de cœur, un domaine macro en région C-terminale (Biterge et Schneider 2014). L'incorporation d'un variant macro-H2A modifie les propriétés d'interaction (L1-L1) avec l'autre histone H2A, ce qui pourrait impacter la stabilité du nucléosome (Chakravarthy et

Luger 2006; Chakravarthy et al. 2005). Un autre variant partage 48% de similarité avec H2A : l'histone H2A.Bbd. L'incorporation de ce variant est associée à un relâchement de la chromatine. Des analyses de microscopie (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et de biochimie (test à la MNase) ont montré que seules 118 paires de bases restent associées à l'octamère ayant incorporé H2A.Bbd au lieu des 147 paires de bases normalement enroulées autour de l'octamère constitué d'histones canoniques, suggérant un déroulement partiel de l'ADN autour du nucléosome en présence de ce variant (Bao et al. 2004).

En plus de moduler la structure de la chromatine, la présence de certains variants d'histones permet de réguler des processus cellulaires tels que la transcription et la réparation de lésions à l'ADN. Par exemple, l'accumulation de variants d'histones H2A.Bbd et H3.3 est associée à l'activation de la transcription contrairement à celle de CENP-A qui se trouve enrichie aux régions réprimées au niveau des centromères (Ausió 2006). H2A.X est quant à elle impliquée dans plusieurs événements cellulaires tels que la méiose, les recombinaisons V(D)J, la réplication, l'apoptose et la réparation de dommages à l'ADN. En effet, la phosphorylation de la serine 139 du variant H2A.X induite par les protéines Ataxia telangiectasia mutated (ATM) et Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) délimite les sites de dommages et permet le recrutement de la machinerie de réparation et des remodeleurs de la chromatine, facilitant ainsi la réparation des lésions (Paull et al. 2000; Emmy P. Rogakou et al. 1998; E. P. Rogakou et al. 1999; van Attikum, Fritsch, et Gasser 2007). L'incorporation de variants d'histones permet ainsi un niveau supplémentaire de modulation de l'organisation de la chromatine et de régulation de processus cellulaires.

Les variants d'histones ne concernent pas uniquement les histones de cœur. Il existe sept variants de l'histone de liaison H1, décrits chez les mammifères. Les variants de l'histone H1 ont des structures similaires à H1 mais différent par leurs séquences en acides aminés au niveau des chaînes flexibles situées aux régions terminales de la protéine (Lu et al. 2009). Ces isoformes ont des affinités variables pour la chromatine. En effet, l'histone H1.4 a une forte affinité et participe à une compaction importante de la chromatine, tandis que l'isoforme H1.1 lie faiblement l'ADN et

condense plus faiblement la chromatine (Kowalski et Pałyga 2016). De manière générale, l'enrichissement de l'histone de liaison H1 est associé à une compaction de la chromatine et une répression de la transcription. En effet, la déplétion de H1 au sein de régions géniques est un prérequis pour activer la transcription. L'éviction de H1 est notamment médiée par le recrutement de la chaperonne NAP-1 via l'acétylation des histones induites par P300 (Shimada et al. 2019).

ii. La modulation de l'organisation de la fibre à l'échelle des histones via la présence de modifications post-traductionnelles

Outre les variants d'histones, le nucléosome canonique peut aussi être modifié par différentes modifications post-traductionnelles (PTMs) ciblant les histones. Ces PTMs ont un impact sur la structure nucléosomale et modulent les fonctions biologiques nécessitant un accès à l'ADN comme en particulier la transcription.

La région N-terminale des histones de cœur est composée de 30 à 40% d'acides aminés chargés positivement tels que la lysine et l'arginine (J. C. Hansen, Tse, et Wolffe 1998). Cette queue N-terminale apparaît non structurée *in vitro*. En revanche celle-ci tend à s'organiser en hélice lorsqu'elle est associée à de l'ADN nucléosomal (Banères, Martin, et Parello 1997). Deux rôles majeurs de la partie N-terminale ont été décrits : i) la capacité de protéines non-histones à interagir avec ce domaine et ii) sa fonction de régulation de la condensation de la chromatine (J. C. Hansen, Tse, et Wolffe 1998). Ces deux fonctions du domaine N-terminal peuvent être régulées par l'ajout de PTMs (Illustration 8). Les principales PTMs décrites dans la littérature correspondent à la méthylation, citrullination, acétylation, phosphorylation, ubiquination, sumoylation, ADP-ribosylation et β -N-acetylglucosamination. L'ajout de ce type de modifications est médié par des enzymes transférant ces groupements provenant d'un substrat sur un acide aminé cible présent sur la région N-terminale des histones. Généralement, on ne retrouve pas une seule modification, au sein d'un même nucléosome. Différentes marques épigénétiques peuvent, en effet, se trouver sur la queue d'une histone mais également sur les différentes histones composant le nucléosome. Ces marques peuvent se compléter vis-à-vis d'une même fonction, formant ce qui est communément appelé le code histone. Ces ajouts de

groupements sur la queue des histones peuvent affecter les interactions ADN-nucléosome mais également les liaisons histones-histones. En effet, les modifications d'histones trouvées sur leur queue altèrent les propriétés physico-chimiques du nucléosome. Par ailleurs, ces marques épigénétiques peuvent servir de sites de liaison à des protéines spécifiques « readers » qui peuvent être impliquées dans divers processus (Kouzarides 2007; Strahl et Allis 2000).

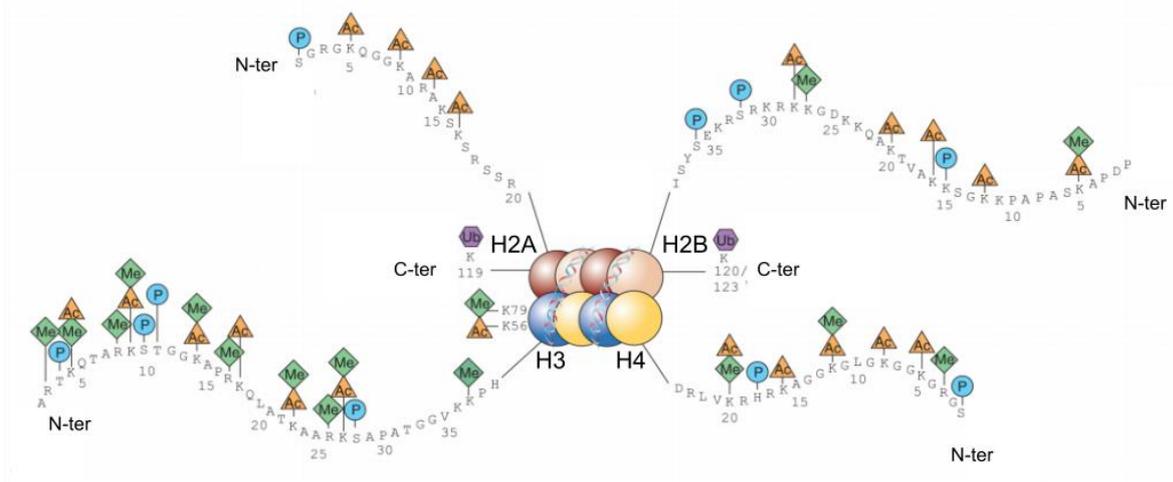


Illustration 8. Exemple de modifications trouvées sur la queue des histones de cœur. Les principaux acides aminés substrat pour les ajouts de groupements post-traductionnels, acétylé (triangle orange), méthyle (losange vert), phosphate (cercle bleu) et ubiquitine (polygone violet) sont les lysines, arginines, thréonines et sérines (Keppler et Archer 2008).

L'une des modifications d'histone la plus étudiée est l'acétylation. Le transfert par des acétyl-transférases d'un groupement acétylé (CH₃-CO) sur le groupement amine de la chaîne latérale de la lysine fait disparaître la charge positive ce qui pourrait diminuer son affinité pour les phosphates présents sur l'ADN (Norton et al. 1989). Le nombre important de sites cibles d'acétylation tels que les lysines 9, 14, 18 et 23 sur l'histone 3 ou les lysines 5, 8 et 12 sur la protéine H4 permet de neutraliser la charge sur des segments de queues d'histone, déstabilisant ainsi les interactions entre ces queues et l'ADN (Wolffe et Hayes 1999). Le maintien de l'acétylation des histones par un traitement à la Trichostatin A, qui inhibe les histones déacétylases, induit une réorganisation spatiale des nucléosomes au sein des noyaux, ceux-ci apparaissant

plus dispersés comparé au contrôle non traité (Ricci et al. 2015), suggérant que l'acétylation des histones régule aussi les niveaux supérieurs d'organisation de la chromatine et favorise une structure relâchée de cette-dernière.

Un autre type de modification altère la structure du nucléosome, la phosphorylation. Le transfert d'un groupement phosphate provenant d'une molécule d'ATP sur un groupe hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine, thréonine ou tyrosine par l'activité de kinases, induit une addition de charges négatives (Bannister et Kouzarides 2011). Cette modification des propriétés chimiques via la présence d'atomes d'oxygène chargés négativement va diminuer l'association des histones modifiées avec la molécule d'ADN chargée elle aussi négativement (North et al. 2011).

Tout comme les deux marques précédemment citées, l'ajout de groupements ADP-ribose, constitués d'une adénosine associée à un ribose, sur les histones modifie l'architecture chromatinienne. Les groupements ADP-ribose sont catalysés par les enzymes poly(ADP-ribose) polymérasés (PARP) à partir du substrat nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) (Shieh et al. 1998). En réponse à l'induction de dommages dans l'ADN, PARP1 est recrutée sur ces lésions, ce qui induit son activation. Ces enzymes catalysent alors la formation de chaînes d'ADP-ribose sur des protéines cibles situées à proximité et en particulier de PARP1 elle-même ainsi que les histones (Bonfiglio et al. 2017; Palazzo et al. 2018). *In vitro*, l'ajout de ces marques chargées négativement au sein de la chromatine facilite la dissociation entre l'ADN et les nucléosomes (Mathis et Althaus 1987). La PARylation (Poly-(ADP-ribosyl)ation) de la chromatine semble donc moduler la stabilité des interactions ADN-histones menant à une structure plus relâchée de la chromatine (Poirier et al. 1982).

L'acétylation, la phosphorylation et la PARylation sont des modifications post-traductionnelles qui altèrent les interactions électrostatiques entre les histones et l'ADN, menant à une structure plus relâchée de la chromatine. En plus de leurs effets sur l'architecture chromatinienne, ces trois types de modifications participent à la régulation de certains processus cellulaires de manière synergique ou antagoniste. En effet, la PARylation est notamment impliquée dans la signalisation du site de

dommage de l'ADN et favorise le processus de réparation de la zone lésée en recrutant des protéines de réparation ayant des domaines de reconnaissance de cette marque (Sellou et al. 2016; Smith et al. 2018; Wei et Yu 2016). La présence de chaînes de PAR apparaît antagoniste à celle des groupements acétyle lors de lésions génomiques et inversement (Bartlett et al. 2018). A contrario, la combinaison de groupement acétyle et phosphate sur la lysine de l'histone 4 et sur la sérine de l'histone 3 (H4K16ac et H3S10p respectivement) au sein des nucléosomes localisés au niveau de régions régulatrices distales, participe ensemble à l'élongation de la transcription via la reconnaissance de ces marques par des protéines effectrices (Zippo et al. 2009). Ce code histone est d'autant plus complexe, que le degré de modifications peut également moduler les fonctions des marques. Le groupement méthyle (CH3) peut, en effet, être trouvé sous forme mono-, di- ou tri-, correspondant à un, deux ou trois groupes de modifications sur les histones (Kouzarides 2007). De la même manière, la signalisation par ADP-ribosylation peut impliquer un marquage via des monomères d'ADP-ribose ou des chaînes de poly-ADP-ribose, celles-ci tant linéaires ou ramifiées (Bartlett et al. 2018).

iii. Les acteurs protéiques modulant le positionnement des nucléosomes

La modulation de l'association de plusieurs nucléosomes est dépendante de marques épigénétiques localisées sur la queue des histones et de la présence de l'histone de liaison H1. En complément, l'organisation des nucléosomes le long du génome peut également être modifiée par des protéines de remodelage de la chromatine. Ces complexes protéiques appartenant à une des familles SWI/SNF, ISWI, CHD ou INO80 sont dépendantes de la présence d'ATP, l'hydrolyse de cette molécule d'ATP leur permettant de faire glisser ou évicté le nucléosome sans dissocier l'ADN de celui-ci (Gutiérrez et al. 2007; Hargreaves et Crabtree 2011). Plusieurs mécanismes de remodelage via ces enzymes ont été décrits : le modèle de la diffusion de torsion de l'ADN qui correspond à une torsion d'une paire de bases qui se trouve propagée le long de l'ADN enroulé autour du nucléosome et un modèle de recapture de boucle décrivant le détachement local d'un segment d'ADN qui se propage le long de l'ADN nucléosomal (Längst et Manelyte 2015).

Selon le contexte cellulaire et l'environnement chromatinien, les remodeleurs seront recrutés afin de rendre l'ADN accessible à des protéines effectrices (Längst et Manelyte 2015).

iv. La modulation de l'organisation de la chromatine à l'échelle des « Topologically-Associated Domains »

Les TADs et les boucles ont pu être mises en évidence par des techniques de capture de conformation de chromosome et par FISH. Les informations issues de ces deux techniques ne sont révélatrices que de ce qui se passe à un instant T, l'instant où les cellules ont été fixées. Il est donc difficile de définir la dynamique de la formation de ces structures au cours du temps. Cependant, certaines études révèlent que la formation des TADs et des boucles serait modulée au cours du cycle cellulaire. En effet, les TADs et les boucles tendent à disparaître en prophase et ne sont pas présentes lors de la mitose (Gerdes et al. 1994; Gibcus et al. 2018; Naumova et al. 2013). Ces données suggèrent que la formation des TADs est renouvelée au moins une fois au cours du cycle cellulaire et est donc dynamique. D'autres études démontrent que les TADs pourraient avoir une dynamique de formation de quelques minutes à 1h. En effet, la dégradation de Rad21, un des composants du complexe cohésine, par le système auxine/détron induit la disparition des TADs. En revanche, la production à nouveau de Rad21 entraîne la réapparition des TADs, environ 1h après lavage de l'auxine (Rao et al. 2017). Ces données suggèrent que les TADs sont capables de se reformer en quelques minutes et de ce fait, que leur formation est dynamique. Par ailleurs, Anders et ses collègues ont étudié la dynamique de CTCF et du complexe cohésine. La cohésine et CTCF, qui colocalisent aux mêmes loci et interagissent entre elles, formeraient un complexe de maintenance de boucles, appelé le « loop maintenance complex ». Dans ce même article, les auteurs révèlent un temps de résidence de CTCF de quelques minutes contre une vingtaine de minutes pour la cohésine. Ces données suggèrent un modèle dynamique du « loop maintenance complex » par lequel plusieurs molécules CTCF peuvent se lier et se dissocier de son site de liaison tandis que la cohésine reste associée pendant l'extrusion de l'ADN (A. S. Hansen et al. 2017).

Ensemble, ces données suggèrent que ces structures ne sont pas stables une fois organisées. Elles sont, en effet, présentes en interphase et se désorganisent lors de la mitose. De plus, la formation de ces TADs apparaît être rapide (environ 1h). D'autres études complémentaires pourraient par la suite aider à définir la dynamique des TADs.

v. La modulation de l'organisation de la chromatine à l'échelle des territoires chromosomiques

Grâce à l'incorporation de nucléotides couplés à un fluorophore lors de la réplication de l'ADN en phase S (Walter et al. 2003) ainsi que par la photoactivation d'un fluorophore associé aux histones H4 et H2B via irradiation laser (Strickfaden et al. 2010), il a été possible d'étudier la dynamique des CT par microscopie confocale. Les données issues de ces études démontrent que l'organisation des CT établies pendant la phase G1, persiste durant l'interphase et la prophase. En revanche, les CT se réorganisent lors de la prométaphase, phase de préparation à l'alignement des chromosomes le long du fuseau mitotique. Les CT sont ensuite transmis aux deux cellules filles après mitose. En G1, l'organisation des CT transmis de la cellule mère aux deux cellules filles, apparaît symétrique entre celles-ci (Walter et al. 2003). La position des CT chez les cellules filles est le reflet de leur position sur le fuseau métaphasique. Si Walter et al ont démontré que l'organisation des CT transmis ne correspondait pas à ceux de la cellule mère, d'autres ont décrit le contraire (Gerlich et al. 2003). La transmission de l'organisation des chromosomes après la mitose reste encore controversée, d'autres études complémentaires sont requises afin de déterminer les acteurs et les mécanismes relatif à la transmission de l'organisation des CT.

Cette mémoire d'organisation des CT, transmise de la cellule mère aux deux cellules filles, pourrait être médiée via la présence de marques épigénétiques, agissant comme des étiquettes de processus cellulaires.

II. Les marques épigénétiques

A. Les modifications d'histones

Au sein du noyau, deux natures de chromatine sont définies : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine est caractérisée par un statut décondensé et une activité transcriptionnelle, tandis que l'hétérochromatine constitue, à l'inverse, une chromatine condensée et est associée à la répression génique. La modulation de l'architecture de la chromatine apparaît essentielle dans le processus de régulation de la transcription. En effet, à l'échelle du gène, les protéines effectrices, par exemple les facteurs de transcription, doivent avoir accès à leur site de liaison afin de promouvoir l'expression génique. Pour cela, une relaxation de la chromatine de manière locale apparaît nécessaire. La réorganisation chromatinienne locale peut être réalisée par des protéines de remodelage de la chromatine, des facteurs pionniers dont le rôle est de pré-ouvrir la chromatine permettant l'accessibilité des sites de liaisons aux facteurs de transcription, par des chaperonnes qui vont incorporer des variants d'histones et des modificateurs d'histones.

i. Les marques d'histone présentent dans les régions euchromatiniennes

Au sein du génome, la distribution des marques d'histone est spécifiquement associée à certaines régions génomiques. La présence de modifications post-traductionnelles participe localement à la régulation de la transcription soit en modulant les interactions entre nucléosomes et/ou celles présentes entre les histones et l'ADN soit en permettant le recrutement et/ou la répulsion de certaines protéines effectrices.

L'état transcriptionnel d'un gène peut être régulé par différents loci appelés régions régulatrices. Parmi celles-ci, on distingue notamment des régions régulatrices proximales, référant au promoteur, et distales comprenant des « silenciers », des insulateurs, des régions de contrôle du locus (LCR) et des « enhanceurs ». Le promoteur, localisé près du site d'initiation de la transcription (TSS) en 5' du gène assure un niveau basal d'expression de celui-ci via la liaison de facteurs de transcription, d'activateurs, de co-activateurs et de l'ARN polymérase (Maston, Evans,

et Green 2006). Les « enhancers », contrairement aux promoteurs, se trouvent éloignées (au-delà de 1kb du gène) et sont présents soit en amont, soit en aval ou au sein même du gène associé (Vernimmen et Bickmore 2015). L'association physique entre un promoteur et un « enhancer » va permettre de stimuler la transcription du gène cible en formant une plateforme active et favorable à la transcription (Plank et Dean 2014). Ce phénomène est dépendant de protéines activatrices de la transcription ainsi que de protéines modifiant la structure de la chromatine, que ce soit en participant à l'interaction « enhancer » -promoteur, à l'ouverture de la chromatine ou encore à l'apposition de marques d'histones (Plank et Dean 2014; Vernimmen et Bickmore 2015).

Les régions de chromatine active présentent un fort niveau d'acétylation des histones de cœur H3 et H4 et une déplétion locale en nucléosomes favorisant un état relâché. Certaines modifications d'histones apparaissent spécifiques de la nature de la région régulatrice. En effet, les promoteurs actifs sont principalement caractérisés par la présence de trois groupements méthyle sur la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) et d'un groupement acétyle sur la lysine 27 de H3 (H3K27ac) (Illustration 9. A). Les « enhancers » actifs sont quant à eux associés à un enrichissement en H3K27ac et H3K4me1 (Illustration 9. A) (Heintzman et al. 2007; Mahé et al. 2017; Sérandour et al. 2012). Récemment, il a été décrit qu'une certaine catégorie d'« enhancer » comportait, en supplément, la marque H3K79me3, la forme triméthylée de la lysine 79 de l'histone H3. Cette modification d'histone semble essentielle à l'interaction enhancer-promoteur, et participerait de plus à la fonction biologique de l'enhancer en permettant l'accumulation de H3K27ac, un statut ouvert de la chromatine ainsi que la liaison de facteurs de transcription au niveau de cette région distale (Godfrey et al. 2019).

Certaines régions régulatrices distales peuvent être considérées comme bivalentes (« poised enhancer »), c'est-à-dire que celles-ci sont à la fois enrichies en modifications d'histones positives pour la transcription référant à H3K4me1 et à la fois par la marque répressive H3K27me3 (Illustration 9.B). Dans ce contexte, le gène qui y est associé n'est pas ou faiblement exprimé (Rada-Iglesias et al. 2011). Ce type

d'« enhancer » peut être activé selon le contexte cellulaire et ainsi assurer sa fonction de stimulateur transcriptionnel.

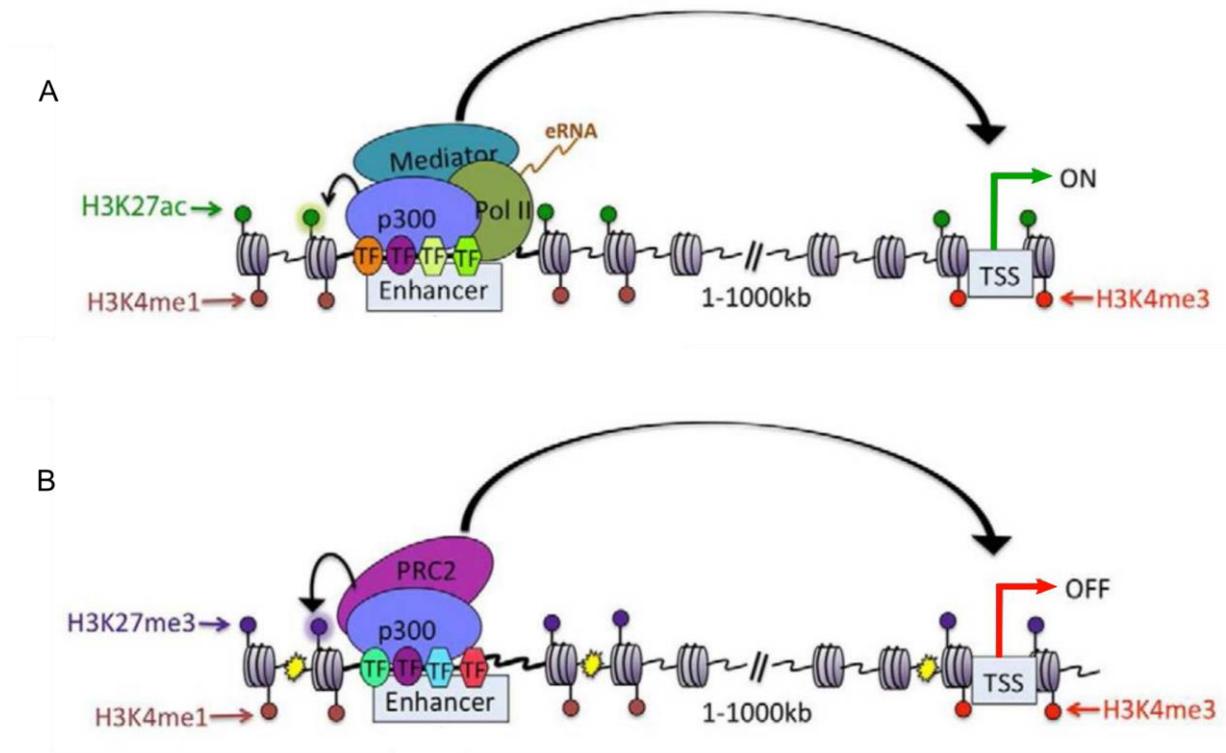


Illustration 9. Représentation des marques d'histones enrichies au sein de régions régulatrices et associées à l'état transcriptionnel du gène cible. A) L'expression génique est associée à la présence de H3K27ac et H3K4me1 au niveau de l'« enhancer » et de H3K27ac et H3K4me3 au niveau du promoteur. B) La liaison du complexe polycomb PRC2 triméthyle H3K27 au niveau de l'« enhancer ». Les « enhancers » bivalents sont donc à la fois marqués par H3k4me1 et par H3K27me3, limitant leur fonction dans la stimulation de la transcription (Calo et Wysocka 2013).

D'autres modifications d'histones sont également des témoins de l'activation de la transcription en dehors de ces régions régulatrices. Set 2 est une méthylase d'histone ciblant la lysine 36 de H3 (H3K36). Cette enzyme interagit préférentiellement avec le domaine C-terminal (CTD) phosphorylé de l'ARNpolymérase II. La méthylation de H3K36 participe à la régulation de l'élongation de la transcription médiée par l'ARNpolymérase (Kizer et al. 2005). Tout comme H3K36me, le niveau d'enrichissement de H3K79méthylée localisé au sein de région

transcrite corrèle positivement avec le taux d'ARN produit du gène cible (Steger et al. 2008).

Parce que ces marques sont spécifiquement trouvées au sein de certaines régions actives, notamment celles caractérisant les « enhancers », elles sont de ce fait considérées comme des signatures permettant, d'une part d'identifier la nature des régions génomiques et d'autre part de déterminer l'état transcriptionnel du gène se trouvant régulé par ces loci, à l'aide d'outils bio-informatiques.

ii. Les marques d'histones présentent dans les régions hétérochromatiniennes

A contrario de l'euchromatine, l'hétérochromatine se trouve dans un état condensé et non favorable pour la transcription. L'hétérochromatine peut être de nature facultative ou constitutive. Les centromères et les télomères contiennent principalement des séquences répétées qui sont rarement exprimées. Au niveau de ces régions, la chromatine est caractérisée comme étant de l'hétérochromatine de type constitutive. Cet état chromatinien favorise la répression de génique qui est maintenue aux cours des divisions cellulaires. L'hétérochromatine facultative, en revanche, est par définition réversible et est dépendante du stade de développement et du contexte cellulaire (Trojer et Reinberg 2007).

De la même manière qu'il existe des marques d'histones associées à l'activation de la transcription, des modifications d'histones caractéristiques des zones répressives pour ce processus ont également été décrites.

La lysine 9 de l'histone H3 peut être la cible de méthylation par des Histone méthyl transférase parmi lesquelles Suv39h1 (Rea et al. 2000). Cette marque est caractéristique de régions d'hétérochromatine constitutive. La triméthylation de H3K9 est reconnue par le chromodomaine de l'hétérochromatin protein 1 (HP1). La protéine HP1 est localisée spécifiquement dans les régions hétérochromatiniennes et son enrichissement est nécessaire à la formation de ce statut répressif. L'absence de cette marque d'histone affecte l'accumulation de HP1 au sein de l'hétérochromatine ainsi que la répression génique (Rea et al. 2000). Le rétrotransposon LINE-1 (interspersed nuclear element-1) est ainsi maintenu dans un état réprimé et de manière permanente par la présence combinée de H3K9me3 et HP1 α au sein de

son promoteur qui, par leurs actions communes, maintiennent l'hétérochromatine dans sa forme constitutive (Rangasamy 2013).

D'autres régions, telles que les séquences répétées LTR, apparaissent quant à elles réprimées par la présence de la forme triméthylée de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me3), promouvant l'établissement d'une hétérochromatine facultative (Rangasamy 2013). La triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) par les complexes méthylases PRC1 et PRC2, est également une autre marque caractéristique des régions d'hétérochromatine facultative. Au sein du génome, certaines régions présentent une forte accumulation de H3K27me3 auquel est associé une répression génique (Hosogane et al. 2016). Des études complémentaires démontrent que les loci riches en H3K27me3 peuvent agir en tant que « silencer » en interagissant avec le promoteur des gènes cibles à travers la formation de boucles. En effet, La délétion de ces loci ayant un taux élevé de H3K27me3 par la méthode CRISPR est associée à une réorganisation des interactions chromatiniennes longue distance (Cai et al. 2021). Cette restructuration des boucles de chromatine permet la réactivation de l'expression des gènes concernés. De la même manière, l'inhibition de la triméthylation de H3K27 est associée à une augmentation du niveau de la marque active H3K27ac et peut dans certains cas conduire à une altération des associations chromatiniennes (Cai et al. 2021).

Il existe donc plusieurs modifications qui participent à la répression et/ou à l'activation de la transcription. Certaines marques apparaissent spécifiques de la nature des éléments génomiques concernés et leur fonction est potentiellement modulable en réponse à la liaison de protéines effectrices ou suivant le contexte cellulaire.

B. Les marques épigénétiques de l'ADN

L'une des marques épigénétique la plus étudiée est la 5-méthylcytosine (5mC). Découverte pour la première fois par Johnson et Coghill en 1925, la présence de cette marque a ensuite été confirmée au sein du génome de thymus de veau via la séparation des acides nucléiques par chromatographie sur papier (Hotchkiss 1948;

Johnson et Coghill 1925). La 5mC est retrouvée chez les procaryotes, les plantes et les vertébrés. Cette marque est cependant faiblement représentée voir absente chez les levures, les insectes et certains nématodes.

i. Les caractéristiques biochimiques de la méthylation des cytosines

La méthylation des cytosines se fait via le transfert d'un groupement méthyle, de nature hydrophobe du donneur S-adenosylmethionine (AdoMet ou SAM) sur le carbone 5 de la cytosine par les DNA methyl-transférases (DNMT), principalement dans le contexte d'une cytosine précédant une guanine (CpG). La reconnaissance de la séquence se fait via deux boucles séparées par un feuillet beta, localisées au sein du « target recognition domain » (TRD) du domaine catalytique de la protéine DNMT (Song et al. 2011). Une fois associée principalement via des liaisons hydrogènes formées entre le squelette phosphate de l'ADN et les résidus du domaine CXXC de la protéine, la cytosine cible est expulsée de la double hélice d'ADN et insérée dans le domaine catalytique de la protéine associé au substrat AdoMet. Le carbone 6 de la cytosine forme une liaison covalente avec le groupement sulfurhydroxyle de la cystéine 81 de la méthylase. La création de cette interaction entre l'enzyme et la cytosine va entraîner le transfert du groupement méthyle de l'AdoMet sur le carbone 5 de la cytosine. L'apparition de la méthylation sur la cytosine perturbe sa liaison covalente avec la méthylase et ce qui induit le départ de l'enzyme (Klimasauskas et al. 1994).

Il existe 3 enzymes appartenant à la famille des DNMT qui méthylent les cytosines : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b. DNMT3a et DNMT3b participent à la formation de nouveaux sites de méthylation tandis que DNMT1 participe au maintien de la méthylation au cours de la réplication (Moore, Le, et Fan 2013). DNMT1 est exprimée de manière ubiquitaire et est la plus abondante dans les tissus de mammifères tandis que DNMT3a et DNMT3b sont exprimées de manière tissu-spécifique et dépendante du stade de développement de l'organisme (Frauer et al. 2011).

Les protéines DNMT sont constituées d'un domaine de régulation en partie N-terminale et d'un domaine catalytique en région C-terminale. Plus précisément,

DNMT1 est constituée d'un domaine RFTS (replication foci-targeting sequence), d'un domaine en doigt de zinc ZF-CXXC de type 1, de deux domaines BAH (bromo-adjacent homology) et du domaine catalytique en région C-terminale (Fig10. A) (H. K. Long, Blackledge, et Klose 2013; Song et al. 2011). Au cours de la réplication, DNMT1 s'associe à PCNA, protéine faisant partie de la machinerie de réplication, via son domaine RFTS au niveau des fourches de réplication et méthyle le brin nouvellement synthétisé au niveau des CpG hémiméthylés (H. K. Long, Blackledge, et Klose 2013; Schermelleh et al. 2007). L'hémiméthylation est la conséquence du processus de réplication de l'ADN, le brin parent étant méthylé tandis que le brin néosynthétisé complémentaire se trouve non méthylé. Par son activité, la protéine DNMT1 permet de transmettre l'état de méthylation au niveau des CpG néo-répliqués. L'activité de DNMT1 est facilitée par la protéine Uhrf1. Cette dernière est en effet essentielle pour cibler DNMT1 au niveau des CpG hémiméthylés (Xiaoli Liu et al. 2013). De manière générale, les domaines CXXC permettent de cibler des protéines aux niveaux de régions enrichies en CpG non méthylés. Le rôle du domaine ZF-CXXC de DNMT1 dans la reconnaissance des CpG hémiméthylés reste à décrire mais il est possible que cette séquence en doigt de zinc limite l'activité catalytique de DNMT1 (H. K. Long, Blackledge, et Klose 2013). En effet, lorsque DNMT1 s'associe à un CpG non-méthylé par son domaine ZF-CXXC, le domaine catalytique est maintenu éloigné de l'ADN via une boucle polypeptidique acide (domaine autoinhibiteur) présente entre le domaine ZF-CXXC et le domaine BAH1 (Fig10. B et C). En revanche, lorsque DNMT1 s'associe à un site hémiméthylé, le domaine ZF-CXXC ne peut se lier au CpG hémiméthylé, permettant au site catalytique d'accéder à la cytosine (Song et al. 2011).

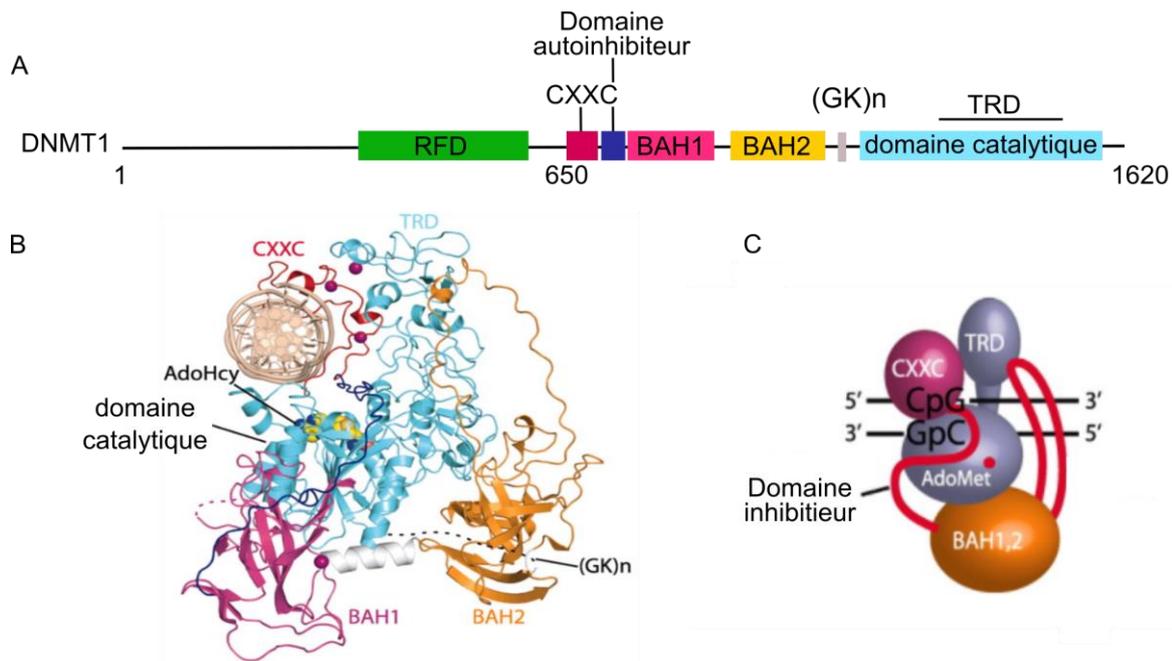


Illustration 10. Organisation des domaines protéiques de DNMT1. A) Représentation des domaines de DNMT1. B) Structure de la protéine DNMT1 (650-1602 aa) associée à une molécule d'ADN (beige) contenant deux CpG non méthylés en présence de S-adenosyl homocysteine (AdoHcy). C) Schéma représentatif de la méthyltransférase associée à une molécule d'ADN contenant des CpG en présence du substrat AdoMet. Les cytosines non méthylées sont reconnues par le domaine CXXC, le domaine inhibiteur protège l'entrée de l'ADN au sein du domaine catalytique, empêchant la méthylation des CpG (Song et al. 2011).

DNMT3a et DNMT3b sont similaires en termes de structure et de fonction. Ces deux isoformes sont capables de méthyler l'ADN natif et synthétique de manière indifférente au motif d'hémiméthylation contrairement à DNMT1 et sont donc considérées de ce fait comme étant des méthylases « de novo » (Masaki Okano, Xie, et Li 1998). (Aoki et al. 2001). Bien que ces deux méthylases possèdent la même activité enzymatique, les fonctions de DNMT3a et b diffèrent par leur expression qui est tissu-spécifique. Ces deux enzymes sont co-exprimées au sein de l'ectoderme embryonnaire mais, durant le développement embryonnaire, DNMT3a tend à être exprimée de manière ubiquitaire alors que l'expression de DNMT3b se restreint à la partie antérieure du cerveau et les yeux (Aoki et al. 2001; M. Okano et al. 1999).

Une autre enzyme appartient à la famille des DNMT, DNMT3L. Ce variant est tronqué du domaine catalytique et permettrait de stimuler l'activité de DNMT3a et DNMT3b (Ooi et al. 2007).

ii. Effet de 5mC sur la structure de la molécule de l'ADN

La méthylation de la cytosine ne semble pas affecter l'architecture globale de la double hélice d'ADN. En effet, même en présence de 5mC, l'ADN reste organisé en structure de type B de manière similaire à une molécule d'ADN ayant incorporée une cytosine non modifiée (Heinemann et Hahn 1992; Wanunu et al. 2011). Cependant, si la 5mC n'impacte pas ou très peu la conformation globale de la double hélice, elle peut néanmoins modifier certains aspects physico-chimiques de l'ADN.

En effet, par analyse de migration en électrophorèse, la présence de méthylation sur la cytosine induit un retard de migration qui est caractéristique des molécules d'ADN incurvées (Hagerman 1990). Une étude supplémentaire par simulations de dynamique moléculaire (MDS) confirme que la méthylation au sein de CpG entraîne une courbure de l'hélice sans induire de déformation majeure de celle-ci (Derreumaux et al. 2001; Ngo et al. 2016; Pérez et al. 2012).

De plus, à l'inverse des CpG non modifiés qui favorisent la flexibilité de l'ADN, la méthylation de la cytosine dans ce contexte nucléotidique semble réduire cette flexibilité globale (Derreumaux et al. 2001; Ngo et al. 2016; Pérez et al. 2012; Wanunu et al. 2011).

La présence de 5mC au sein d'un dinucléotide CpG modifie également la stabilité du duplex. En effet, la séparation des deux brins d'ADN induite par dénaturation thermique se fait à une température plus élevée lorsque celle-ci contient une 5mC (83,2°C) comparé à la présence d'une cytosine non modifiée (78,4°C) au sein du duplex (Wanunu et al. 2011). Ces données suggèrent que la présence de la méthylation stabilise le duplex.

Bien que la présence d'un groupement méthyle hydrophobe sur la cytosine n'induisse pas d'impact majeur sur la structure globale de la double hélice, celle-ci semble

cependant affecter la stabilité et la flexibilité de l'ADN pouvant entraîner des conséquences sur les niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine.

iii. Effet de la 5mC sur les nucléosomes

Si les effets répertoriés des 5mCpG (CpG méthylé) sur l'architecture de l'ADN semblent mineurs, les caractéristiques physico-chimiques spécifiques des 5mCpG pourraient moduler l'arrangement de la molécule d'ADN autour des nucléosomes.

Les propriétés physico-chimiques de la molécule d'ADN peuvent impacter son association avec les histones lors de la formation du complexe nucléosomal. Il a été démontré par application d'une tension sur l'ADN enroulé autour du nucléosome, que plus l'ADN est flexible, plus son affinité pour la particule cœur du nucléosome est forte (Ngo et al. 2015). Appuyant ce phénomène, la présence de 5mC dans un contexte CpG, qui tend à rigidifier la molécule d'ADN comme décrit précédemment, diminue l'efficacité de formation des nucléosomes *in vitro*. Ces données suggèrent que la présence de meCpG (CpG méthylé), responsable de la rigidité locale de l'ADN, diminue l'affinité de l'ADN pour les octamères d'histones (Pérez et al. 2012). En revanche, une fois formés, les nucléosomes contenant des 5mCpG apparaissent structurellement similaires à ceux dépourvus de méthylation. Une reconstitution de 146 bp (paires de bases) de séquence palindromique α -satellite autour d'un nucléosome possédant 4 CpG a été réalisée et analysée par cristallographie. Par superposition des deux nucléosomes (méthylés et non méthylés), aucune différence majeure n'a pu être observée (Fujii et al. 2016). Ces données ont été confirmées par cristallographie d'un nucléosome contenant une séquence de 160 bp de type satellite 2 avec 7 CpG (Osakabe et al. 2015).

La structure globale du nucléosome ne semble pas être affectée par la présence d'un ou de plusieurs sites de 5meCpG. En revanche, les extrémités de l'ADN enroulant le nucléosome peuvent se trouver plus ou moins associées à celui-ci. Les conséquences de la méthylation de CpG sur la structure des nucléosomes ont été étudiées notamment par analyse de FRET (Fluorescence resonance energy transfer) sur molécule unique en incorporant des fluorophores aux extrémités de la molécule d'ADN enroulant le nucléosome. Dans ce système, la présence de 5mC augmente la

flexibilité des extrémités de l'ADN enroulé autour de l'octamère d'histones (Jimenez-Useche et al. 2013; Ngo et al. 2016). A l'inverse Choy et al., ont rapporté que ces extrémités étaient plus fortement associées entre elles. Ces derniers proposent que la méthylation favorise une compaction de la structure nucléosomale tout comme il a été suggéré par Lee et Lee (Choy et al. 2010; Lee et Lee 2012).

Les effets des 5mCpG sur la structure du nucléosome semblent contradictoires et restent donc à éclaircir. Certains facteurs pourraient être responsables de ces variations telle que la distribution des 5mCpG par rapport au nucléosome. En effet, la méthylation de CpG groupés au centre du nucléosome induit une décompaction de l'ADN autour du nucléosome tandis que l'effet est opposé pour les deux autres constructions où les CpG sont espacés de 10 paires de bases. Il semblerait donc que la localisation des CpG méthylés impacte la conformation du nucléosome (Jimenez-Useche et al. 2013).

Ainsi, si la cristallographie ne fait pas apparaître d'impact de la méthylation des cytosines, il reste possible que les 5mC puissent affecter l'association de l'ADN au nucléosome dans le contexte de séquences particulières.

iv. La localisation des cytosines méthylées : CpG versus CGI

Si 60 à 90% des CpG sont méthylés (A. P. Bird 1986; Shi et al. 2017) au sein du génome humain, la quantité de ce dinucléotide reste faible. La raison invoquée est que la 5mC peut être transformée en thymine par déamination. Ainsi, en absence de réparation, le CpG devient TpG (CpA sur le brin opposé) lors du cycle de réplication suivant (A. P. Bird 1980).

Au sein du génome, des régions enrichies en CpG et protégées de la méthylation ont été répertoriées et appelées îlots CpG (CGi) (A. P. Bird 1986). Les caractéristiques spécifiques de ces îlots sont : une longue séquence (supérieure à 500 paires de bases) riche en CpG, une forte composition en GC (supérieure à 55%) et un ratio CpG observés/attendus au-delà de 0.65. Ces caractéristiques, dont les seuils peuvent être modulés, sont utilisées par des outils bio-informatiques pour identifier *in silico* des CGi au sein du génome. En combinant des données de biologie moléculaire notamment via des systèmes de digestion par des enzymes de

restriction et des outils *in silico*, la distribution des CGI a pu être caractérisée. Les CGI ne sont pas répartis aléatoirement dans le génome, ils sont présents majoritairement en position 5' de gènes, couvrant le promoteur, le TSS, le premier exon et intron (Ramirez-Carrozzi et al. 2009; Saxonov, Berg, et Brutlag 2006; Sharif et al. 2010; Tazi et Bird 1990). Environ 70% des promoteurs contiennent des CGI. Ces derniers sont particulièrement présents au sein de régions régulatrices de gènes de ménage. La présence de CGI est associée à une expression ubiquitaire des gènes tandis que les promoteurs non CGI sont impliqués dans l'expression tissu-spécifique (Saxonov, Berg, et Brutlag 2006).

Aujourd'hui, il reste difficile de comprendre l'origine des CGI (Sharif et al. 2010). Certains suggèrent que la présence de CGI serait plutôt une conséquence de leur état hypométhylé, les CpG méthylés ayant tendance à disparaître par déamination (Saxonov, Berg, et Brutlag 2006). De plus, il est également possible que les 5mCpG aient subi une sélection positive au cours de l'évolution, permettant le recours à la méthylation comme outil de régulation de la transcription (Saxonov, Berg, et Brutlag 2006; Sharif et al. 2010).

Différentes hypothèses ont été émises concernant l'absence de méthylation au sein des CGI. Certains auteurs supposent que celle-ci pourrait être due à la séquence elle-même, qui serait non propice à la méthylation « de novo » (Illingworth et Bird 2009). En insérant le chromosome 21 humain chez la souris, Long et al ont identifié que, dans les testicules et dans le foie, la majorité des régions hypométhylées observées chez l'homme sur le chromosome 21 le sont aussi dans le modèle de souris transchromosomique. Ces données suggèrent que la séquence nucléotidique est suffisante pour maintenir un état hypométhylé au niveau des régions CGI et constitue une empreinte invariante au regard du niveau de méthylation (H. K. Long et al. 2016). Cependant, des régions hypométhylées chez l'humain deviennent méthylées (et sont donc perdues) ou inversement (gagnées) dans le modèle souris, suggérant que le niveau de méthylation de ces régions est régulé de manière espèce-spécifique.

La séquence ne semble pas être l'unique moyen de garder les CGI protégés de la méthylation. En effet, les CGI constituent le substrat des DNMT (notamment via le

domaine CXXC) et, dans certains cas, les CGi se trouvent hyperméthylés. Une deuxième hypothèse implique qu'en cas de méthylation par les DNMT, les CGi pourraient être rapidement déméthylés (Illingworth et Bird 2009; Macleod et al. 1994), un processus vraisemblablement dépendant des enzymes Ten-eleven translocation (TET).

Enfin une troisième hypothèse suggère que certains facteurs de transcription protégeraient les CGi d'une association aux DNMT par un phénomène d'encombrement stérique (A. P. Bird 1986; Illingworth et Bird 2009; Macleod et al. 1994). En accord avec cette hypothèse, la mutation du site de liaison du facteur de transcription Sp1 au sein d'un CGi, inhibe la liaison de Sp1 et favorise la méthylation du CGi (Macleod et al. 1994). Cependant les CGi constituent des régions génomiques relativement étendues dont il est difficile d'expliquer l'absence de méthylation simplement par des phénomènes d'encombrement stérique.

Certaines modifications présentes sur la partie N-terminale des histones telles que la méthylation d'H3K4 trouvée enrichie au sein des CGI, pourraient réguler l'activité du complexe DNMT3a,b/DNMT3L. En effet, DNMT3L est recrutée via son domaine PHD sur H3K4me0, favorisant la méthylation de ces régions par DNMT3a,b. Au contraire, la méthylation de H3K4 inhibe la liaison de DNMT3L, diminuant de ce fait les niveaux de méthylation « de novo » par DNMT3a,b (J.-L. Hu et al. 2009; Ooi et al. 2007).

Il est ainsi probable qu'un ensemble de mécanismes soit responsable de l'apparente non-méthylation des CGi.

v. Les protéines de liaison « readers » de la 5mC

La 5mC peut être reconnue par des protéines spécifiques appelées « readers » ayant la capacité de réguler l'organisation de la chromatine.

Il existe plusieurs protéines qui se lient de manière spécifique à la 5mC (Spruijt et al. 2013). Celles-ci présentent des domaines de reconnaissance de cette marque appartenant à différentes familles comme les MBD (methylation binding domain) ou les domaines en doigt de zinc.

La première famille de protéine identifiée comme liant la 5mC est celle caractérisée par la présence de domaines de type MBD (A. Bird et Macleod 2004). Cinq membres de cette famille possèdent la capacité d'interagir avec cette base modifiée : MeCP2, Mbd1, Mbd2, Mbd3 et Mbd4. Parmi ces protéines, Mbd4 (Methyl-CpG-binding domain protein 4) est impliquée dans la réparation des mésappariements G:T et G:U qui sont les produits de déamination respectifs de la cytosine méthylée ou non modifiée dans un contexte CpG (Hendrich et al. 1999). Les autres protéines appartenant à cette famille sont quant à elles associées à la répression de la transcription. Mbd1 est constituée de plusieurs domaines, en particulier d'un domaine MBD en N-terminal et d'un domaine TRD (transcriptional repressor domain) en C-terminal. Cette protéine est trouvée enrichie au niveau de répétitions satellites, riches en 5meCpG et qui sont localisées au sein de foci hétérochromatiniens. Cet enrichissement de Mbd1 au niveau de ces régions réprimées est médié par la liaison du domaine MBD de la protéine à la 5mC (Jørgensen, Ben-Porath, et Bird 2004). En plus de sa liaison aux 5meCpG, le domaine TRD de Mbd1 interagit avec le régulateur transcriptionnel MCAF afin de former un complexe répresseur de la transcription (Fujita et al. 2003). La répression de l'expression génique médiée par la liaison de MeCP2 à la 5mC implique le recrutement, via son domaine TRD, du complexe déacétylase Sin3A (Nan et al. 1998). Mbd2 appartient quant à elle au complexe MeCP1 (Ng et al. 1999) qui comprend le complexe répresseur NuRD (Q. Feng et Zhang 2001). La présence d'enzymes histones deacetylases (HDAC) au sein de ces complexes induit localement une hypoacétylation des histones et participe à la répression de la transcription (Q. Feng et Zhang 2001; Nan et al. 1998; Ng et al. 1999). En plus du recrutement de protéines de liaisons spécifiques de la 5mC, la méthyltransférase de maintien DNMT1 interagit elle-même avec des HDACs afin de former un complexe répresseur de la transcription (Robertson et al. 2000; Rountree, Bachman, et Baylin 2000).

D'autres protéines qui ne comportent pas de MBD, interagissent également avec la 5mC. C'est notamment le cas de Kaiso. Kaiso est une protéine qui interagit avec la 5mC via son domaine en doigt de zinc de manière préférentielle selon la séquence 5' mCGmCG 3' (Prokhortchouk 2001) et recrute son partenaire le complexe répresseur

N-CoR. Kaiso réprime la transcription de manière dépendante de l'activité de l'histone déacétylase HDAC3 qui appartient au complexe N-CoR (Yoon et al. 2003).

La protéine Uhrf1 contient 5 domaines principaux dont le domaine SRA qui permet l'association de Uhrf1 aux CpG hémiméthylés, et le domaine Tudor qui favorise la liaison de Uhrf1 aux régions enrichies en H3K9me2/3 (Xiaoli Liu et al. 2013). Cette double association à la chromatine est importante pour le recrutement de la méthyltransférase DNMT1 au niveau des sites hémiméthylés lors de la replication et le maintien des niveaux de méthylation. En plus de l'interaction de Uhrf1 avec H3K9me2/3, DNMT1 s'associe avec l'histone méthyltransférase G9a impliquée dans le dépôt de groupements méthyl sur H3K9. Cette interaction permet aux deux enzymes une stimulation croisée de leurs activités respectives, renforçant le lien entre la marque répressive H3K9me2/3 et la méthylation de l'ADN (Estève et al. 2006).

En recrutant des protéines de liaison, la 5mC participe à la modulation de l'organisation de la chromatine. Ainsi, la cytosine méthylée se trouve associée à une hypoacétylation et un enrichissement de H3K9me2/3, qui, ensemble, forment un environnement chromatinien non favorable à l'expression génique.

vi. Les marques d'histones associées aux régions CGi

Si les CpG méthylés isolés sont associés à un état répressif de la transcription, les CGi présentent en revanche un état chromatinien différent.

Au niveau des CGi localisés au promoteur, des analyses par ChIP révèlent une déplétion en histones H1 et H3 comparé aux promoteurs non CGi (Ramirez-Carrozzi et al. 2009; Tazi et Bird 1990; Thomson et al. 2010). Malgré un plus faible niveau en histone H3, les CGi aux promoteurs sont enrichis en H3K9ac, H3K14ac et H3K4me3. L'enrichissement en H3K4me3 est vraisemblablement médié par la protéine Cfp1, composant du complexe H3K4 méthyltransférase Setd1, permettant l'identification de promoteurs CGi actifs (Illustration 11) (H. K. Long et al. 2016). Ces spécificités de la chromatine des CGi peuvent contribuer à favoriser l'activation des promoteurs. De plus, les séquences des CGi semblent empêcher l'incorporation de nucléosomes, un

processus probablement lié aux propriétés intrinsèques des séquences riches en CpG (Fenouil et al. 2012).

Une autre caractéristique des CGi correspond à l'absence de la marque épigénétique H3K36me2 (Illustration 11). Kdm2a, protéine ayant un domaine ZF-CXXC et une activité histone déméthylase, reconnaît préférentiellement les îlots CpG qu'ils soient présents ou non au niveau d'un promoteur, et participe à la déméthylation de H3K36. Cette marque d'histone apparaît non corrélée à l'activation ou la répression de la transcription. Par conséquent, la déméthylation de H3K36 serait une signature des CGi indépendante de l'état transcriptionnel (Blackledge et al. 2010).

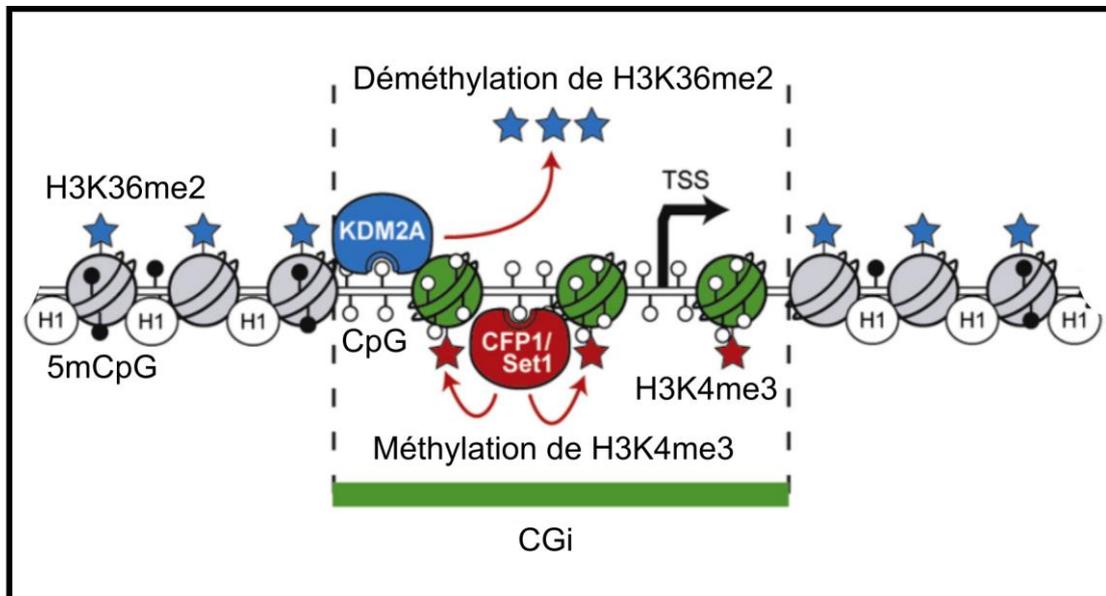


Illustration 11 Les régions CGi sont appauvries en H3K36me2 et enrichies en H3K4me3 (Blackledge et al. 2010).

Ainsi, les CGi non méthylés sont associés à différentes marques d'histones positives vis-à-vis de la transcription tandis que leur méthylation induit un environnement chromatinien non favorable à ce processus. Il existe ainsi une interdépendance forte entre modifications de l'ADN et marques d'histones, celle-ci étant finement régulée via le recrutement de modificateurs et de remodeleurs de la chromatine.

vii. Les rôles biologiques de la 5mC

La méthylation des cytosines participe à la régulation de plusieurs processus tels que le développement (M. Okano et al. 1999), la tumorigénèse (Toyota et al. 1999; L. Wu et al. 2016), la pluripotence, la répression des éléments rétroviraux et des séquences répétées (Walsh et Bestor 1999), l'inactivation du chromosome X et l'empreinte parentale (Moore, Le, et Fan 2013). Tous ces processus sont contrôlés par la régulation de l'expression génique de gènes cibles via la modulation du niveau de méthylation des CpG et CGi. Les 5mCpG peuvent réguler la transcription de gènes cibles de manière directe, via l'inhibition de la liaison d'effecteurs de la transcription (Iguchi-Arigo et Schaffner 1989; Watt et Molloy 1988), ou indirecte, par la modulation de l'environnement chromatinien.

a. Le rôle de la 5mC dans l'empreinte génomique

L'empreinte génomique correspond à une expression préférentielle d'un allèle parental autosomal. Cette expression dépendante de l'origine du gène (maternelle ou paternelle) est contrôlée par le niveau de méthylation au sein de CGi. Plus d'une centaine de gènes régulés par ce processus ont été caractérisés chez la souris. Parmi les plus connus, le gène H19 et Igf2 sont soumis à l'empreinte parentale au sein du chromosome 7 chez la souris. Le gène Igf2 est impliqué dans la croissance du fœtus et la régulation de la taille du placenta. Le gène H19, qui est situé en aval du gène Igf2, est transcrit en ARN de 2,3kb mais ne code pas pour une protéine. Ces deux gènes sont exprimés de manières différentielles selon l'origine parentale de l'allèle. H19 se trouve réprimé sur l'allèle paternel et exprimé sur l'allèle maternel. A l'inverse, le gène Igf2 est exprimé sur l'allèle paternel et réprimé sur l'allèle maternel.

La répression de H19 sur l'allèle paternel est associée à une forte méthylation de l'ilôt CGi en 5' correspondant au promoteur du gène et à une compaction de la chromatine (Ferguson-Smith et al. 1993). La mutation de la méthyltransférase DNMT1, induisant une altération de la méthylation du CGi de H19 entraîne son expression et de ce fait la perte de l'empreinte parentale. L'absence de méthylation au sein de cette région est associée au syndrome Russel-Sylver (Netchine et al. 2007). Les patients atteints de ce syndrome présentent des retards de croissance et

des anomalies morphologiques. La méthylation est donc nécessaire pour maintenir l'expression spécifique des allèles des gènes soumis à l'empreinte (Li, Beard, et Jaenisch 1993). En revanche, le gène *Igf2* ne semble pas répondre de manière similaire aux gènes soumis à l'empreinte au regard du niveau de méthylation des CGI (Sasaki et al. 1992). Leighton et al ont décrit un modèle dans lequel les gènes *H19* et *Igf2* seraient en compétition pour les deux régions régulatrices distales situées à 9 et à 11kb en 3' du TSS du gène *H19* (Leighton et al. 1995). En combinant les informations sur le niveau de méthylation, l'état chromatinien et des facteurs impliqués dans la régulation de l'empreinte parentale des deux gènes, un modèle a pu être établi. Sur l'allèle maternel, la région ICR1, localisée entre le gène *Igf2* et *H19*, se trouve déméthylée, permettant la liaison de l'isolateur CTCF sur ICR1, les régions régulatrices vont donc interagir avec le promoteur du gène *H19* et engager sa transcription (Illustration 12. A). En revanche sur l'allèle paternel, ICR1 se trouve méthylée, empêchant l'interaction de CTCF avec ce locus. L'absence de CTCF entre les deux gènes permet l'interaction des éléments de régulations géniques avec le promoteur de *Igf2*, ce qui induit sa transcription (Illustration 12.B) (Nordin et al. 2014).

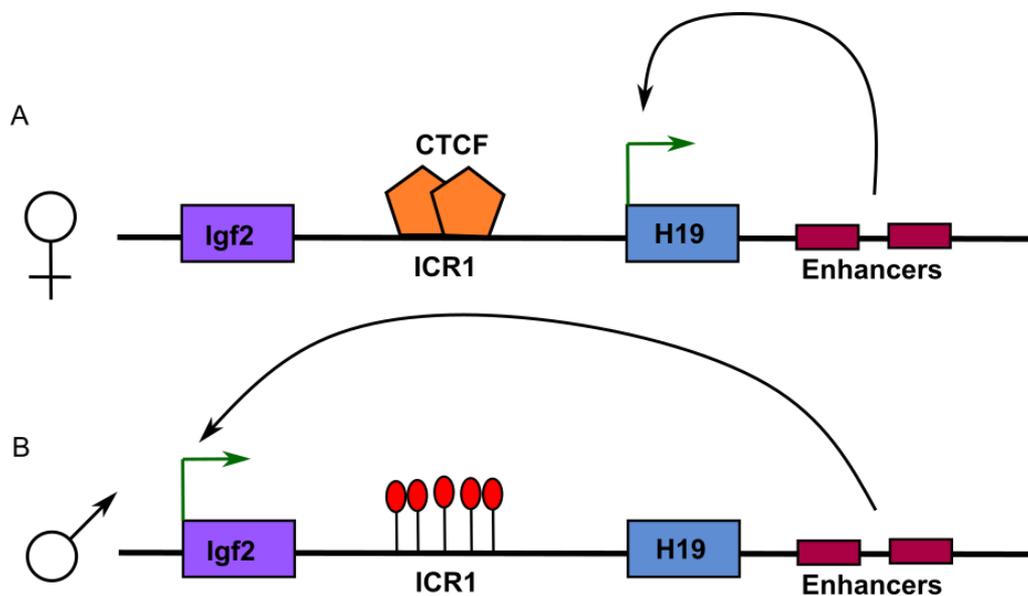


Illustration 12. Les gènes soumis à l'empreinte parentale sont dépendants du niveau de méthylation. A) Sur l'allèle maternel, l'absence de méthylation favorise la liaison de CTCF au niveau de ICR1. *H19* est exprimé au détriment de *Igf2*. B) En revanche, la présence de méthylation au sein de l'ICR1 permet la transcription de *Igf2* via l'interaction des deux « enhancers » au promoteur de ce gène au détriment de l'expression de *H19* sur l'allèle paternel.

b. La 5mC et l'inactivation du chromosome X

Chez les mammifères et certains invertébrés, les cellules somatiques du sexe féminin contiennent 2 chromosomes X tandis que chez les mâles il n'a qu'un chromosome X et un chromosome Y. Chez les mammifères, l'inactivation du chromosome X consiste à éteindre l'un des deux chromosomes X afin d'atteindre le même niveau d'expression de gènes liés au chromosome X chez la femelle et chez le mâle. D'autres espèces compensent l'expression des gènes localisés sur le chromosome X d'une manière différente que chez les mammifères. Par exemple chez la drosophile, le chromosome X chez le mâle se trouve deux fois plus exprimé tandis que chez *C. elegans*, les deux chromosomes X chez l'hermaphrodite ont leur taux de transcription diminué (Jaffe et Laird 1986; Sharma et Meister 2015). L'inactivation du chromosome X, chez les mammifères, est mise en place au stade embryonnaire et se fait de manière indifférente de l'origine de celui-ci, qu'il soit issu du côté paternel ou maternel. Cependant une fois établie, l'inactivation du chromosome X reste stable au cours du développement de l'individu. Ce processus de répression génique est maintenu au cours des divisions cellulaires et est retrouvé dans les tissus somatiques (Yen et al. 1984). Ce phénomène est médié par la région Xq13 chez l'humain. Cette région chromosomique contient un locus Xic (pour X inactivation center). Celui-ci a été décrit comme étant le senseur du nombre de chromosome X et médiateur de l'inactivation par diffusion en cis (Avner et Heard 2001). Xist (X-inactive-specific-transcript) est un gène localisé au sein du locus Xic (Kay et al. 1993). Il est exclusivement exprimé par le chromosome X inactivé et apparaît également important pour l'inactivation du chromosome X (Herzing et al. 1997). D'autres éléments génomiques, X-chromosome-controlling element (Xce), TsiX et DXPas34 ont également été décrit comme régulant l'inactivation du chromosome X au sein du locus Xic (Avner et Heard 2001).

L'inactivation du chromosome X est caractérisée par une hétérochromatisation induite par la combinaison d'une hypoacétylation des histones et la méthylation des CGi. Ensemble, Xist, l'hyperméthylation de l'ADN et la déplétion de groupements acétyle sur les histones agissent de manière synergique sur l'inactivation du chromosome X (Csankovszki, Nagy, et Jaenisch 2001). Lors de ce processus, la méthylation et l'état hypoacétylé de la chromatine seraient des événements

intervenant après la répression génique et participeraient donc au maintien de l'inactivation du chromosome X. L'importance de la méthylation des CGi dans le processus de répression des gènes localisés sur le chromosome X a notamment été démontré à travers des traitements par de l'azacitidine, un inhibiteur des DNMT. L'absence d'hyperméthylation au sein des CGi due à la présence d'azacitidine, entraîne la réactivation de certains gènes du chromosome X (Mohandas, Sparkes, et Shapiro 1981; Yen et al. 1984). De plus, un statut hypométhylé du chromosome X peut être associé à l'apparition de maladie. L'ICF (immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies) est une maladie autosomale récessive rare. Ce syndrome est caractérisé par une immunodéficiences, une instabilité au niveau des centromères et des anomalies faciales. Chez trois patients, le chromosome X inactivé se trouve pauvrement méthylé de manière générale comparé au niveau normalement trouvé chez des individus sains. Un des malades sur les trois dans cette étude montre une absence de méthylation pour l'ensemble des CGi étudiés, suggérant que la déméthylation des CGi n'est pas un phénomène systématique chez les patients mais que l'hypométhylation du chromosome X est une caractéristique de ce syndrome (Bourc'his et al. 1999). L'absence générale de méthylation de l'ADN sur le chromosome X semble être le résultat d'une altération d'une DNMT. En effet, chez trois autres patients atteints de cette maladie, la méthylase de novo DNMT3b a été trouvée mutée près du domaine catalytique (R. S. Hansen et al. 1999). L'impact des mutations de DNMT3b sur le niveau de méthylation des cytosines ne se restreint pas uniquement au chromosome X. En effet, chez deux patients ICF, de nombreuses régions intragéniques se trouvent hypométhylées au sein de leur génome. Dans ce contexte, l'absence de 5mC dans un contexte CGi peut affecter la transcription d'isoformes protéiques dont le TSS se trouve au sein de corps de gène (Gatto et al. 2017).

Ainsi, la méthylation au sein des CGi est un événement important pour l'inactivation du chromosome X et la régulation d'expression de variants protéiques menant au développement correct de l'individu.

viii. Les voies de déméthylation

Tout comme l'ajout du groupement méthyle est contrôlé par des enzymes spécifiques, le clivage de celui-ci peut être assuré par des déméthylases (Bhattacharya et al. 1999). De manière intéressante, il a notamment été reporté que les méthylases DNMT1, DNMT3a et DNMT3b, peuvent également déméthylater la 5mC dans certaines conditions (C.-C. Chen, Wang, et Shen 2013). Cependant très peu d'articles ont décrit le fonctionnement et l'identification de telles déméthylases. Il apparaît que les cytosines méthylées sont principalement déméthylées via deux voies, une voie passive et une voie active (Bhutani, Burns, et Blau 2011).

a. La voie passive

La déméthylation des cytosines peut s'effectuer de façon passive au travers de cycles de réplication successifs. Au cours d'un de ces cycles, une cytosine non modifiée est incorporée au sein du brin néosynthétisé. L'absence de maintien de la méthylation sur le nouveau brin par une déficience en DNMT1 peut entraîner, à chaque phase S, une perte progressive de cette marque. Après fécondation et durant les premiers stades embryonnaires, la méthylation présente dans le génome des gamètes est progressivement effacée pour permettre la totipotence des cellules embryonnaires. Une analyse en immunofluorescence montre que le niveau global de 5mC diminue graduellement au cours du développement du zygote, du stade une cellule jusqu'au stade 8 cellules (Rougier et al. 1998). Cet effet est le résultat d'une diminution de l'activité des DNMT dans les cellules, suggérant qu'au cours des cycles de réplication et de division la méthylation de l'ADN zygotique n'est pas maintenue (Monk, Adams, et Rinaldi 1991). Cependant une autre étude suggère que la déméthylation durant ces stades zygotiques n'est pas seulement le fait de la voie passive mais implique aussi un processus actif permettant de supprimer les méthylations non enlevées par voie passive et de limiter la re-méthylation des sites hémiméthylés par DNMT1 (F. Guo et al. 2014).

b. La voie active

La voie active constitue le phénomène par lequel la cytosine méthylée est remplacée par une cytosine non-méthylée via l'intervention d'enzymes spécifiques.

Contrairement à la voie passive, la perte de cytosines méthylées médiée par la voie active n'est pas dépendante des cycles de réplication. Plusieurs protéines ont été caractérisées comme étant impliquées dans ce phénomène.

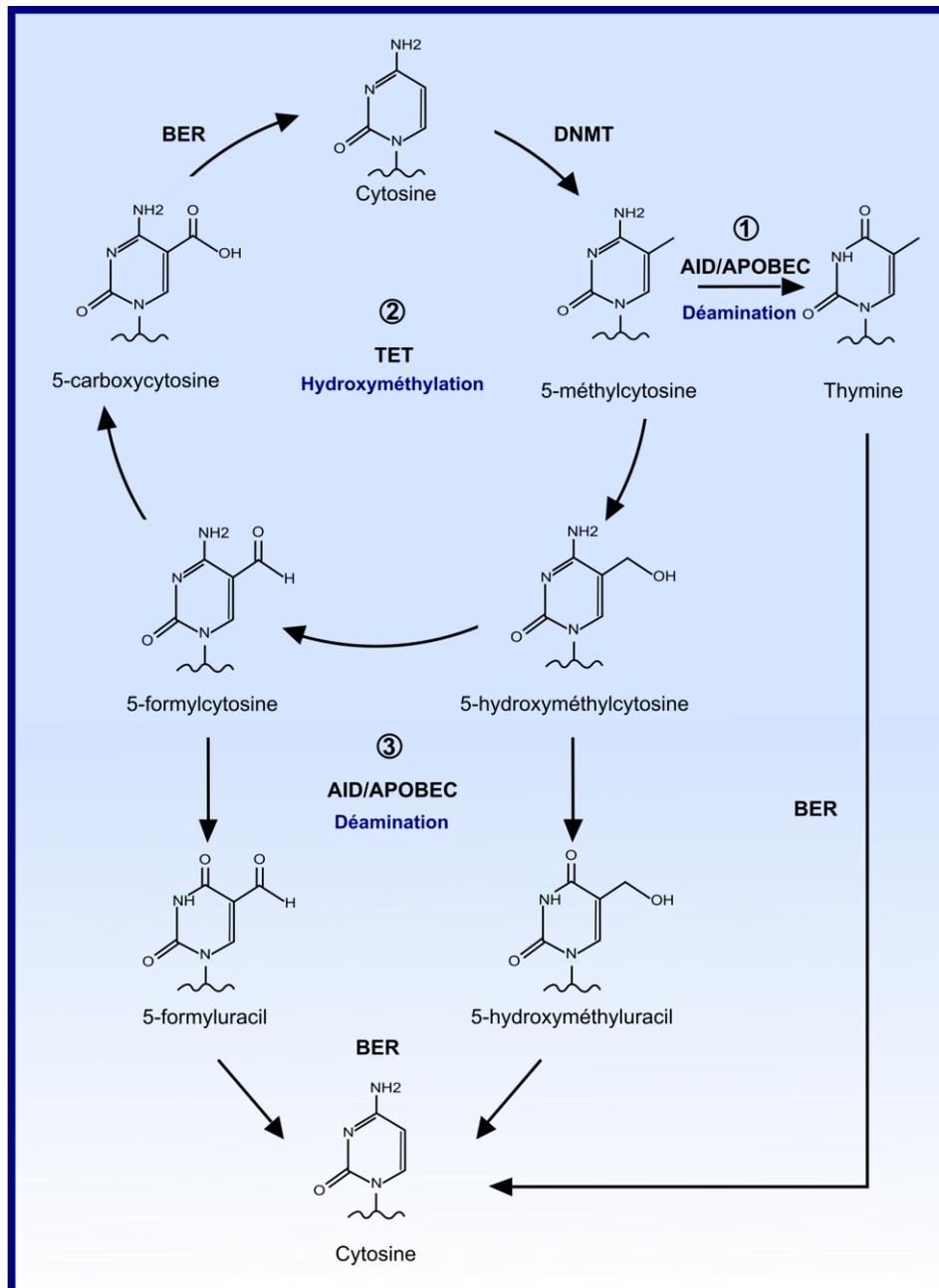


Illustration 13. Représentation des voies de la déméthylation active. La cytosine méthylée par les DNMT est 1) déaminée par l'action des enzymes AID/APOBEC ou 2) oxydée par les enzymes TET en 5-hydroxyméthylcytosine, en 5-formylcytosine puis en 5-carboxycytosine. Les deux derniers dérivés oxydés sont réparés par excision de base en une cytosine non modifiée ou 3) la 5-hydroxyméthylcytosine et la 5-formylcytosine sont déaminées par le système AID/APOBEC. Les produits de déamination 1) et 3) sont ensuite réparés par excision de base (BER).

1. La déamination de la méthylcytosine

La première voie de déméthylation active implique les protéines AID (activation induced deaminase), qui agissent dans la recombinaison des immunoglobulines dans les cellules immunitaires B, et celles de la famille APOBEC (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide) (Conticello et al. 2007). Ces deux enzymes participent à la fois à la déamination de la cytosine en uracile et à celle de la cytosine méthylée en thymine (Illustration 13, cas n°1). Leur activité est dépendante du contexte de séquence nucléotidique. La protéine AID déamine préférentiellement les séquences WRC (A/T, A/G, C) (Morgan et al. 2004). APOBEC3G, un des sept paralogues de APOBEC3, est efficace dans la déamination de la cytosine non modifiée mais ne semble en revanche pas pouvoir déaminer la cytosine méthylée dans le contexte nucléotidique suivant TCCCG (Wijesinghe et Bhagwat 2012). Par ailleurs, Il apparaît qu'APOBECA3A est plus efficace dans la déamination de 5mC que AID (Wijesinghe et Bhagwat 2012). Tout comme certains paralogues de APOBEC3, APOBEC1 est également capable de déaminer 5mC *in vitro* (Morgan et al. 2004). Ainsi les protéines AID/APOBEC participent à la déméthylation de la cytosine via leurs activités de déamination.

Les mésappariements issus de la déamination de la cytosine ou de sa forme méthylée par AID/APOBEC à savoir G:U ou G:T respectivement sont reconnus par des enzymes DNA glycosylases telles que Mbd4 (Hendrich et al. 1999) et la TDG. Ces dernières sont impliquées dans la voie de réparation par excision de base (BER). La thymine DNA glycosylase (TDG) appartient à la famille des Uracil DNA glycosylases et en particulier la sous-famille des MUG (Mismatch-specific uracil glycosylase). La TDG initie la réparation des mésappariements T:G ou U:G via l'hydrolyse de la base non conforme à la séquence du duplex au niveau du sucre (Cortellino et al. 2011; Hardeland 2003). Il en résulte la création d'un site abasique qui sera par la suite réparé par le système BER. Il a par ailleurs été décrit qu'un homologue de la TDG chez le poulet était également capable d'exciser directement la 5mC (B. Zhu et al. 2000). Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres laboratoires.

2. L'hydroxylation de la méthylcytosine

En plus de la déamination de 5mC, cette marque peut également subir des cycles d'oxydation au niveau du carbone 5 (correspondant à la présence du groupement méthyle) par les enzymes dioxygénases TET. Brièvement, la 5-méthylcytosine peut être oxydée successivement en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), en 5-formylcytosine (5fC) puis en 5-carboxylcytosine (5caC), par les protéines TET de manière dépendante de la présence des cofacteurs Fe(II) et 2-oxoglutarate (Illustration 13, cas n°2). En plus de la réparation des dérivés déaminés de la 5mC, la TDG reconnaît les deux dernières formes oxydées de la cytosine méthylée, issues de l'activité des TET. La glycosylase forme des liaisons similaires avec 5fC et 5CaC qui diffèrent uniquement par la présence d'une interaction supplémentaire entre une asparagine (Asn191) et la 5caC (Pidugu et al. 2016). Via son activité glycosylase, la TDG clive la liaison N-glycosidique présente entre la base nucléique et le sucre, générant un site abasique qui sera ensuite réparé par une déoxycytidine non modifiée via la voie du BER (Weber et al. 2016). La TDG reconnaît et excise la liaison glycosidique spécifiquement de 5fC et de 5caC dans un contexte CpG, mais ne cible pas celle de la 5hmC (He et al. 2011; Maiti et Drohat 2011). La déplétion de cette glycosylase induit une augmentation globale du niveau de 5fC et 5caC sans faire varier le taux de 5hmC ni celui de 5mC (Shen et al. 2013). L'absence de TDG dans les mESCs (cellules souches embryonnaires de souris) induit un enrichissement local de 5fC et 5caC au sein de promoteurs inactifs et associés à une faible expression génique ainsi qu'au niveau des enhancers (Shen et al. 2013). Ces données suggèrent qu'au niveau de ce type de régions régulatrices inactives s'effectue une déméthylation via l'activité combinée des protéines TET et de la TDG. Ces deux enzymes participeraient ensemble à la régulation de la transcription en ciblant les régions génomiques à démétyler (Shen et al. 2013). Récemment un nouveau mécanisme de déméthylation, autre que la voie médiée par le système TDG-BER, a été caractérisé. Alors que le système BER est impliqué pour deux tiers dans la restauration d'une cytosine non modifiée à partir de 5caC, un tiers serait le résultat de la décarboxylation (Y. Feng et al. 2020). Ce phénomène est réalisé par l'activité enzymatique d'une (ou des) protéine(s) qui reste(nt) à aujourd'hui encore non identifiée(s). De la même manière, une déformylation se ferait via le clivage de la

liaison établie entre le carbone 5 de la cytosine et l'atome de carbone du groupement formyle de la 5fC, via une activité enzymatique dont la protéine reste également non caractérisée (Iwan et al. 2018).

c. La combinaison de la voie de d'oxydation et de déamination

L'effacement de la 5mC au sein du génome peut également être le résultat d'une action combinée des TET et de AID/APOBEC.

En effet, tout comme la 5mC, la 5hmC peut être déaminée via l'activité catalytique de AID/APOBEC (Illustration 13, cas n°3). Il en résulte la formation d'un mésappariement de la 5-hydroxyméthyluracile avec une guanine (J. U. Guo et al. 2011). Après reconnaissance de ce site, la glycosylase TDG va exciser la 5-hydroxyméthyluracile, laissant apparaître un site abasique qui sera ensuite réparé par la voie du BER (Hashimoto et al. 2012).

En résumé, la déméthylation de 5mC peut se faire de manière passive, via sa dilution au cours des cycles de division et de réplication cellulaire mais aussi via l'intervention de plusieurs enzymes impliquées dans les processus de déamination, d'oxydation et de réparation.

III. Les protéines Ten-eleven translocation

Les patients atteints de leucémies myéloïdes présentent des anomalies chromosomiques. Parmi celles-ci, on retrouve une translocation t(10 ;11)(q22 ;q23) au niveau du gène Mixed lineage leukemia (MLL). C'est en analysant le gène transloqué au niveau du chromosome 10 que la protéine Ten-eleven translocation 1 (TET1) a pu être identifiée. Une fusion du gène de l'histone méthyltransférase MLL avec le gène TET1 est une des caractéristiques apparente chez les sujets malades. Par alignement de séquences, deux autres membres de la famille TET, TET2 et TET3 ont pu être caractérisés (Lorsbach et al. 2003). Ces trois protéines dioxygénases possèdent la même activité catalytique oxydant successivement la 5mC en 5hmC, en 5fC puis en 5caC, de manière dépendante de cofacteurs, le fer (Fe(II)) et le 2-oxoglutarate.

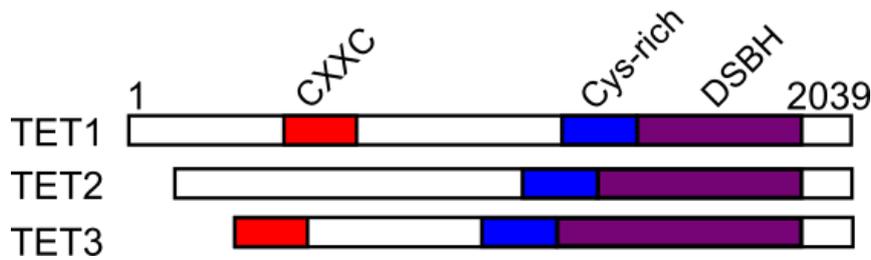


Illustration 14. Représentation des domaines protéiques de TET1, TET2 et TET3. En région N-terminale, TET1 et TET3 possèdent un domaine en doigt de zinc CXXC. Les trois membres de la famille TET ont un domaine d'activité catalytique en partie C-terminale, comprenant une région riche en cystéine « Cys-rich » et une région structurale DSBH.

A. La structure des protéines TET

La famille des J-binding protein (JBP) constitue une famille de dioxygénases qui hydroxyle la thymine en 5-hydroxyméthyluracil chez le parasite trypanosomes. Une étude d'homologie de séquence et de structure révèle que les caractéristiques de la région catalytique des JBP sont également présentes chez les TET. Le domaine enzymatique des TET se situe en partie C-terminale et est constitué d'une région conservée riche en cystéines suivie d'une structure secondaire formée d'une hélice précédant plusieurs feuillets β , appelée β hélice double brin (DSBH) (Illustration 14). Ces structures associées aux co-facteurs le fer (Fe(II)) et le 2-oxoglutarate, sont responsables de l'hydroxylation des cytosines modifiées (Tahiliani et al. 2009).

Une analyse par cristallographie a révélé que le domaine actif de la protéine TET2 s'organise en structure globulaire et s'associe à l'ADN via des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes. Ces liaisons entre les acides aminés et l'ADN sont principalement situés aux niveaux des phosphates des acides nucléiques. TET2 ne semble pas avoir de sélectivité de séquence en dehors de celle du dinucléotide 5mCpG. En effet, TET2 interagit avec le G qui suit la cytosine méthylée (5mC) via l'acide aminé tyrosine (Y1291), révélant sa spécificité d'association et d'affinité pour les contextes CpG aux dérivés des sites 5mCpA et 5mCpC (L. Hu et al. 2013). La partie C-terminale de TET2, responsable de l'activité catalytique, comprend le domaine riche en cystéine qui entoure la région DSHB constituée principalement de

feuillets beta. A l'intérieur de cette cavité catalytique se trouvent associés les cofacteurs Fe (II) et l'analogue de l'alpha kétoglutarate, NOG (Illustration 15). L'étude du complexe formé entre TET2 et le duplex a révélé que la 5mC, présente dans la cavité catalytique, se trouve expulsée de la double hélice (Illustration15). Le groupement méthyl apparaît dirigé vers l'ion Fe(II) et NOG, qui sont localisés au centre du domaine catalytique. Si la 5mC est reconnue par deux acides aminés, une histidine (H1904) et une asparagine (N1387) (Illustration 15) et se trouve stabilisée par une tyrosine (Y1902), il n'y a cependant aucune interaction entre le groupement méthyle et la protéine. L'absence d'association entre le groupement méthyle et TET2 permettrait également son association avec les dérivés oxydés de la cytosine méthylée dans un contexte CpG (L. Hu et al. 2013).

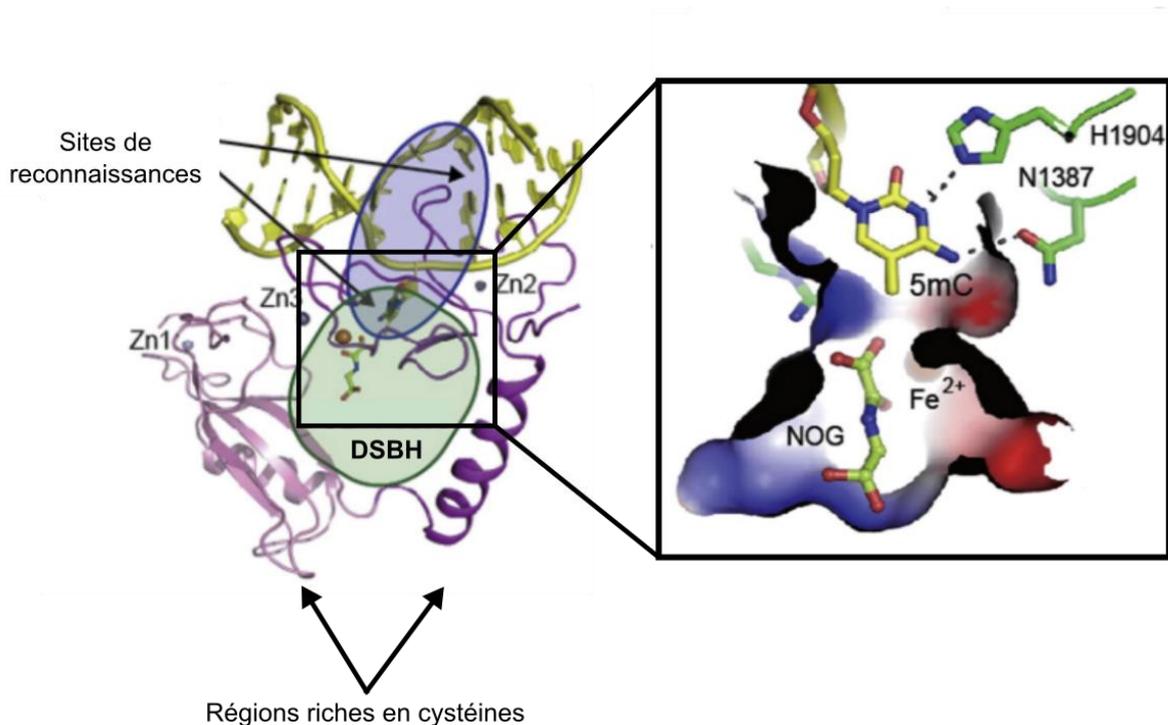


Illustration 15. Organisation du domaine catalytique de TET2. La région DSBH est entourée par les deux régions riches en cystéine. La 5mC est exclue de la molécule d'ADN pour être insérée dans le domaine catalytique de TET2 près des cofacteurs Fe(II) et de l'analogue de l'oxoglutarate (L. Hu et al. 2013).

En complément du domaine catalytique, les protéines TET1 et TET3 contiennent un domaine en doigt de zinc (ZF-CXXC) localisé en région N-terminale. Ce domaine est en revanche absent de TET2 (Illustration 14). Au cours de l'évolution, une inversion chromosomique aurait séparé le domaine CXXC, aussi appelé IDAX (inhibition of the Dvl and axin complex protein), du reste de la protéine TET2 (Ko et al. 2013). Ce domaine ZF-CXXC de type 3 présent chez TET1 et TET3 consiste en une succession de deux séquences riches en cystéine séparées par une région de liaison. Les huit cystéines, associées avec deux ions zinc, entourent la double hélice de l'ADN (H. K. Long, Blackledge, et Klose 2013). Ce domaine permettrait de cibler les enzymes TET aux régions CGi afin de protéger ces sites riches en CpG de la méthylation aberrante induite par les méthylases de novo, DNMT3a et b et ainsi maintenir un faible niveau de méthylation des cytosines (H. K. Long, Blackledge, et Klose 2013).

B. Les produits d'activité des TET

i. La 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC)

a. Les caractéristiques de la 5hmC

Identifiée en 1952 par Wyatt et Cohen via une analyse chromatographique sur papier, la cytosine hydroxyméthylée a d'abord été mise en évidence au sein du génome de certains bactériophages (Wyatt et Cohen 1953). Cette forme modifiée de la cytosine constituerait un moyen d'éviter la dégradation de l'information génétique du virus dans l'hôte. En effet, au sein du virus, la 5hmC peut être glycosylée par des β -glucosyl-transférases qui transfèrent une molécule de glucose provenant d'un uridine-diphosphoglucose sur la 5hmC. Cette glycosylation protège le génome viral de la dégradation par certaines enzymes de restriction provenant de la cellule hôte. Grâce à l'évolution des techniques de détection, la 5hmC a pu ensuite être mise en évidence chez les mammifères (Jurkowski 2020).

La 5-hydroxyméthylcytosine représente la première forme oxydée de 5mC résultant de la réaction d'oxydation médiée par les TET en présence des cofacteurs. La

cytosine hydroxyméthylée est formée d'un groupement hydroxyle (OH) qui se trouve associé, via l'activité des TET, au méthyl CH₃ de la méthylcytosine localisé en position 5 de la cytosine. L'hydrogène de la cytosine en position 5 est donc substitué par le groupement hydroxyméthyl (CH₂-OH). Le groupe méthyl est de nature hydrophobe tandis que l'ajout de la molécule hydroxyle confère une propriété hydrophile et polaire à la cytosine. Tout comme la 5mC, la 5hmC n'altère pas la structure globale de l'ADN, en revanche, ce type de modification favorise la flexibilité de la double hélice contrairement à la 5mC qui tend à la rigidifier (Ngo et al. 2016; Wanunu et al. 2011).

Si la 5hmC a initialement été considérée comme un simple intermédiaire de déméthylation, sa distribution spécifique selon la nature des tissus et l'état de pluripotence cellulaire semble indiquer que cette marque pourrait posséder une fonction à part entière.

b. Les fonctions de 5hmC

1. Le rôle de 5hmC dans la déméthylation

L'oxydation de la cytosine méthylée constitue un moyen de réguler de manière active, via la réaction d'oxydation médiée par les enzymes TET, la durée de vie de la 5mC (Tahiliani et al. 2009; Kohli et Zhang 2013). Cependant, la présence de 5hmC permet également de diminuer le niveau de 5mC de manière passive (Kohli et Zhang 2013). En effet, la méthylase de maintenance DNMT1, reconnaît les sites hémiméthylés provenant de la duplication de l'ADN, permettant ainsi la méthylation du brin néo-synthétisé. En revanche, si lors de la réplication la cytosine se trouve hydroxyméthylée, DNMT1 ne peut reconnaître cette forme oxydée et de ce fait le brin néosynthétisé ne sera pas méthylé (Kohli et Zhang 2013; Valinluck et Sowers 2007).

2. Le rôle de 5hmC dans la transcription

La 5hmC est retrouvée dans tous les tissus. Cependant son abondance varie selon la nature de ceux-ci (Nestor et al. 2012). En effet, le taux de 5hmC apparaît le plus élevé au sein du cerveau comparé aux autres tissus différenciés (Globisch et al. 2010; Kriaucionis et Heintz 2009; Spruijt et al. 2013). En plus de sa distribution tissu

spécifique, l'enrichissement de 5hmC au sein de certaines régions génomiques varie également selon l'état de différenciation cellulaire (Sérandour et al. 2012).

Contrairement à la 5mC, son dérivé oxydé est absent au niveau des éléments répétitifs qui sont non exprimés (Nestor et al. 2012; Williams et al. 2011) révélant que la présence de 5hmC n'est pas associée à la répression de la transcription.

La 5hmC se trouve accumulée au niveau de sites ayant un niveau de CpG faible ou intermédiaire et est généralement absente des CGI (Sérandour et al. 2012; Yu et al. 2012). Plus spécifiquement, la 5hmC apparaît enrichie au sein de régions régulatrices géniques telles que le TSS, le promoteur, les « enhancers » et les corps de gènes, suggérant une fonction de 5hmC dans la régulation de l'expression génique (Mahé et al. 2017; Neri et al. 2013; Pastor et al. 2011; Sérandour et al. 2012; Stroud et al. 2011; Yu et al. 2012).

La présence de 5hmC au sein de la chromatine permet de rendre celle-ci moins compacte via une interaction moins soutenue entre les dimères d'histones H2A/H2B et la molécule d'ADN (Mendonca et al. 2014). En complément de cet effet, l'hydroxyméthylation participe à la mise en place d'un état chromatinien favorable au processus de transcription. En effet, l'accumulation de 5hmC aux « enhancers » est associée à un état de pré-activation « priming » (caractérisée par la présence de H3K4me1) et à l'activation (marquée par H3K4me1 et/ou H3k4me2 et H3K27ac) de ceux-ci (Mahé et al. 2017; Sérandour et al. 2012; Stroud et al. 2011; Yu et al. 2012). La combinaison de l'effet de 5hmC sur la flexibilité de la molécule d'ADN, sur les interactions chromatiniennes et les modifications d'histone, favorise un statut ouvert de la chromatine (Mahé et al. 2017).

Par ailleurs, l'analyse de sa distribution génomique indique que la 5hmC se localise au niveau de sites de liaison de nombreux facteurs de transcription (TF), suggérant soit que la présence de ce dérivé oxydé favoriserait la liaison des TF, soit que les TF eux-mêmes favoriseraient la déméthylation active de l'ADN (Mahé et al. 2017; Sérandour et al. 2012; Stroud et al. 2011; Feldmann et al. 2013).

Tout comme 5mC, la 5hmC est reconnue par des protéines qui sont soit sensibles aux deux marques, ce qui est notamment le cas de MeCP2, soit par des effecteurs

qui lui sont spécifiques comme Uhrf2 (Spruijt et al. 2013). L'oxydation de 5mC non seulement recrute des interacteurs propres à la marque mais peut limiter ou empêcher l'association de protéines reconnaissant la 5mC (Spruijt et al. 2013). Ce phénomène peut-être le résultat des caractéristiques physico-chimique de la modification au niveau du carbone 5. En effet, la protéine Rfx1 possède un site de liaison hydrophobe laissant pénétrer la 5mC mais pas la 5hmC. La reconnaissance de ces marques, que ce soit la 5mC ou 5hmC, par différents interacteurs apparaît être variable entre deux lignées cellulaires, en particulier entre les cellules souches de souris (mESCs) et les cellules neuronales différenciées issues des mESCs (NPCs) (Spruijt et al. 2013). Ce phénomène peut être la conséquence d'une variation de l'expression de ces interacteurs, d'ajout ou non de modification post-traductionnelle sur ceux-ci, de leur temps de vie, etc, au cours du développement et de la différenciation cellulaire pouvant ainsi modifier la fonction de la marque au cours de ces processus (Spruijt et al. 2013).

3. Le rôle de 5hmC dans la réparation des lésions génomiques

Récemment, une nouvelle fonction de 5hmC et des protéines TET a été caractérisée dans la réparation des dommages à l'ADN. En effet, les niveaux de 5hmC oxydée augmentent suite à l'induction de lésions génomiques par traitements chimiques ou irradiation laser (Kafer et al. 2016; D. Jiang et al. 2015; 2017). En plus d'une élévation du taux de 5hmC, cette marque s'accumule et colocalise avec le marqueur de dommages γ H2AX et 53BP1, une protéine de réparation des cassures double-brins de l'ADN (Kafer et al. 2016). L'ensemble de ces données suggère donc un rôle de 5hmC dans la signalisation des dommages et/ou la réparation de ceux-ci. ATM et ATR sont des protéines régulatrices de la signalisation de lésions de l'ADN et du cycle cellulaire. En présence de dommages, ces kinases interagissent et phosphorylent les protéines TET1 et TET3, modulant leur activité d'oxydation (D. Jiang et al. 2015; 2017). L'activité de ces dioxygénases semble ainsi être régulée par des voies de signalisation associées à la présence de dommages. Enfin, la présence des protéines TET permet d'améliorer l'efficacité de la réparation (D. Jiang et al. 2015). Ainsi, 5hmC et les protéines TET semblent contribuer au processus de réparation des dommages à l'ADN.

ii. La 5-formylcytosine (5fC)

La 5-formylcytosine est le deuxième dérivé oxydé résultant de l'activité catalytique des protéines TET, en présence des cofacteurs. La 5fC contient au niveau du carbone 5 un groupement formyl (CHO) qui remplace l'hydrogène normalement présent sur la cytosine non modifiée en position 5. La 5fC formée est généralement rapidement excisée par la TDG et réparée par la voie du BER.

Cependant, la 5fC apparaît plus stable qu'initialement suggéré (Bachman et al. 2015) et semble avoir une ou des fonctions qui diffèrent de son rôle d'intermédiaire de déméthylation. En accord avec sa nature d'intermédiaire de déméthylation, la 5fC est reconnue par un grand nombre de protéines qui sont impliquées dans la réparation de l'ADN telles que les glycosylases TDG et NEIL3 (Spruijt et al. 2013). Néanmoins, en appui d'un rôle potentiel en tant que marque épigénétique, la 5fC est également reconnue par des protéines régulant la transcription parmi lesquelles certains facteurs de transcription appartenant à la famille des Forkhead box P (FOXP1 et FOXP4) ainsi que l'ensemble des composants du complexe de remodelage de la chromatine NuRD (Iurlaro et al. 2013). Ces données suggèrent donc que la 5fC pourrait participer à la modulation de l'expression génique et à la réorganisation de la chromatine.

Des analyses par cristallographie et NMR ont révélé que la présence d'une ou de plusieurs 5fC dans un contexte CpG n'altère pas la structure globale de l'ADN même si de légères variations apparaissent localement (Hardwick et al. 2017). Néanmoins, la présence de 5fC semble augmenter la flexibilité de la double hélice d'ADN, tout comme la 5hmC (Ngo et al. 2016). Il a de plus été rapporté que la 5fC augmente la stabilité des nucléosomes (Ngo et al. 2016). Ceci est en accord avec l'étude menée par Raiber et al décrivant une association entre 5fC et un enrichissement en nucléosomes dans les tissus embryonnaires de souris; une association qui semble reposer sur une interaction directe entre la 5fC et certaines lysines de l'histone H3 (Raiber et al. 2018). Ainsi, la 5-formylcytosine participerait au positionnement des nucléosomes au sein des « enhancers » afin de favoriser la transcription des gènes tissus spécifiques. Cet effet positif de la 5fC sur la transcription a également été décrit par Iurlaro et al dans les tissus embryonnaires du cerveau et du cœur de

souris où la 5fC s'accumule au niveau des « enhancers » marqués par H3K4me1 et H3K27ac (Iurlaro et al. 2016).

Contrairement aux tissus embryonnaires, dans les mESCs, la 5fC est abondamment présente au niveau de séquences répétées telles que les répétitions satellites de l'hétérochromatine péricentrique, qui sont aussi enrichies en 5mC (Shen et al. 2013). La présence de 5fC dans ces régions est associée à l'accumulation des protéines EZH2 et Suz12 qui appartiennent au complexe répresseur PCR2 (Shen et al. 2013). Ces données sont cohérentes avec une autre étude basée sur l'identification de protéines interagissant avec la 5fC. En incubant le contenu nucléaire de cellules souches embryonnaires de souris avec une séquence nucléotidique contenant 5fC, l'ensemble des protéines appartenant au cœur du complexe répresseur NuRD a été caractérisé comme étant associé à cette marque (Iurlaro et al. 2013). Alors que dans les tissus embryonnaires, la présence de 5fC semble favoriser la transcription, il apparaît en revanche que dans les cellules souches embryonnaires cette marque ait un rôle opposé dans la régulation génique.

En supplément du rôle de 5fC dans la modulation de l'expression génique, la 5-formylcytosine est trouvée abondamment au niveau des limites exons-introns, suggérant un rôle supplémentaire de cette marque dans la régulation de l'épissage (Iurlaro et al. 2016; Shen et al. 2013).

La distribution spécifique de 5fC met ainsi en lumière une fonction de cette marque dans la modulation de l'activité génique et suggère qu'elle participerait à la régulation du développement embryonnaire.

iii. La 5-carboxylcytosine (5caC)

La 5caC est constituée d'un groupement carboxyle (CO₂H) qui remplace l'hydrogène en position 5 de la cytosine. Elle constitue la base oxydée de la cytosine la plus rarement représentée au sein du génome. Tout comme 5fC, la 5caC est essentiellement vue comme un simple intermédiaire de déméthylation. Cependant, des études récentes suggèrent que la 5caC pourrait aussi être une marque épigénétique. En effet, la 5caC est reconnue par de nombreuses protéines telles que DNMT1 et le remodelleur SWI/SNF (Spruijt et al. 2013) mais également par CTCF

(Nanan et al. 2019), suggérant une fonction de 5caC dans la structuration de la chromatine. De plus, la 5caC est capable de freiner l'élongation par l'ARN Pol II en établissant des liaisons hydrogènes avec la boucle de reconnaissance de l'ADN de la polymérase (L. Wang et al. 2015).

C. Le rôle de TET1 dans la transcription

Les protéines TET participent à la régulation de la transcription notamment via la modulation de l'environnement chromatinien.

D'une part, l'oxydation de la cytosine méthylée permet de neutraliser l'effet de la 5mC sur la répression de la transcription (comme décrit dans la partie II.B.v). Le premier effet issu de l'activité catalytique des TET serait donc de médier l'activation de la transcription par l'inhibition de recrutement de complexes répresseurs et remodelleurs de la chromatine ciblant la 5mC et ayant un impact négatif sur l'expression génique.

D'autre part, il apparaît que ce n'est pas seulement l'absence de la 5mC qui module l'architecture locale de la chromatine. En effet, l'enrichissement en 5hmC est associé à des marques positives de la transcription et à l'ouverture de celle-ci, rendant accessible les sites de liaison pour les TF (Mahé et al. 2017).

Malgré le maintien d'une hypométhylation via le recrutement de TET1 au niveau de promoteurs, certains gènes ne sont pas exprimés suggérant un mécanisme de régulation de l'expression indépendamment de l'activité enzymatique de TET1 (H. Wu et al. 2011). Il s'avère que le rôle de TET1 dans la régulation de la transcription est complexe et ne repose pas uniquement sur sa capacité à hydroxymétyler les cytosines. En effet, indépendamment de son activité enzymatique, TET1 interagit et recrute des répresseurs de la transcription. Parmi ces répresseurs, on retrouve des remodelleurs et des modificateurs de la chromatine. TET1 a donc une double fonction dans la régulation de la transcription notamment via son activité enzymatique mais aussi en recrutant des partenaires de remodelage et de modification de cette dernière.

Dans les mESCs, TET1 interagit et colocalise avec des protéines appartenant au complexe répresseur polycomb (PRC2) qui sont EZH2 et Suz12. PRC2 est responsable de la triméthylation de H3K27. Cette marque d'histone est associée à la répression de la transcription. La présence de TET1 au sein de ce complexe répresseur inhibe la transcription via un environnement chromatinien défavorable à l'expression génique (Neri et al. 2013; H. Wu et al. 2011). Le complexe répresseur Sin3a quant à lui comprend des histones déacétylases et a également été caractérisé comme partenaire de TET1 (Williams et al. 2011).

TET1 peut également réguler l'association de certains modificateurs à la chromatine tels que l'histone acétylase hMOF dont la cible est H4K16. Dans les cellules différenciées et dans les mESCs, TET1, indépendamment de son activité et en présence de Sin3a, limite l'auto-acétylation de hMOF promouvant l'acétylation de H4K16 au niveau de certains promoteurs (Zhong et al. 2017). L'accumulation de cette marque épigénétique favorise la transcription de gènes impliqués dans la réparation de dommages à l'ADN. De plus, TET1 ferait également partie d'un complexe comprenant la déméthylase d'histone LSD1 et la sous-unité du complexe PRC2, EZH2, et réprimerait la transcription de gènes cibles (Su et al. 2019).

Ainsi, de manière indépendante de son activité enzymatique, TET1 s'associe à divers complexes influençant la structure de la chromatine. Cependant la contribution exacte des dioxygénases dans la réorganisation de la chromatine reste à définir.

D. Les isoformes de TET1

i. Les caractéristiques des isoformes de TET1

Les protéines TET sont impliquées dans différents processus parmi lesquels le développement embryonnaire. Les dioxygénases TET1 et TET2 sont en effet, fortement exprimées dans les cellules souches embryonnaires humaines et de souris ce qui conduit à une accumulation importante de la marque 5hmC dans ces cellules (Koh et al. 2011; Huang et al. 2014). La corrélation entre le taux protéique de TET1 ainsi que l'abondance de 5hmC avec le degré de pluripotence suggère une fonction de TET1 dans le maintien de cette dernière. Dans les cellules souches

embryonnaires (ESCs), il apparaît notamment que TET1 empêche l'hyperméthylation des promoteurs de certains gènes de pluripotence comme Nanog (Ito et al. 2010). Ces derniers sont impliqués dans la conservation de l'identité des ESCs. TET1 régule ainsi la transcription des facteurs transcriptionnels de pluripotence (Ficz et al. 2011; Ito et al. 2010). En parallèle, dans les ESCs humaines et de souris, la transcription de TET1 est régulée par les facteurs transcriptionnels de pluripotence tels que Nanog, Oct 3/4 et myc (Neri et al. 2015). Il existe donc une régulation transcriptionnelle croisée entre TET1 et les acteurs impliqués dans le maintien du statut de pluripotence. En complément de sa fonction dans la pluripotence, TET1 semble être également impliquée dans le choix de la destinée cellulaire. En effet, la déplétion de cette dioxygénase au sein des cellules ESCs entraîne une différenciation de celles-ci vers une identité majoritairement endodermale et du trophoctoderme au détriment du neuroectoderme (Ito et al. 2010; Koh et al. 2011).

Au cours de la différenciation des ESCs, l'expression génique de TET1 diminue tout comme l'abondance en 5hmC. La diminution de la transcription de TET1 est médiée par la liaison des sous-unités du complexe PRC2 qui accumulent la marque répressive H3K27me3 au niveau du promoteur de TET1. Si la transcription de TET1, qui possède une région N-terminale incluant le domaine CXXC (TET1-longue), apparaît être réprimée au cours de la différenciation des ESCs en neurones, les niveaux d'une isoforme nouvellement identifiée et tronquée de la région N-terminale (TET1-courte) augmentent dans ce contexte (Illustration 16) (W. Zhang et al. 2016). Cette expression différentielle est régulée par l'utilisation de promoteurs alternatifs, le promoteur de l'isoforme TET1-courte étant localisé au sein de l'intron 2 du gène (Good et al. 2017; W. Zhang et al. 2016).

L'isoforme TET1-courte est exprimée dans des cellules neuronales (Greer et al. 2021; W. Zhang et al. 2016), mais aussi dans les cellules gonadotropes immatures (Yosefzon et al. 2017), ainsi que dans le cœur, le foie et les reins (Greer et al. 2021) et dans certaines lignées cancéreuses issues de cancers de l'utérus et de glioblastomes (Good et al. 2017). Cette isoforme est dépourvue de la partie N-terminale (NTER) (acides aminés 1 à 671) de TET1, incluant le domaine CXXC. Il en résulte une protéine d'un poids moléculaire de 162 kDa tandis que celui de la

protéine TET1 longue est de 235 kDa (Good et al. 2017). Bien que la région C-terminale responsable de l'activité catalytique soit présente dans ces deux versions de la protéine TET1, la délétion du domaine N-terminal procure certainement des propriétés différentes à TET1-courte.

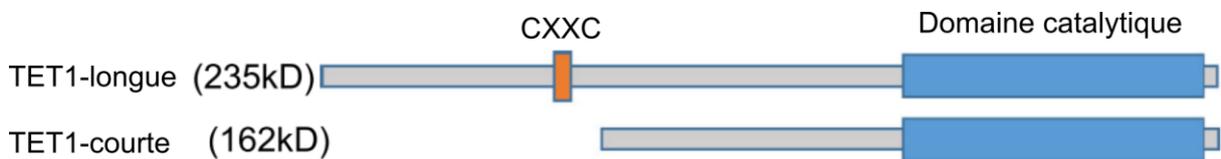


Illustration 16. Représentation des domaines des isoformes de TET1. La protéine TET1-courte est tronquée de la partie N-terminale incluant le domaine CXXC (Good et al. 2017).

ii. Les fonctions de TET1-courte

L'expression de TET1-courte au détriment de la forme longue dans les cellules différenciées, et inversement dans les cellules ES, suggère un rôle propre à chacune des isoformes dans le contrôle de la pluripotence et de la différenciation. Au niveau cognitif, les deux isoformes ont des effets opposés sur la mémoire, la forme longue améliorerait les capacités de mémorisation tandis que le TET1-courte défavoriserait ce processus (Greer et al. 2021).

D'autre part, il semblerait que les gènes régulés par TET1-longue et TET1-courte soient différents. L'absence du domaine CXXC au sein de TET1-courte pourrait être responsable d'une diminution des capacités de cette dernière à s'associer aux CGI. De plus, les capacités régulatrices de TET1-courte semblent moins importantes que celles de TET1-longue (nombre moins important de gènes régulés et de CpG déméthylés en système de surexpression) (Good et al. 2017). Zhang et al ont révélé que l'absence de la partie N-terminale dans TET1-courte diminue globalement son association avec la chromatine, un phénomène indépendant de l'absence du domaine CXXC (W. Zhang et al. 2016). Enfin, cette étude montre aussi un rôle indirect du domaine N-terminal dans le recrutement de l'enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) au niveau des promoteurs (W. Zhang et al. 2016). Ainsi, une plus faible affinité pour la chromatine et une capacité réduite à

recruter des co-régulateurs de la transcription comme OGT pourraient expliquer la diminution des capacités de régulation de la transcription de TET1-courte.

In vivo, le phénotype des souris exprimant TET1-courte est similaire à celui des souris déficientes pour la protéine longue TET1, avec une altération du nombre de petits par portée, du poids des souriceaux et une léthalité précoce. L'effacement de l'empreinte parentale dans les cellules germinales primordiales (PGC) est médié à la fois par dilution passive de la 5mC (via les divisions cellulaires) et par l'activité d'oxydation des TET. Bien que le génome des PGC de souris exprimant TET1-courte, révèle une hypométhylation globale due à la dilution passive de la 5mC, certaines régions soumises à l'empreinte parentale (ICR) restent hyperméthylées, suggérant que l'isoforme TET1-courte n'est pas capable d'effacer totalement l'empreinte parentale (W. Zhang et al. 2016).

Ainsi, TET1-courte et TET1-longue auraient des fonctions différentes. De ce fait, une meilleure caractérisation des fonctions du domaine N-terminal de TET1 apparaît essentielle. L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier le rôle des protéines TET et en particulier du domaine N-terminal dans l'organisation de la chromatine.

MATERIELS ET METHODES

I. Biologie moléculaire : Création, amplification et purification des plasmides

A. Création des plasmides

La plupart des plasmides sont issus de notre laboratoire, les autres plasmides ont été gracieusement donnés. Les plasmides pmcherry-ALC1 et pcDNA-mcherry-mH2A1.1-macrodomaine codant pour les protéines respectives ALC1 et le macrodomaine de H2A1.1 toutes deux couplées au fluorophore mcherry proviennent du laboratoire du Dr Gyula Timinsky. Les plasmides codant pour la protéine entière TET1, TET2 et TET3 de souris couplées à la GFP (pCAG-GFP-mTET1/2/3) proviennent du laboratoire du Dr Heinrich Leonhardt et les plasmides codant pour les parties protéiques de TET1 murine couplées également avec la GFP dans un vecteur PiggyBac (CTER, NTER, Δ CXXC) ont été gracieusement donnés par le laboratoire du Dr Wei Xie.

Les formes inactives de la protéine entière TET1 (FL) et du CTER contiennent une double mutation au niveau du domaine catalytique (H1652Y et D1654A), empêchant l'association du cofacteur Fe(II) au sein du domaine catalytique de la protéine et de ce fait inhibe l'activité enzymatique de la dioxygénase (Ito et al. 2010).

La création de ces mutants inactifs a été réalisée en insérant un fragment plasmidique contenant la double mutation au sein des plasmides pCAG-GFP-mTET1 pour le FL ou pB-eGFP-mTET1s pour le CTER. Grâce à la présence de deux sites de restriction bornant la double mutation (en début de la région catalytique pour l'enzyme NheI et après la double mutation pour l'enzyme SdaI), le fragment contenant la double mutation issue du plasmide pcDNA3-TET1-FLmut a été échangé avec le fragment non muté du plasmide codant pour le FL ou le CTER par une digestion enzymatique suivie d'une étape de ligation. Les plasmides ont donc été digérés par le couple d'enzymes (SdaI/NheI), en présence de 1 μ g d'ADN, de 2 μ l de FastDigest green buffer (Thermo Scientific™), de 1 μ l de l'enzyme SdaI (Thermo Scientific™) et de 1 μ l de l'enzyme NheI (Thermo Scientific™), complété par de l'eau milli Q jusqu'à 20 μ l pendant 15min à 37°C.

Pour séparer les fragments d'ADN, les produits de digestions sont déposés sur gel d'agarose 0,8% (w/v) dans du Tris-acétate-EDTA (TAE) (1X). La migration des échantillons, réalisée à 140Volt pendant environ 40min, est suivie grâce à la coloration verte du produit FastDigest green buffer présent dans la réaction de digestion.

L'ajout de GelRed® (Biotium) lors de la préparation du gel permet la révélation des fragments d'ADN digérés ainsi que celle du marqueur de taille (GeneRuler 1 kb DNA ladder, ThermoFisher Scientific) sous exposition aux ultraviolets (UV). Après migration, le gel est donc placé sous UV à 100% et les fragments de plasmides correspondants sont récupérés en fonction de leur taille, en découpant directement les bandes d'intérêt dans le gel.

La purification des fragments d'ADN du gel d'agarose se fait à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Après dissolution du gel d'agarose, l'ADN est retenu sur une membrane de silice, tandis que les contaminants sont éliminés à travers un lavage. L'élution des fragments digérés se fait avec une solution d'élution NE (5mM Tris/HCl, pH 8,5).

La ligation est réalisée via une incubation des deux fragments de plasmide d'intérêt purifiés comme décrit précédemment en présence de 0,5µl de T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) et 2µl de son tampon, complété à 20µl d'eau milli Q pendant 2h à température ambiante.

B. Amplification des plasmides

i. Transformation bactérienne

Les plasmides (environ 3 µg) sont ajoutés à 50 µl de bactéries E.coli compétentes (NEB®5-Alpha competent E.coli High efficiency ou NEB®5-Alpha competent E.coli subcloning) pendant 30min sur glace. La transformation bactérienne est effectuée par un choc thermique à 42°C pendant 30sec puis 5min dans la glace. En présence de milieu soc (environ 300µl), les bactéries sont placées 1h à 37°C sous agitation puis déposées de manière homogène (à l'aide de billes) sur une gélose de milieu

Luria-Bertani (LB) contenant l'antibiotique de sélection approprié. La croissance des bactéries se poursuit durant toute la nuit à 37°C.

ii. Purification des plasmides à partir des bactéries

Selon l'application, il existe plusieurs moyens d'amplifier et d'isoler les plasmides à partir des bactéries E.coli.

a. Amplification et purification de plasmides à partir de faibles quantités de bactéries

Les colonies bactériennes présentes sur les boîtes de pétri sont repiquées en milieu liquide (5ml de LB en présence de l'antibiotique de sélection à 50µg/ml). Après une incubation à 37°C sous agitation pendant une nuit, 1,5ml des différents tubes de bactéries sont récupérés et centrifugés à 11 000g pendant 30sec. Une fois le surnageant éliminé, les plasmides sont extraits et purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Après une lyse alcaline des bactéries, les plasmides sont libérés puis retenus à la membrane de silice tandis que les différents contaminants sont élués durant les étapes de lavages. L'éluion des plasmides est induite par ajout de tampon AE (5mM Tris/HCl, pH8,5)

b. Amplification et purification de plasmides à partir de grandes quantités de bactéries

Une colonie présente sur la boîte de pétri est récupérée et déposée dans du 100ml de milieu LB liquide toujours en présence de l'antibiotique de sélection. La croissance des bactéries se poursuit pendant une nuit sous agitation et à 37°C. Le lendemain, les bactéries sont isolées du milieu par centrifugation à 4°C (4000g pendant 15min). Les plasmides sont extraits à l'aide du kit Nucleobond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. L'ADN est extrait par une lyse alcaline des bactéries. Les plasmides sont séparés des débris cellulaires par filtration sur une colonne de « filtrage ». Une seconde colonne contenant une résine échangeuse d'anions va retenir les composés chargés négativement (protéines, ARN, ADN, etc). L'élimination des contaminants se fait par lavage avec des solutions faiblement salines. Les plasmides sont quant à eux élués à l'aide de solutions hautement salines et sont ensuite précipités à l'aide d'isopropanol. Après

centrifugation à 15000g, le culot d'ADN est lavé avec 70% d'éthanol et resuspendu dans du tampon TE (10mM Tris-HCl, pH8, 1mM EDTA).

iii. Mesure de la concentration de plasmides purifiés

La concentration des plasmides est déterminée par spectrophotométrie (DeNovix DS-11 FX+). La concentration est estimée à partir de la mesure de l'absorption à 260nm, qui correspond au pic d'absorption de l'ADN double brin. Cette information permettra de pouvoir transfecter les cellules avec les plasmides de manière optimale et conforme aux recommandations éditées par les fournisseurs des produits de transfection (décrit en section II.A.iv).

iv. Vérification de la présence des mutations par séquençage

Au laboratoire, avant utilisation de chaque plasmide, ceux-ci sont séquencés. L'amplification de la zone à séquencer a été effectuée en incubant environ 500ng de plasmide avec 2µl de tampon, 2µl de BigDye™ (Terminator v3.1 Cycle Sequencing de chez Applied Biosystems™) et 0,5µl d'oligonucléotides (10µM) complété à 10µl d'eau milli Q. Après 2min à 96°C, trente cycles de Polymerase Chain Reaction (PCR) ont été réalisés comme décrit ci-après : 30sec à 96°C, 15sec à 55°C, 4min à 60°C. En parallèle, une plaque 96 puits est remplie de billes de Séphadex™G-50 hydratées avec 300µl d'eau durant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les billes sont débarrassées de l'eau grâce à une centrifugation à 2500rpm pendant 5min. L'élimination des contaminants présents lors de la réaction de PCR se fait via le dépôt des produits de PCR sur ces billes. Les contaminants restent piégés dans les billes, tandis que les fragments d'ADN amplifiés, sont élués après centrifugation à 2500rpm pendant 5min. Ils sont ensuite séquencés par la méthode Sanger à l'aide de la machine Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer.

La présence des deux résidus mutés dans les deux plasmides créés a été confirmée par séquençage. La région plasmidique comportant les deux mutations a été amplifiée à partir des oligonucléotides encadrants ceux-ci : 5'-GGAAATGAAGAGGGGCGTC-3' et 5'-TGGAGTTGTTTCATCCTCGGG-3'.

Les plasmides dont la séquence a été confirmée par séquençage sont ensuite amplifiés comme décrit en section I.B.ii.b et, après dosage au spectrophotomètre (section I.B.iii), peuvent être convenablement transfectés dans des cellules (section II.A.iv).

II. Biologie cellulaire

A. Culture cellulaire

i. Décongélation des cellules

Les cellules conservées dans l'azote liquide sont décongelées en les immergeant progressivement à l'aide d'une pipette, dans du milieu chaud Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), complété avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Eurobio Scientific) et 1% des antibiotiques pénicilline/streptomycine (10 000 unités/ml de pénicilline et 10mg/ml de streptomycine, Gibco). Après une centrifugation à 1200 rpm pendant 3min, le milieu est éliminé et les cellules culottées sont resuspendues dans 5ml de milieu DMEM complété avec 10% de FBS et 1% de pénicilline/streptomycine et chauffé à 37°C. Les cellules en suspension dans le milieu sont ensuite déposées dans une flasque de 25cm² dans un incubateur maintenant une température de 37°C et un taux de CO₂ à 5%. Après 24h, la confluence des cellules est vérifiée et si les cellules se trouvent dans un état de confluence, celles-ci doivent être passées comme décrit ci-après.

ii. Maintien des lignées cellulaires et passage des cellules

Les lignées cellulaires U2OS, MCF-7 et HeLa sont cultivées dans un milieu DMEM (Gibco) complété avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Eurobio Scientific) et 1% des antibiotiques pénicilline/streptomycine (correspondant à 100 unités de pénicilline et 0,1mg de streptomycine par millilitre, Gibco) dans un environnement humidifié et stabilisé à une température de 37°C et un taux de 5% de CO₂. Le passage des cellules se déroule suivant le protocole suivant. Celles-ci sont tout

d'abord lavées au Phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco) puis traitées avec 0,05% trypsine-EDTA (Gibco™) à 37°C pendant quelques minutes pour permettre leur resuspension dans le milieu. Les cellules décollées de la surface de la flasque sont ensuite diluées au 1/4 ou 1/8 dans du milieu de culture et transférées dans une autre flasque afin de maintenir la lignée. Une partie des cellules passées et diluées peut également être déposée dans des puits à fond de verre dédiés à l'imagerie tels que les Lab-Tek (155411, Nunc™) et Zell Kontakt (8008-80, Zell Kontakt) à des fins expérimentales. Le passage des cellules à confluence a lieu au minimum deux fois par semaine et plus en fonction des besoins expérimentaux.

iii. Congélation des cellules

Les cellules peuvent être congelées afin de les conserver intactes sur du long terme et si besoin être décongelées à des fins expérimentales. Les cellules confluentes sont lavées avec du PBS puis décollées grâce à une incubation avec 0,05% trypsine-EDTA pendant quelques minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite reprises dans du milieu complété avec 10% de FBS et 1% des antibiotiques pénicilline/streptomycine puis centrifugées à 1200rpm pendant 3min. Le milieu est éliminé et les cellules sont resuspendues dans du milieu DMEM contenant 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) avant d'être déposées dans des tubes de congélation. Les cellules sont tout d'abord congelées à -80°C pendant 24 ou 48h avant de les transférer dans de l'azote liquide pour une conservation à long terme.

iv. Transfection des cellules

L'expression transitoire de protéines a été réalisée par transfection de plasmides avec les agents de transfection X-tremeGENE™ HP (Roche) ou Xfect™ (Takara). Le produit de transfection X-tremeGENE™ a principalement été utilisé pour effectuer des simples ou doubles transfusions de plasmides. Dans ce cas, après 15min d'incubation d'un mélange de 25µl d'Opti-MEM™ (Gibco) contenant 0,25µg d'ADN plasmidique et 0,25µl de X-tremeGENE™, celui-ci est ajouté au 250µl de milieu où se trouvent les cellules. Lorsqu'une triple transfection doit être réalisée, le produit Xfect™ est utilisé. Après incubation pendant 15min d'un mélange de 30µl de la solution tampon contenant 1µg d'ADN total et 0,3µl de Xfect™, celui-ci est ajouté au

140µl de milieu où se trouve les cellules. Après 4h d'incubation, le milieu est ensuite changé.

Après 24h, les cellules sont soit fixées soit immergées dans un milieu Leibovitz's L15 sans phénol rouge (Gibco™) complété avec 1% d'antibiotiques Penicilline/Streptomycine (Gibco) et 20% de SVF, pour les expériences de microscopie sur les cellules vivantes.

v. Le traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Après trois lavages au PBS, les cellules sont incubées pendant 1h dans un milieu DMEM non complété avec du FBS. L'induction du signal de PARylation est réalisée par un traitement avec 0,500mM de peroxyde d'hydrogène (Sigma®) pendant 10min. Après un lavage avec du PBS froid les cellules sont fixées puis immunomarquées comme décrit ci-après.

B. Marquage par immunofluorescence

i. 5hmC

Après avoir été fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4 % pendant 10min, les cellules ont été lavées à l'aide de PBS puis perméabilisées par incubation pendant 30min dans une solution de Triton® X-100 dilué à 0,5% dans du PBS. A la suite de trois lavages au Tween®20 à 0,05% dilué dans du PBS, la chromatine est dénaturée par un traitement de 30min avec de l'acide chlorhydrique (HCl 2N). La dénaturation est arrêtée par ajout de 100mM de Tris-HCl (pH8) pendant 10min. Après trois lavages, les sites aspécifiques sont bloqués par ajout de 3% d'albumine de sérum bovin (BSA) dilué dans du PBS-Tween®20 (à 0,05%) pendant 2h. Les cellules ont par la suite été incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps primaire dirigé contre la 5hmC (Active motif), dilué au 1/1000 dans de la BSA, PBS-Tween®20 (à 0,05%). Le lendemain, l'excès d'anticorps est lavé trois fois avant l'incubation pendant 30min et à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de l'anticorps primaire utilisé et marqué par le fluorophore Alexa Fluor® AF555 (anti rabbit, A21428, Thermofisher), dilué au 1/1000 dans 3% de BSA dilué dans du PBS-Tween®20 (à 0,05%).

ii. Chaînes de PARylation

Après induction ou non de la PARylation par traitement au H₂O₂, les cellules sont fixées et perméabilisées à l'aide d'un mélange méthanol et acétone (1:1) pendant 10min à -20°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS froid. Les sites aspécifiques sont bloqués pendant 1h par ajout de lait dilué à 5% dans du PBS-Tween®20 (à 0,1%). Les cellules sont incubées à 4°C pendant la nuit avec les anticorps 10H (Sellou et al. 2016) (Fig9.A), dilués à 1/800 dans la solution de blocage. Le lendemain, l'excès d'anticorps est lavé trois fois avant incubation, pendant 30min et à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de l'anticorps primaire utilisé et marqué par le fluorophore Alexa Fluor®AF555 (anti-mouse, A21422, Thermofisher), dilué au 1/500 dans la solution de blocage à base de lait.

Parce que le signal des protéines fusionnées à la GFP est mieux préservé par une fixation au PFA que par une fixation méthanol/acétone, un autre anticorps Pan-PAR (MABE1016 de Sigma), dirigé contre les chaînes de PAR et dont la fixation des cellules peut être réalisée par incubation au PFA, a été utilisé (Fig 14. A). Après avoir été fixées par de la PFA à 4 % pendant 15min, les cellules ont été lavées à l'aide de PBS puis perméabilisées par incubation pendant 10min dans une solution de Triton® X-100 diluée à 0,1% dans du PBS. A la suite de trois lavages au PBS, les sites aspécifiques ont été bloqués par ajout de milieu DMEM complété avec 10% de FBS pendant 1h. Les cellules ont par la suite été incubées pendant 2h à température ambiante avec les anticorps primaires dirigés contre des motifs PAR dilués à 1/300 dans la solution de blocage. L'excès d'anticorps est lavé trois fois avant incubation, pendant 1h et à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de l'anticorps primaire utilisé et marqué par le fluorophore Alexa Fluor® AF647 (anti-rabbit, A-31573, Thermofisher), dilué au 1/500 dans le DMEM contenant le FBS.

iii. γH2AX, ARNpolymérase II phosphorylée et H3K27me3

Pour les marquages de γH2AX (1/1000, 07-164, Millipore), de l'ARNpol II phosphorylée (1/200 Ab5095, Abcam) et de H3K27me3 (1/100, 07-449, Millipore), une immunofluorescence classique est réalisée. Après fixation au PFA 4% pendant

15min, les cellules ont été lavées à l'aide de PBS puis perméabilisée par incubation pendant 10min dans une solution de Triton® X-100 diluée à 0,2% dans du PBS. A la suite de trois lavages au PBS contenant 0,1% de Triton® X-100, les sites aspécifiques ont été bloqués par ajout de de BSA diluée à 3% dans du PBS-Tween®20 (à 0,05%) pendant 1h. Les cellules ont par la suite été incubées, à 4°C pendant la nuit, avec les anticorps primaires dirigés contre γ H2AX ou contre l'ARNpol II phosphorylée ou contre H3K27me3 dilué à 1/1000, 1/200 et 1/100 respectivement dans la solution de blocage. L'excès d'anticorps est lavé trois fois avant incubation, pendant 1h et à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de l'anticorps primaire utilisé et marqué par le fluorophore Alexa Fluor® AF555 (anti-rabbit, A21428, Thermofisher), dilué au 1/1000 dans la solution de blocage.

Pour l'ensemble des marquages réalisés par immunofluorescence, l'excès d'anticorps secondaires est lavé trois fois avant marquage pendant 15min de l'ADN au Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific), dilué à 1/10000 dans du PBS. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans du PBS avant d'être imagées.

iv. ARN néosynthétisés

La détection d'ARN néosynthétisés a été réalisée à l'aide du kit Click-iT™ARN Alexa Fluor™ 594 (Invitrogen™) en suivant le protocole proposé par le fournisseur. Les cellules ont été incubées avec 1mM de 5-éthynyl uridine (EU) pendant 1h à 37°C et à 5% de CO₂. Après un lavage au PBS, les cellules ont été immédiatement fixées avec du PFA à 4%, pendant 15min. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois puis perméabilisées par incubation pendant 15min dans une solution de Triton® X-100 diluée à 0,5% dans du PBS. Après lavage, la réaction de liaison de type « click » entre l'alcyne de l'EU et l'azide du fluorophore Alexa Fluor® 594 est réalisée pendant 30min à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après lavage la chromatine peut être marquée au Hoechst 33342 fournit dans le kit dilué à 1/1000 dans du PBS. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans du PBS avant d'être imagées.

III. Microscopie

De manière générale, l'ensemble des analyses en microscopie a été réalisé deux à trois fois, sauf indiqué le cas contraire.

A. Microscopie électronique

i. Fixation des cellules et le marquage de l'ADN

Les cellules ont été lavées trois fois avec du Hank's balanced salt solution (HBSS) (Sigma®) puis fixées par incubation avec une solution de fixation (2,5% de glutaraldéhyde qualité microscopie électronique, 5mM de chlorure de calcium (CaCl₂), 0,1M de cacodylate de sodium) pendant 5min à température ambiante, puis pendant 1h sur glace. A partir de cette étape, l'intégralité de l'expérimentation s'est déroulée sur glace et avec des solutions conservées à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées cinq fois pendant 2min dans la solution tampon (0,1M de cacodylate de sodium). Le blocage a été réalisé pendant 15min avec une solution de blocage contenant 10mM de glycine, 10mM de cyanure de potassium dilué dans 0,1M de cacodylate de sodium. Le marquage de l'ADN est réalisé par une incubation pendant 10min dans une solution contenant 0,1% de saponine, 0,1M de cacodylate de sodium et 10µM de DRAQ5™ (Biostatus). L'excès de DRAQ5™ est ensuite éliminé par trois lavages de 5min avec la solution de blocage. Les cellules sont ensuite incubées dans 2,5mM de 3,3'-Diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) (Sigma®) dilué dans 0,1M de cacodylate de sodium.

ii. Photo-oxydation

L'apparition d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) favorisant la polymérisation du DAB a été induite par une illumination prolongée sur le microscope confocal inversé spinning-disk comprenant un système DMI8 de Leica, équipé d'une unité de disque tournant CSU-X1 (Yokogawa) et d'une caméra Evolve EMCCD. Le microscope est piloté par le logiciel Inscoper. La photo-oxydation a été induite à l'objectif 25x et par épifluorescence via une illumination à 638nm continue pendant 7 à 15min et avec un filtre d'émission Cy5.

A la suite de la photo-oxydation, les cellules ont été lavées cinq fois pendant 2min avec 0,1M de sodium cacodylate. Le contraste de la chromatine est réalisé par ajout d'une solution contenant 2% d'osmium tetroxide, 2mM de CaCl₂, 1,5% de potassium de ferrocyanide et 0,15M de sodium cacodylate pendant 30min. Les cellules sont ensuite lavées 5 fois avec de l'eau Milli Q.

iii. Déshydratation des échantillons

La déshydratation se fait via un cycle successif de doubles bains d'éthanol d'une durée de 10min et dont la concentration est croissante au cours de ce processus. La première incubation de 50% d'éthanol est remplacée immédiatement par un premier bain à 70% d'éthanol pendant 10min. Ce bain est renouvelé une nouvelle fois pendant 10min avant d'être remplacé par un bain à 80% d'éthanol. Comme pour l'incubation avec 70%, deux bains à 80 % et ensuite à 90% sont réalisés avant que les cellules ne soient incubées avec 100% d'éthanol pendant 20min. Le dernier bain à 100% d'éthanol est à nouveau renouvelé pendant 20min.

iv. Inclusion des cellules en résine

Après élimination de l'éthanol, l'inclusion en résine, composée d'un mélange de DDSA (Sigma-Aldrich), Epon 812 (Sigma-Aldrich), Araldite® M (Sigma-Aldrich) et du durcisseur Dmp30 (Sigma-Aldrich) en proportions respectives de 56, 23, 19,5 et 1,5%, est effectuée via de dépôt de quelques gouttes de cette résine dans le puit. La résine sera solidifiée pendant 1h à 37°C. Le surplus sera enlevé et à nouveau une incubation d'une heure à 37°C sera effectuée en présence de quelques gouttes de résine. L'excès non solidifié sera encore une fois éliminé avant de laisser les cellules dans quelques gouttes de résine pendant 24h à 37°C. Le lendemain, des gélules en plastique sont incorporées dans les puits avant que l'ensemble ne soit remis à incuber à 37°C pendant 48h. la résine est ensuite déposée à l'intérieur des gélules et se solidifie à 60°C pendant au minimum 24h. Les gélules sont dissociées du reste et la capsule en plastique est également éliminée, pour ne garder que la résine contenant désormais les cellules photo-oxydées.

v. Coupe et imagerie

La résine est ensuite coupée en fine section de 70 à 90nm à l'aide d'un Ultramicrotome UC7 de Leica. Les fines sections de résine contenant les cellules sont ensuite déposées sur grille et imagées au microscope électronique JEOL 1400 à 120kV équipé d'une caméra Gatan Orius 1000. Les images ont été acquises avec le logiciel Digital Micrograph. Les éléments cellulaires denses aux électrons seront contrastés, parmi ceux-ci on retrouvera la chromatine.

B. Imagerie des cellules par microscopie confocale

Les cellules sont placées sur le microscope inversé Axio Observer7 (Zeiss) muni d'un système confocal LSM 880 Airyscan (Zeiss) au sein d'une enceinte maintenant les cellules vivantes à 37°C. Les imageries en cellules vivantes et des marquages par immunofluorescence ont été réalisées à l'objectif 63x à immersion à huile (ouverture numérique de la lentille N.A. 1,4) et à l'aide de 3 ou 4 lasers selon les besoins : les lasers de type diode émettant à 405nm et à 561nm, le laser argon émettant à 488nm et/ou le laser à hélium et néon (HeNe) émettant à 633nm. En présence de leur filtre d'émission correspondant, le niveau d'excitation des fluorophores est optimisé afin de pouvoir distinguer correctement la fluorescence. La détection de l'émission de fluorescence a été réalisée par les détecteurs spectraux GaAsP ou par le détecteur Airyscan. L'acquisition d'images a été paramétrée à l'aide du logiciel Zen black. Avec celui-ci, la taille du pixel a été défini à environ 0,07µm, l'intensité de fluorescence a été moyennée 4 ou 8 fois et un trou d'épingle (pinhole) réglé à une unité Airy dans le cas où les détecteurs GaAsP ont été utilisés.

C. Analyse de la dynamique d'organisation de la chromatine au cours de l'expression de TET1

L'expression progressive de la protéine TET1 couplée à la GFP et du contrôle GFP ont été suivies au cours du temps en parallèle de l'organisation de la chromatine révélée par la distribution spatiale de l'histone H2B. L'acquisition des images de fluorescence de H2B-mcherry et de la GFP ou de TET1-GFP a été réalisée sur plus

de 24h sur le microscope inversé Axio Observer7 (Zeiss) muni d'un système confocal LSM 880 Airyscan (Zeiss). L'imagerie en cellules vivantes a été réalisée à l'objectif 63x à immersion à huile (ouverture numérique de la lentille N.A. 1,4) au sein d'une enceinte chauffée à 37°C. L'acquisition d'images a été paramétrée à l'aide du logiciel Zen black. A l'aide de ce logiciel, plusieurs positions en X et en Y ont été sélectionnées et suivies sur ces 24h. Afin de conserver le plan focal, plusieurs plans en Z distancés de 1µm ont été réalisés. Les paramètres d'excitation de la GFP ont été définis d'après des conditions d'imageries précédemment réalisées. La détection de l'émission de fluorescence a été réalisée par les détecteurs spectraux GaAsP.

La distribution spatiale de l'histone H2B a été caractérisée en utilisant le plugin « GLCM_Texture.class » créée par Julio E. Cabrera, avec le logiciel Fiji. Le contraste issu de cette analyse correspond à la différence d'intensité entre des pixels séparés par une distance de 10 pixels, distance définie par nos soins et qui correspond à l'épaisseur moyenne d'une fibre chromatinienne observée en présence de TET1.

Les courbes d'expression de TET1 et de la GFP ont été normalisées à 0 et à 1 à partir des valeurs minimales et maximales d'expression protéiques et alignées à la moitié du niveau de fluorescence (0,5). La correction du décalage temporel entre les courbes d'expression protéiques a aussi été appliquée à celles représentant l'évolution du contraste du signal H2B.

D. Analyse de dynamique des protéines par retour de fluorescence (FRAP)

i. Imagerie du retour de fluorescence après photoblanchiment

Les cellules transfectées exprimant la protéine d'intérêt fusionnée à la GFP ou m-cherry sont incubées dans le milieu d'imagerie L15 puis disposées sur un microscope, au sein d'une enceinte chauffée à 37°C afin d'étudier leurs dynamiques. Les expériences de FRAP sur H1, le macrodomaine de H2A1.1, PARP1, ALC1 et les fragments protéiques de TET1 ont été réalisés à l'objectif 63X à immersion à huile (ouverture numérique de la lentille (N.A.) 1,4) avec un microscope confocal inversé Spinning Disk comprenant un système Nikon Ti-E, d'une unité de disque tournant

CSU-X1 (Yokogawa) et d'une caméra sCMOS ORCA Flash 4.0 (Hamamatsu). Les paramètres d'acquisition d'images et de FRAP sont déterminés à l'aide des logiciels Metamorph et iLas2. Une zone de photoblanchiment circulaire de 40 pixels de diamètre est définie manuellement au noyau. Cette zone est illuminée 7 fois consécutives (durée totale d'illumination=69ms) à pleine puissance via la raie laser à 488nm (pour la GFP) ou 561nm (pour la mCherry). Le retour de fluorescence de ces protéines a été suivi pendant environ 25 ou 50 secondes par acquisition en continu à la cadence de 4 images par seconde.

Le FRAP de l'histone H2B a été effectué sur le microscope inversé Axio Observer7 (Zeiss) muni d'un système confocal LSM 880 Airyscan (Zeiss). L'imagerie en cellules vivantes a été réalisée à l'objectif 63x à immersion à huile (ouverture numérique de la lentille N.A. 1,4) au sein d'une enceinte chauffée à 37°C. L'acquisition d'images a été paramétrée à l'aide du logiciel Zen black. A l'aide de ce logiciel, plusieurs positions en X et en Y ont été sélectionnées et suivies sur ces 24h. Afin de conserver le plan focal, plusieurs plans en Z distancés de 1µm ont été réalisés en plus de l'utilisation du Definite focus. La moitié du noyau de cellules exprimant de manière stable l'histone H2B couplée au fluorophore mcherry a été photoblanchie 7 fois consécutives à pleine puissance via la raie laser 561. La détection de l'émission de fluorescence a été réalisée par les détecteurs spectraux GaAsP. Le retour de fluorescence a été mesuré toutes les heures pendant environ 8h.

ii. Analyse de la dynamique de retour de fluorescence

La dynamique du retour de fluorescence des différentes protéines étudiées a été quantifiée comme suit. Les intensités moyennes de fluorescence dans la zone photoblanchie (I_{roi}) et dans la totalité du noyau (I_n) a été mesurée au cours du temps ainsi que le signal de fond (I_{bg}), estimé par une mesure d'intensité à l'extérieur des cellules. La contribution du fond ainsi que le blanchiment du noyau (au moment du FRAP et du fait de l'acquisition de la séquence d'images), ont été corrigés grâce à la formule suivante :

$$I = \frac{(I_{roi} - I_{bg})}{(I_n - I_{bg})}$$

Ces données ont ensuite été corrigées du signal résiduel post-blanchiment puis normalisées par rapport à l'intensité pré-blanchiment. Le temps caractéristique de retour de fluorescence, représentant le temps nécessaire pour un retour de la moitié du signal initial au sein de la zone blanchie, est estimé sur les courbes ainsi obtenues.

E. Analyse de la diffusion de H1 par spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)

Les données de FCS de H1-GFP, en absence ou en présence de TET1 (pcDNA3-mTET1), ont été obtenues à l'objectif 63x (ouverture numérique de la lentille N.A. 1,2) à immersion à eau, avec le microscope inversé confocal Leica TCS SP8 (Leica DMI 6000) au sein d'une enceinte chauffée à 37°C. La fluorescence de la GFP a été excitée à l'aide d'un laser émettant à 488nm laser et dont l'émission est filtrée entre 500 et 550nm. Les mesures de FCS ont été réalisées à une faible puissance laser afin d'éviter le photoblanchiment du fluorophore. Les photons émis par la fluorescence de la GFP excitée ont été détectés et comptés via le système de convertisseur de signal lumineux en signal électrique Avalanche Photodiode (APD) associé au module PicoHarp (PicoQuant). Chaque acquisition de FCS a été réalisée pendant 30sec, et les fluctuations de fluorescence obtenues au cours du temps ont été autocorrélées via le logiciel Fluctuation Analyzer (Wachsmuth et al. 2015). Les données ont ensuite été normalisées sur les premières valeurs élevées de la courbe puis moyennées.

RESULTATS

L'initiation du processus de transcription est associée à un remaniement de l'organisation de la chromatine. L'expression génique est, en effet, corrélée à une structure relâchée de la chromatine. Plusieurs mécanismes participent à cette réorganisation chromatinienne. Parmi ceux-ci, on retrouve l'action de remodeleurs de la chromatine. Ces derniers repositionnent les nucléosomes de manière dépendante de l'ATP. Leur activité permet notamment de rendre la séquence nucléotidique accessible aux autres facteurs protéiques impliqués dans la transcription. En plus de la modulation du positionnement des nucléosomes, au sein de ceux-ci, des variants d'histone peuvent y être incorporés, modulant les interactions histone-histone et /ou histone-ADN. Au sein de régions régulatrices certaines histones telles que H1 et H3 se trouvent plus faiblement représentées favorisant également une structure décompactée de la chromatine. De plus, les histones peuvent également être modifiées par ajouts de marques post-traductionnelles associées à l'activation de la transcription. Ces marques épigénétiques ne sont pas seulement trouvées sur la queue des histones, elles sont également présentes sur certaines bases nucléiques de l'ADN, comme la cytosine. L'accumulation de la 5hmC, un dérivé oxydé de la 5mC résultant de l'activité enzymatique des TET, au sein de régions régulatrices participe à l'élaboration d'un environnement chromatinien favorable pour l'expression génique. En effet, la 5hmC empêche le recrutement de répresseurs transcriptionnels. De plus, l'enrichissement en 5hmC est associé à la présence de marques positives pour l'expression génique et à une ouverture chromatinienne. La protéine TET1 responsable de l'accumulation de la 5hmC peut également, indépendamment de son activité enzymatique, moduler l'architecture chromatinienne par le recrutement de modificateurs de celle-ci. Bien qu'il existe une relation évidente entre la protéine TET1 et son activité enzymatique sur l'organisation de la chromatine, l'implication exacte de cette dioxygénase dans ce processus reste à déterminer. Récemment une nouvelle isoforme de TET1 (TET1-courte) a été décrite comme étant surexprimée dans certains cancers (Good et al. 2017). TET1-courte est dépourvu du domaine N-terminal (NTER) de l'isoforme TET1-longue et ces deux isoformes régulent différemment les processus de transcription. Le rôle du domaine NTER est peu décrit dans la littérature. Il a été proposé que cette région protéique serait responsable de l'accumulation de TET1 sur la chromatine. Le domaine en doigt de zinc CXXC

localisé dans la région NTER permet de cibler TET1 préférentiellement au sein de régions CGI. Dans la première partie ci-dessous, je présenterai mes travaux visant à mieux caractériser le rôle de la protéine TET1, et en particulier celui de son domaine N-terminale dans l'organisation de la chromatine. Mes résultats mettent en évidence un rôle de ce domaine de TET1 dans l'établissement d'une structure chromatiniennne dense et réfractaire à la transcription. Dans la deuxième partie de ce projet, je me suis intéressée à la relation entre l'activité enzymatique de TET1 et la réparation des dommages à l'ADN. En effet, il existe des liens marqués entre activité des TET et réparation. Ainsi, les étapes suivant le processus d'oxydation de la 5mC par TET1 correspond à des processus d'excision des bases modifiées suivies de restauration d'une cytosine non-méthylée. Par ailleurs, il a été montré que les protéines TET sont recrutées aux dommages et semblent contribuer au processus de réparation (Kafer et al. 2016; D. Jiang et al. 2015; 2017).

I. Analyse de l'effet des protéines TET sur l'organisation chromatinienne

A. La surexpression de TET1 et de TET2 mais pas TET3 induit une réorganisation de la chromatine

Afin de caractériser le rôle des protéines TET dans l'organisation de la chromatine, les cellules U2OS issues d'ostéosarcome humain ont été transfectées avec des plasmides d'expression codant pour TET1, TET2 ou TET3 murines (Fig 1.A). Dans le but de contrôler facilement leur expression, ces trois isoformes sont fusionnés à la protéine fluorescente « green fluorescent protein » (GFP).

En marquant la chromatine au Hoechst et par analyse en microscopie confocale, il apparaît que les isoformes TET1-GFP et TET2-GFP se localisent principalement au niveau du noyau des cellules U2OS. TET3-GFP est quant à elle majoritairement nucléaire mais se trouve également présente au niveau du cytoplasme. Dans les conditions contrôles, c'est-à-dire en présence de GFP seule, la chromatine présente une distribution relativement homogène au sein du noyau. La surexpression de TET1-GFP et de TET2-GFP, mais pas de TET3-GFP, induit une redistribution globale de la chromatine avec une ségrégation entre des régions densément marquées au Hoechst et d'autres dépourvues de marquage (Fig1.B). La distribution de TET1 et TET2 colocalise avec celle de la chromatine. Ainsi la surexpression de TET1 ou de TET2, mais pas celle de TET3, semble provoquer une réorganisation structurale globale de la chromatine dans les cellules U2OS.

Le phénomène de réorganisation chromatinien semble plus marqué en cas de surexpression de TET1 comparé à celle de TET2. Nous avons donc décidé de poursuivre ce travail en nous focalisant principalement sur l'étude des changements d'architecture chromatinienne induits par la présence de TET1.

B. La surexpression de TET1 favorise la ségrégation de la chromatine du nucléoplasme

Dans le but de définir plus précisément l'architecture de la chromatine en présence de TET1, celle-ci a été analysée par microscopie électronique à transmission (TEM). Cette technique d'imagerie à haute résolution permet d'étudier l'organisation spécifique des fibres chromatiniennes en présence et en absence de TET1. Cependant, pour obtenir des images contrastées, il est nécessaire d'utiliser des agents de contraste denses aux électrons se fixant sur les structures d'intérêt. Dans le cas de la chromatine, ce marquage implique généralement divers traitements acides qui tendent à dénaturer la conformation native de celle-ci. Une étude, décrite par Ou et al, a récemment proposé une méthode de contraste de la chromatine permettant de préserver son architecture (Ou et al. 2017). Après fixation par traitement au glutaraldéhyde de cellules U2OS surexprimant ou non TET1-GFP, l'ADN est marqué par du DRAQ5, une anthraquinone excitée dans le rouge lointain. Ce fluorophore lie la double hélice au sein du petit sillon de manière indépendante de la séquence ADN. L'illumination prolongée en épifluorescence du DRAQ5 induit l'apparition locale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui favorise la polymérisation locale d'une autre molécule : le Diaminobenzidine (DAB). L'osmium, dense aux électrons, possède une forte affinité pour les polymères de DAB. L'ajout de ce composant permet donc de contraster les zones riches en DAB, qui correspondent ici à la fibre chromatinienne (Fig 1C). Ainsi, alors qu'en l'absence d'illumination permettant d'induire la polymérisation du DAB, les images de TEM apparaissent peu contrastées au sein du noyau, après polymérisation, un contraste prononcé est observé au niveau de l'ADN (Fig1.D). Au sein des cellules non transfectées, l'organisation de la chromatine apparaît relativement homogène, avec un contraste plus important au niveau des nucléoles. En revanche, en cas de surexpression de TET1, on note une ségrégation spatiale entre des zones denses en chromatine et des régions qui en sont quasiment dépourvues (Fig 1D, panel du bas, au milieu) suggérant que ces régions sont dépourvues de chromatine. En accord avec les images obtenues en microscopie optique, la surexpression de TET1 semble

se traduire par une séparation entre une « phase chromatiniene » et le reste du nucléoplasme (Fig1D, panel du bas, à droite).

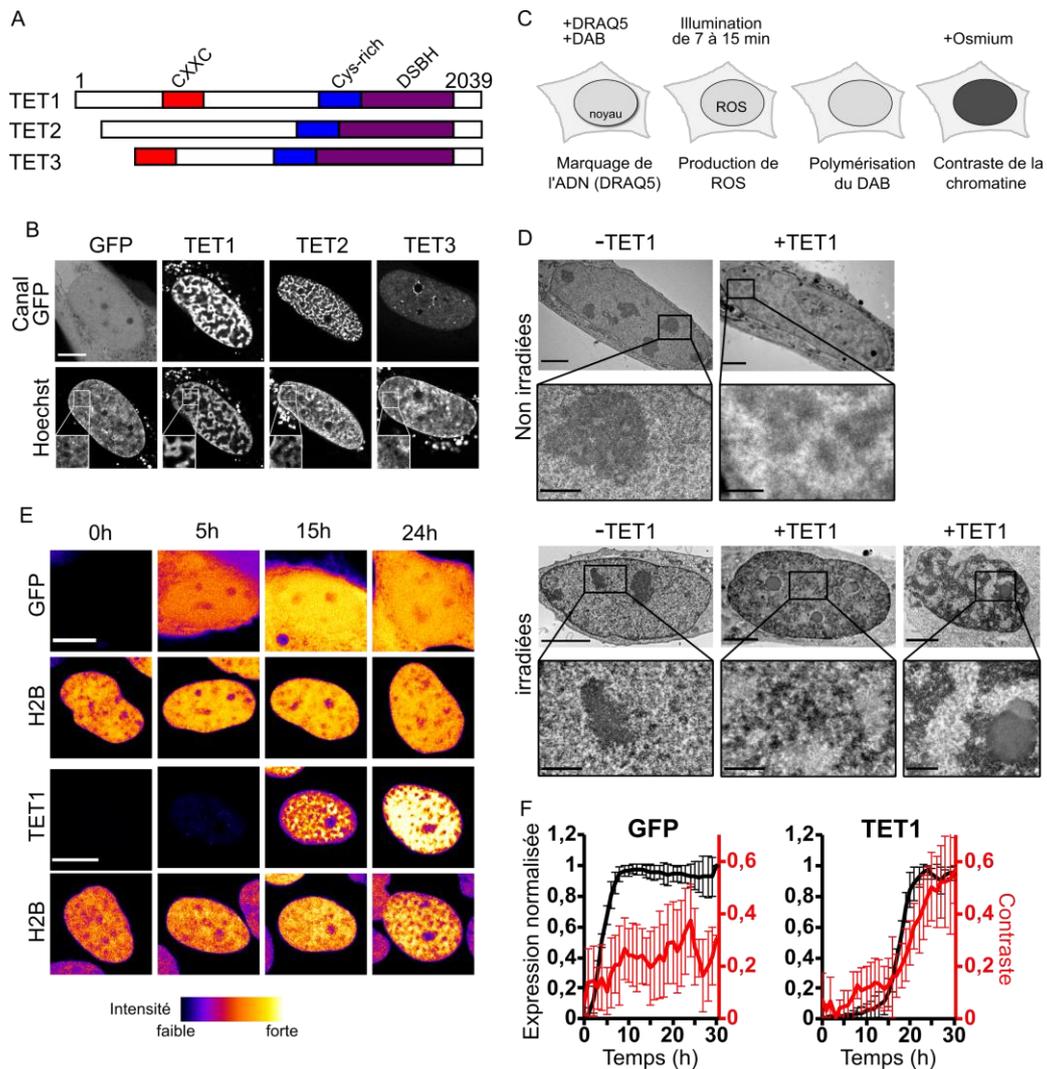


Figure 1. La surexpression de TET1 induit une séparation de la chromatine du nucléoplasme. A) Représentation des isoformes de la famille des TET et de leurs domaines protéiques. CXXC= domain en doigt de zinc, Cys-rich= domaine riche en cystéines, DSBH= domaine structural en hélices ; B) Les cellules U2OS ont été transfectées avec TET1-GFP, TET2-GFP, TET3-GFP ou la GFP seule (panel du haut) et la chromatine a été colorée à l'aide de Hoechst (panel du bas). Barre d'échelle=10µm; C) Schéma descriptif de la technique de contraste de la chromatine en microscopie électronique d'après ou et al., 2017. D) Après transfection des cellules U2OS avec TET1-GFP ou non, celles-ci ont été fixées par du glutaraldéhyde. La chromatine a ensuite été colorée par du DRAQ5 et contrastée par irradiation laser en présence de DAB (panel du bas), ou non (panel du haut). Barre d'échelle=2µm et 1µm pour le zoom D) Imagerie de l'expression de TET1-GFP ou la GFP seule, et de l'organisation de H2B-mcherry qui varie au cours du temps. F) Quantification de la réorganisation de la chromatine (contraste) et de l'expression de TET1-GFP ou de la GFP seule. N=1 avec une douzaine de cellules par condition. Barre d'échelle=10µm.

C. La dynamique d'apparition du réarrangement chromatinien est dépendante du niveau d'expression de TET1

Dans le but de mieux comprendre comment la chromatine se restructure en présence de TET1, nous avons ensuite cherché à suivre la dynamique d'apparition de cette réorganisation suite à l'induction de l'expression de TET1 dans les cellules. Après transfection transitoire des vecteurs TET1-GFP et GFP seule dans des cellules U2OS exprimant de manière stable l'histone H2B fusionnée à la mcherry, les niveaux d'expression de TET1 et le niveau de restructuration de la chromatine ont été analysés au cours du temps (Fig 1 E). L'état de structuration de la chromatine, marqué par l'histone H2B fusionnée à la protéine fluorescente mCherry, est mesuré à l'aide d'un plugin GLCM-texture disponible sur le logiciel d'analyse d'image Image J. Cet outil compare l'intensité d'un pixel à celle des pixels situés à une distance définie, mesurant ainsi un contraste d'intensité. Ici, nous avons choisi une distance de 10 pixels, correspondant à la taille caractéristique des zones denses en chromatine observées en cas de surexpression de TET1. Ainsi, l'amplitude du contraste sera corrélée à l'apparition des structures chromatinienne d'intérêt.

Nous avons suivi en parallèle, pendant 30h, l'évolution du niveau de fluorescence dans le canal GFP et les variations de l'architecture chromatinienne dans le canal mcherry. Les courbes de fluorescence ont tout d'abord été normalisées entre 0 et 1 pour chaque cellule. Ensuite, la croissance de l'expression de la GFP ou de TET1-GFP n'étant pas synchronisée, les courbes de mesure de fluorescence obtenues pour chaque cellule ont été recalées par rapport au temps correspondant à un niveau de fluorescence égal à la moitié du niveau maximal. Le même recalage a ensuite été appliqué aux courbes de contraste. Il a alors été possible de moyenniser les courbes obtenues pour les différentes cellules.

Au cours du temps, l'expression de la GFP augmente jusqu'à atteindre un plateau. En parallèle, le contraste reste constant sur les 30h d'acquisition, suggérant que la structure chromatinienne n'est pas modifiée par l'expression de la GFP. En revanche, on observe une augmentation simultanée de l'expression de TET1 et du contraste de la structure chromatinienne, mettant en évidence une restructuration progressive de

la chromatine corrélée à l'augmentation des niveaux de TET1 au sein des noyaux (Fig1.F).

D. Le réarrangement chromatinien n'est pas le résultat de l'activité catalytique de TET1

L'accumulation de 5hmC est associée à des marques d'histones favorables à la transcription et à l'ouverture de la chromatine lorsqu'elle se trouve au sein de régions régulatrices. Par ailleurs la protéine longue TET1 interagit et recrute des protéines pouvant modifier la chromatine. Il apparaît donc essentiel de définir si le réarrangement de la chromatine observé en cas de surexpression de TET1, est dépendant de son activité catalytique.

Pour cela, les cellules U2OS ont été transfectées avec la forme longue et active de la protéine de TET1 (TET1-longue renommée FL) ou avec le mutant catalytiquement inactif (FL-mut) (Fig2. A), toutes deux associées au fluorophore GFP. La structure de la chromatine observée par marquage au Hoechst révèle que celle-ci se trouve ségréguée du nucléoplasme que ce soit en présence de l'enzyme active ou inactive. Ces données suggèrent donc que ce phénomène est indépendant de l'activité catalytique de TET1 (Fig2. A).

E. La région N-terminale de TET1 est responsable de la restructuration de la chromatine

L'effet de restructuration de la chromatine en présence de TET1 n'étant pas lié à son activité catalytique, nous avons cherché à déterminer si un domaine particulier de cette protéine pouvait être à l'origine de ce phénomène. L'enzyme TET1 possède des régions distinctes (Fig2. B). La partie N-terminale (NTER) contient un domaine CXXC permettant de cibler TET1 au niveau de régions riches en CpG non méthylés. La partie C-terminale (CTER, correspondant à l'isoforme TET1-courte) possède le domaine catalytique impliqué dans l'oxydation successive de la 5mC.

Après surexpression de ces domaines protéiques, nous avons étudié en parallèle l'architecture chromatinienne, via un marquage des cellules au Hoechst, et les

niveaux de 5hmC, par immunofluorescence (Fig 2.C et D). Les cellules U2OS exprimant le domaine CTER présentent un niveau élevé de 5hmC, et une architecture chromatinienne similaire à celle des noyaux contrôles (Fig2. C). En revanche, la présence du domaine N-terminal de TET1, qui ne module pas la balance 5mC/5hmC, entraîne une réorganisation de la chromatine (Fig2.C). Ces données confirment que la restructuration de la chromatine est indépendante de l'activité enzymatique de la protéine TET1 et serait un phénomène dépendant de la présence de son domaine N-terminal.

La région N-terminale de TET1 est très peu décrite dans la littérature hormis le domaine CXXC. Celui-ci est un domaine en doigt de zinc ciblant préférentiellement les CGI et qui présente une forte affinité pour la chromatine. Afin de déterminer si la restructuration de la chromatine induite par la présence du NTER est due au domaine CXXC, l'architecture de la chromatine des cellules U2OS exprimant la protéine longue tronquée du domaine CXXC (Δ CXXC) a été analysée via un marquage au Hoechst. Malgré la délétion du domaine CXXC, la chromatine se retrouve ségréguée du nucléoplasme de manière similaire à celle observée en présence du NTER et du FL (Fig2. C).

De manière importante, nous avons aussi observé que cette réorganisation chromatinienne induite par la présence du domaine NTER de TET1 n'est pas spécifique de la lignée U2OS utilisée jusqu'à maintenant. En effet, un phénotype similaire est observé en cas d'expression de la région NTER dans des cellules Hela et MCF-7 (Fig2. E).

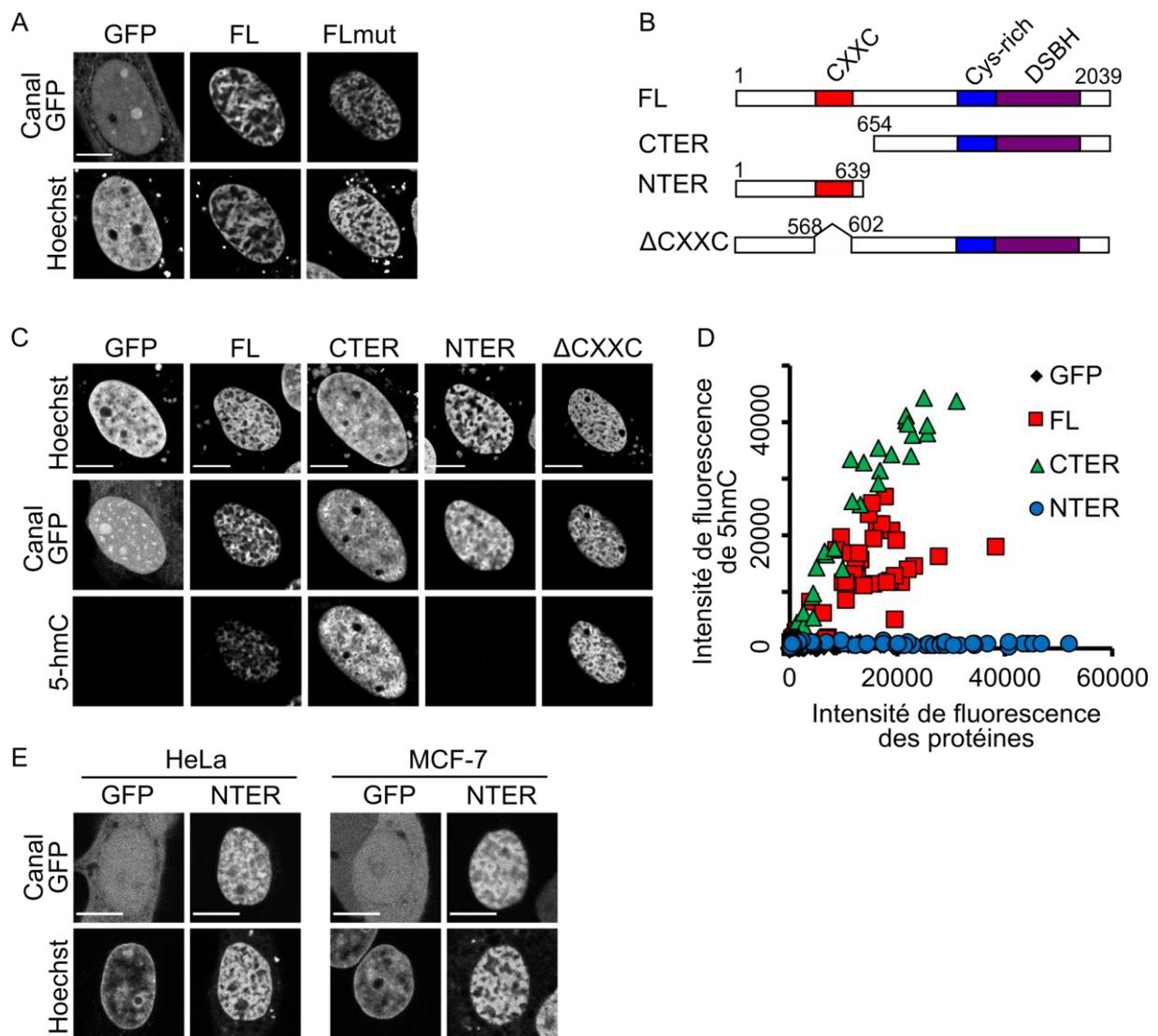


Figure 2. Le réarrangement chromatinien n'est pas dépendant de l'activité enzymatique de TET1 mais de sa région N-terminale. A) Imagerie de la chromatine marquée par du Hoechst (panel du bas), des cellules U2OS exprimant la protéine entière active (FL-GFP) ou inactive (FLmut-GFP) ou la GFP seule. B) Représentation des fragments protéiques de TET1. C) Imagerie de 5hmC révélée par immunofluorescence, en présence du FL, CTER, NTER, ΔCXXC ou de la GFP seule. D) Représentation du niveau de 5hmC en fonction de l'expression des différents fragments protéiques de TET1, de TET1 ou de la GFP. N=1 avec une centaine de cellules par condition. E) Imagerie de la chromatine, marquée à l'aide Hoechst (panel du bas) en présence du NTER (panel du haut) chez les cellules HeLa et MCF-7. Barre d'échelle=10µm.

Le domaine NTER étant impliqué dans l'association de TET1 avec l'ADN, nous avons aussi cherché à caractériser la dynamique d'association de ces différentes constructions avec la chromatine. Cette analyse a été réalisée par la technique de « fluorescence recovery after photobleaching » (FRAP). Le FRAP consiste à photoblanchir la fluorescence d'un fluorophore couplé à une protéine dans une zone définie, ici une sous partie du noyau (Fig3. A), et d'étudier le temps nécessaire au retour de fluorescence dans cette zone blanchie (Fig 3. A). Une protéine présentant une forte association à la chromatine sera caractérisée par un retour de fluorescence lent et *vice versa*. Le signal de fluorescence a ainsi été mesuré au cours du temps au sein de la zone blanchie et, après suppression du bruit de fond et normalisation par rapport à l'intensité de la zone avant le photoblanchiment. Afin de comparer les dynamiques de retour de fluorescence pour les différentes constructions, nous avons enfin mesuré pour chacune d'entre elles le niveau moyen de retour de fluorescence 10s après photoblanchiment. Les mesures d'intensité de fluorescence dans la zone photoblanchie démontrent que la protéine entière FL a une dynamique d'échange très lente comparée à la GFP (Fig3. B-D). Cette dynamique lente de TET1, suggère que celle-ci se lie fortement avec la chromatine. Par ailleurs, la comparaison de la dynamique des régions CTER et NTER de TET1 montre que la région NTER s'associe plus fortement à la chromatine. Il semble donc, en accord avec les données de la littérature (W. Zhang et al. 2016), que la région NTER de TET1 contribue à son association avec la chromatine.

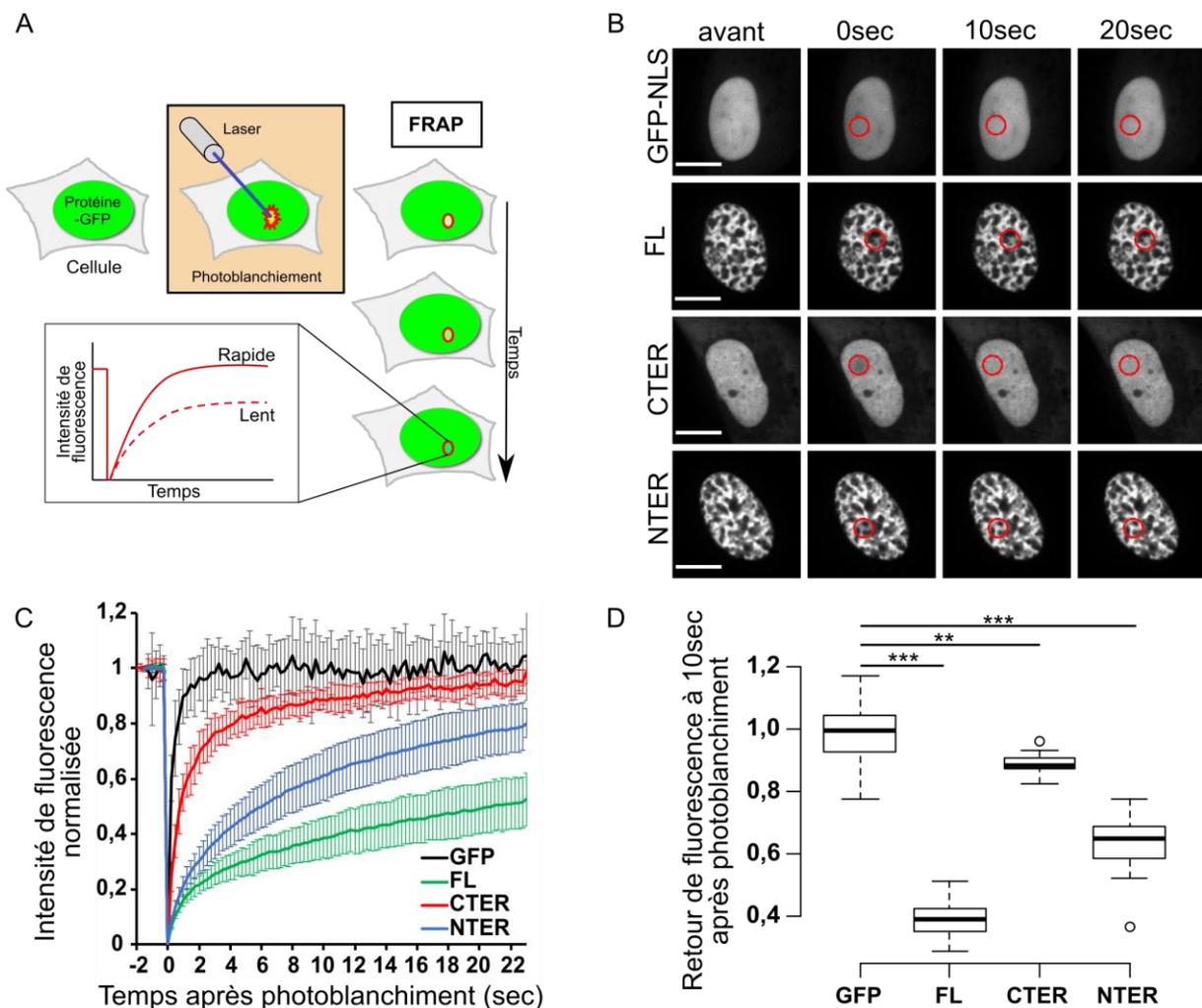


Figure 3. La région N-terminale de TET1 a une dynamique d'échange plus lente que le variant de TET1. A) Schéma de la technique de FRAP. B) Imagerie de FRAP de la GFP couplée à une séquence de localisation nucléaire, du FL, du CTER et du NTER. C) Courbes normalisées représentatives du retour de fluorescence des régions protéiques de TET1 et de la GFP. D) Retour de fluorescence à 10sec après photoblanchiment de la GFP-NLS, du FL, du CTER et du NTER. N=2 avec une quinzaine de cellules par condition. T.test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Barre d'échelle=10 μ m

En conclusion, les données présentées dans cette section montrent que la région N-terminale de TET1, qui possède une forte affinité pour la chromatine, est responsable d'une réorganisation de la chromatine de manière indépendante du domaine CXXC.

F. L'expression du domaine N-terminal de TET1 altère la dynamique des histones H1 et H2B

D'après les analyses précédemment réalisées en microscopie confocale, le domaine NTER de TET1 réorganise l'agencement des fibres chromatiniennes. Nous avons cherché à déterminer si cette réorganisation était associée à des modifications de la dynamique des composants élémentaires de la chromatine, à savoir les histones.

L'histone H1, un des composants de la fibre chromatinienne, est localisé au niveau du site d'entrée/sortie de l'ADN sur le nucléosome. Sa présence est associée à la formation de nanodomains compactes de chromatine correspondant à des structures hétérochromatiniennes (Ricci et al. 2015). La déplétion de H1 entraîne une décompaction générale de la chromatine et affecte l'organisation des compartiments A et B ainsi que la distribution de marques d'histones telles que H3K27me3 et H3K36me2 (Willcockson et al. 2021). Ainsi l'abondance de H1 favorise un état condensé de la chromatine. Par ailleurs, des études de FRAP ont permis d'identifier que la dynamique d'échange de H1 corrèle avec l'état de condensation de la chromatine. Alors, qu'une dynamique d'échange rapide est observée en euchromatine (D. Chen et al. 2005; Lever et al. 2000; Misteli et al. 2000), celle-ci est fortement ralentie dans les régions hétérochromatiniennes (Misteli et al. 2000) et lors de la mitose (D. Chen et al. 2005).

Afin de caractériser l'impact de l'expression du NTER sur le comportement de H1, la dynamique d'échange de cette histone a été analysée par FRAP en présence du NTER-GFP ou de la GFP. Pour cela une région définie au sein du noyau de cellules U2OS en interphase a été photoblanchie à l'aide d'un laser (Fig4. A). Le retour de fluorescence dans cette zone a été quantifié en présence du NTER-GFP ou de la GFP (Fig4. B). L'expression du NTER augmente la dynamique d'échange de H1 en comparaison à la situation contrôle. En effet, le taux de retour de fluorescence de H1 en présence du NTER est plus élevé à 10sec après photoblanchiment qu'en condition contrôle (Fig4.C). En plus de cet effet sur la dynamique d'échange, dans certains cas l'histone H1 semble s'accumuler au sein de nucléoles lorsque le NTER est exprimé (Fig4.D), suggérant l'existence d'une population d'histone non liées à la

chromatine. Il apparaît donc que la présence du NTER tend à déstabiliser l'association de H1 sur la chromatine. Par conséquent, la chromatine ségréguée du reste du nucléoplasme en présence du domaine NTER semble avoir des caractéristiques différentes de celles observées dans les régions compactes telles que l'hétérochromatine.

Nous avons cherché à confirmer ces résultats via une autre approche permettant notamment de mesurer plus localement la dynamique d'échange entre H1 et la chromatine. Nous avons ainsi eu recours à la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Cette méthode se fonde sur l'analyse des fluctuations de signal de fluorescence correspondant à l'entrée et à la sortie de protéines marquées en fluorescence du volume d'excitation confocal, dont la position est fixée au niveau d'une région d'intérêt à l'intérieur de la cellule. L'autocorrélation des fluctuations de fluorescence permet d'accéder à la dynamique temporelle de ces fluctuations, qui est elle-même directement liée à la vitesse de déplacement des molécules marquées dans le volume confocal. Ainsi, une décorrélation rapide du signal sera le signe d'une dynamique moléculaire rapide et inversement (Fig4.E). Il est ainsi possible de mesurer par FCS la dynamique locale d'une protéine d'intérêt au sein du volume confocal alors que l'approche par FRAP donne accès à une dynamique moyenne sur une zone plus large.

La mobilité de l'histone H1-GFP a été ainsi analysée en FCS en présence de la protéine entière TET1 dans les zones où la chromatine est ségréguée (caractérisées par un marquage H1 intense) et celles où elle est supposément absente (caractérisées par un marquage H1 faible), et comparée à la dynamique de cette histone dans des noyaux contrôles ne surexprimant pas TET1. Les mesures réalisées montrent une accélération de la dynamique de l'histone H1 en présence de TET1, en accord avec les données de FRAP (Fig4.F). De plus, cette dynamique apparaît extrêmement rapide dans les régions où la chromatine semble absente, renforçant l'idée de l'existence d'une population libre de protéines H1 (Fig4.F).

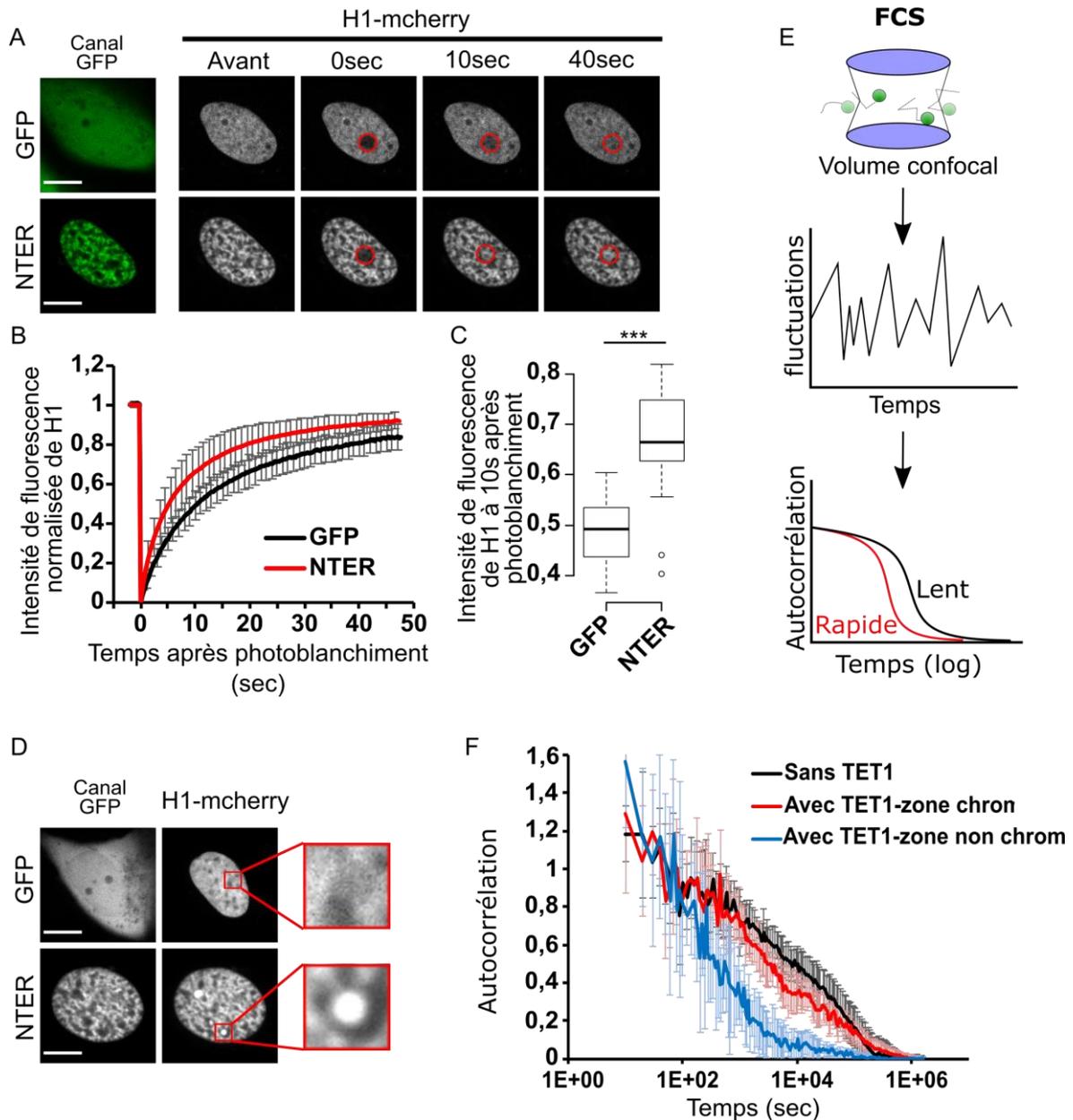


Figure 4. La dynamique d'échange de l'histone de liaison H1 est augmentée en présence du domaine NTER de TET1. A) Imagerie de FRAP de H1-mcherry, avant, après, à 10 secondes et à 40 secondes après photoblanchiment en présence de la GFP (panel du haut) ou du NTER-GFP (panel du bas). B) et C) Quantification du retour de fluorescence de H1 dans la zone photoblanchie et du niveau de fluorescence de H1 à 10sec après photoblanchiment dans les deux conditions. N=3 avec une vingtaine de cellules par condition. D) Imagerie de la fluorescence de H1-mcherry en présence de la GFP ou du NER-GFP. E) Représentation de la technique de FCS. F) Mesure de la diffusion de H1-GFP dans le volume confocal illuminé pendant 30 secondes, en absence "sans TET1", ou en présence de TET1 sur la chromatine "Avec TET1-zone chrom" ou en dehors de la chromatine "Avec TET1-zone non chrom". N=1 avec une dizaine de cellules par condition. Barre d'échelle=10µm; Test-t, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

L'histone H2B est une des quatre histones de cœur qui composent le nucléosome. Sa dynamique d'échange étant plus lente que celle de H1 (Kimura et Cook 2001), l'analyse de la dynamique de retour de fluorescence après photoblanchiment été menée sur plusieurs heures (Fig5. A). Il apparaît que, contrairement à la dynamique de H1, celle de H2B est ralentie en présence du domaine NTER de TET1 (Fig5. B et C). Ainsi, 4h après photoblanchiment, le retour de fluorescence dans la zone blanchie est significativement plus faible en cas d'expression de la partie N-terminale de TET1 comparé au contrôle (Fig 5. C).

Ainsi, les dynamiques de deux protéines d'architecture de la chromatine, à savoir l'histone de liaison H1 et l'histone de cœur H2B, sont impactées lorsque le domaine NTER est exprimé dans les cellules U2OS. La présence du NTER modifie donc non seulement l'organisation spatiale de la fibre chromatinienne au sein du noyau mais aussi la dynamique de ses constituants moléculaires.

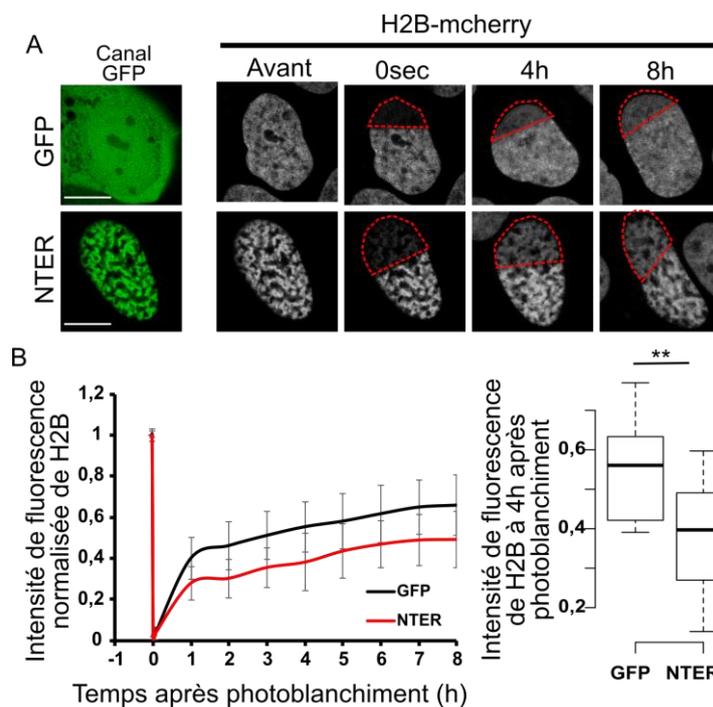


Figure 5. La dynamique d'échange de l'histone de cœur H2B est ralentie en présence du domaine NTER de TET1. A) Imagerie de FRAP de H2B-mcherry, avant, après, à 4 et 8h après photoblanchiment en présence de la GFP (panel du haut) ou du NTER-GFP (panel du bas). B) et C) Quantification du retour de fluorescence de H2B dans la zone photoblanchie et du niveau de fluorescence de H2B à 4h après photoblanchiment dans les deux conditions. Barre d'échelle=10µm. N=4 avec une dizaine de cellules par condition. Test-t, *p<0,05 ;**p<0,01 ;***p<0,001.

G. Le niveau de transcription se trouve diminué en présence du domaine NTER de TET1 et de la protéine TET1 longue

Lors de la transcription, l'histone H1 se trouve dissociée des régions promotrices par la protéine chaperonne NAP-1 qui est recrutée par des activateurs de la transcription, et peut être remplacée par des protéines non histones HMGB (Ju et al. 2006; Shimada et al. 2019). Etant donné que la dynamique d'échange de l'histone H1 est plus rapide en présence du domaine NTER de TET1, nous avons souhaité étudier si ce changement était lié à une modulation de la transcription.

Pour cela, les cellules U2OS exprimant le domaine NTER fusionné à la GFP ou la GFP seule ont été fixées puis marquées par immunofluorescence avec un anticorps ciblant l'ARNpol II phosphorylée sur la sérine 2 (pARNpol II), la forme associée à l'élongation. La présence du domaine NTER se traduit par une diminution globale des niveaux de pARNpol II au sein du noyau (Fig6.A et B). De plus, alors qu'en condition contrôle le marquage pARNpol II se répartit de manière à peu près homogène dans le noyau, à l'exception de la périphérie nucléaire riche en hétérochromatine, la présence du domaine NTER de TET1 est associée à un marquage confiné à certaines régions localisées au niveau de l'interface chromatine-nucléoplasme, vraisemblablement là où la chromatine se trouve plus accessible. Cette étude pourrait être complétée par une analyse du niveau global de l'ARNpol II par immunofluorescence afin de contrôler que la diminution de signal de pARNpol II observée en présence du NTER ne soit pas le reflet d'une diminution générale du taux protéique de cette polymérase. L'ARNpol II phosphorylée sur sa sérine 5 apparaît enrichie au sein de promoteurs et est révélatrice de l'activation de l'élongation (Komarnitsky, Cho, et Buratowski 2000). Il serait également intéressant d'analyser l'état de phosphorylation de la sérine 5 qui semble être un évènement précédent la phosphorylation de la sérine 2. De cette manière, il sera possible d'étudier l'impact de l'expression du NTER également sur l'initiation de l'élongation.

En complément de l'étude de l'état d'activité de l'ARNpol II, l'impact du domaine NTER de TET1 sur le niveau de transcription a aussi été analysé via la mesure des taux d'ARN néosynthétisés par incorporation d'éthynyl uridine (EU). Brièvement,

après traitement des cellules U2OS exprimant soit le FL-GFP, le CTER-GFP, le NTER-GFP ou la GFP seule avec cet analogue de l'uracil pendant 1h, période durant laquelle l'éthynyl-uridine (EU) sera incorporée à l'ARN naissant, celles-ci sont fixées et marquées par une réaction de type « click » entre l'EU et l'azide du fluorophore. L'imagerie en confocale révèle que le marquage de l'EU est relativement homogène au sein du noyau et d'intensité similaire dans les cellules exprimant la GFP seule ou le domaine CTER (Fig6. C et D). En présence de la protéine TET1 entière (FL), ou de sa région NTER, on observe non seulement une diminution de la quantité globale d'ARN néo-synthétisés mais aussi une redistribution de ces ARN, qui semblent se concentrer au niveau de l'interface chromatine/nucléoplasme (Fig6.C, D et E). En effet, en traçant un profil d'intensité traversant l'intégralité du noyau, il est possible de constater que les zones chromatiniennes, marquées par un signal Hoechst important se trouvent appauvries en ARN dans la condition FL (Fig6. E) et NTER (non montrée). Dans ces conditions, les quelques pics de marquage EU observés en présence de TET1 se localisent aux bordures de ces zones chromatiniennes tandis que la distribution des ARN corrèle avec celle de la chromatine dans la condition contrôle et dans les cellules exprimant le CTER.

Ces données suggèrent que le remodelage chromatinien induit par l'expression du domaine NTER de TET1 est associé à une réduction de la transcription. Il semble notamment que ce processus soit inhibé au sein des régions denses en chromatine observées en présence du NTER, alors que celui-ci subsiste à l'interface entre ces régions et le nucléoplasme.

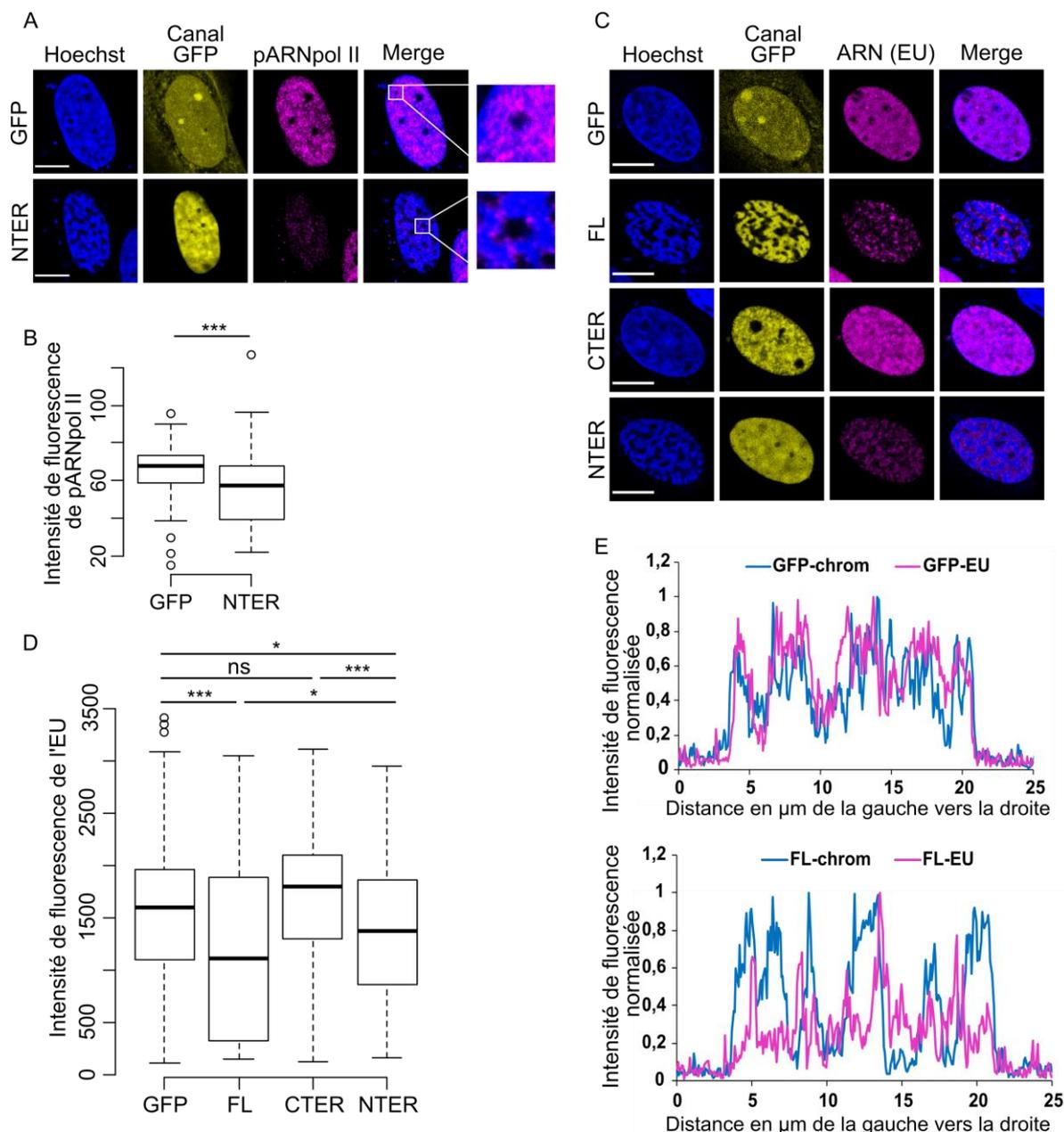


Figure 6. L'expression du NTER et du FL entraîne une diminution de la transcription. A) Immunofluorescence de l'ARNpolymerase II phosphorylée sur la sérine 2 chez des cellules U2OS exprimant la GFP ou le NTER-GFP. Le panel de droite représente la combinaison de la fluorescence du Hoechst et de la pARNpol II. N=1 avec une centaine de cellules par condition. Test de Wilcoxon, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. C) Immunofluorescence de l'EU incorporé au sein d'ARN néosynthétisés. Le panel de droite représente la combinaison de la fluorescence du Hoechst et de l'EU. D) Représentation du niveau d'intensité de l'EU en fonction des différentes conditions. N=3 avec plus d'une centaine de cellules par condition. Test de Wilcoxon et T.test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. E) Profil d'intensité normalisée de la fluorescence du Hoechst "chrom" et de l'EU dans la condition GFP et FL obtenu d'après un tracé horizontale qui traverse le noyau. Barre d'échelle=10 μm .

Outre cet impact négatif sur la transcription, nous avons aussi cherché à déterminer si l'expression du domaine NTER de TET1 était aussi associée à une modulation des marques d'histone. Nous nous sommes notamment intéressés à la marque H3K27me3 caractéristique d'une répression de l'expression génique. Par analyse en immunofluorescence, les niveaux de H3K27me3 apparaissent plus élevés dans les cellules U2OS surexprimant TET1 ou son domaine NTER en comparaison avec la condition contrôle (Fig8. A et B).

L'augmentation du signal H3K27me3 en cas de surexpression de TET1 ou de son domaine NTER est cohérente avec la baisse de transcription observée par marquage pARNpol II et EU (Fig. 6).

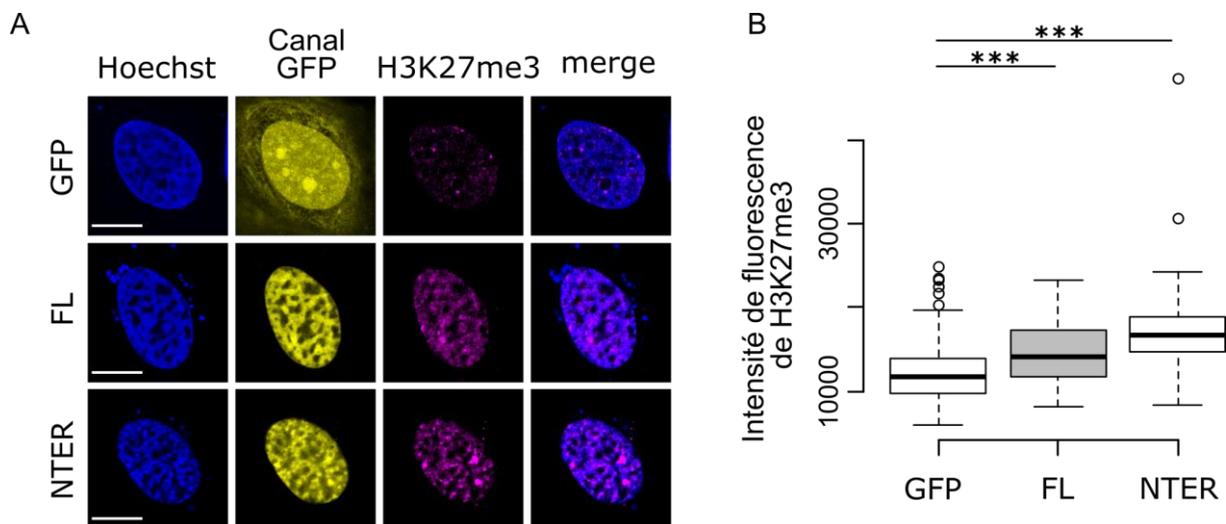


Figure 7. L'expression du NTER et du FL induit une augmentation du niveau de H3K27me3. A) Immunofluorescence de H3K27me3 en présence de la GFP, FL-GFP ou NTER-GFP; Le panel de droite "merge" représente la combinaison de la fluorescence en Hoechst et de H3K27me3. B) Représentation de l'intensité de fluorescence de H3K27me3. N= 3 avec une centaine de cellules par condition. Barre d'échelle=10µm. Test de Wilcoxon *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

II. Etude de la relation entre TET1 et la réparation de dommages dans l'ADN

A. Analyse des niveaux de γ H2AX et de poly-ADP-ribosylation en présence de TET1

Dans la littérature, il a été décrit que le niveau de 5hmC est augmenté après induction de dommages à l'ADN, suggérant un rôle de cette marque épigénétique dans la réparation de lésions (D. Jiang et al. 2015; Kafer et al. 2016). De plus, les protéines TET ont été caractérisées comme étant des cibles phosphorylables par les kinases impliquées dans la signalisation de voies de réparation médiée par ATM et ATR, renforçant le lien entre les dioxygénases et la signalisation et/ou la réparation des lésions de l'ADN (D. Jiang et al. 2015; 2017).

Dans l'analyse de cette relation, Jiang et al ont montré que la surexpression de TET1 dans les cellules neuronales N2a, diminuait le niveau de H2AX phosphorylé sur la sérine 139 (γ H2AX ou gH2AX), une modification d'histone spécifique de la présence de lésions, 12h après induction de dommages induit par un traitement avec un inhibiteur de topoisomérase, l'étoposide. Cet effet n'est pas observable dans des conditions d'expression basale de la protéine TET1 ou lorsque celle-ci se trouve absente, suggérant que TET1 améliorerait l'efficacité de réparation des lésions de l'ADN (D. Jiang et al. 2015).

Dans la continuité de ces études, les niveaux de γ H2AX en l'absence de dommages induits ont été mesurés par immunofluorescence dans des cellules U2OS surexprimant la protéine TET1 entière ou ses domaines NTER et CTER, et comparés à des cellules contrôles (Fig 8). La signalisation γ H2AX en l'absence de dommages induits semble renforcée en cas d'expression de TET1 ou des domaines NTER et CTER, comme mis en évidence par une plus forte proportion de noyaux présentant des foci γ H2AX par rapport aux noyaux contrôles (Fig8. A et B).

Ces données suggèrent donc que l'expression de la protéine entière ou de ses deux régions protéiques, NTER ou CTER, promeut l'apparition de lésions génomiques. Le

FL et le CTER, contrairement au NTER, sont catalytiquement actifs, il est donc possible que l'apparition de produits oxydés résultant de leur activité enzymatique induise lors de leur réparation par la voie du BER des cassures simple brin signalées par la présence de γ H2AX. Cependant, l'enrichissement de γ H2AX ne semble pas uniquement expliqué par l'activité catalytique de TET1 ou de sa région C-terminale. En effet, les niveaux de γ H2AX sont également élevés en présence du NTER suggérant que la restructuration de la chromatine induite par l'expression du NTER pourrait être associée à l'induction de lésions dans l'ADN.

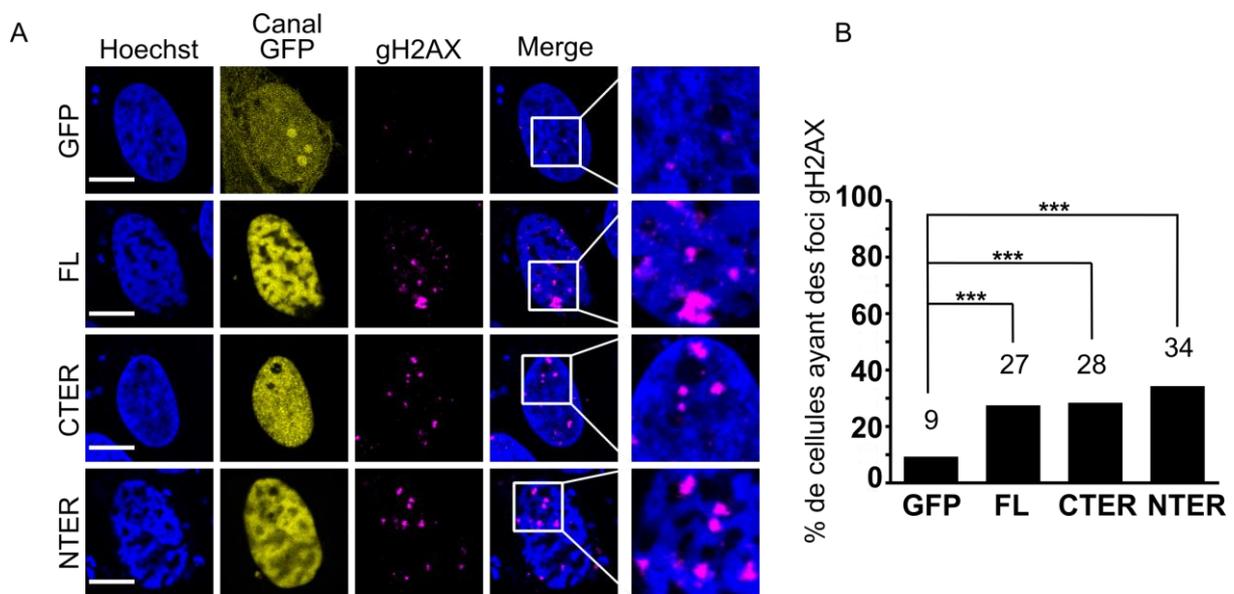


Figure 8. L'expression des régions protéiques de TET1 et de la protéine entière augmente le niveau de H2AX phosphorylé (gH2AX) chez les cellules U2OS. A) Imagerie des niveaux de gH2AX en présence du FL-GFP, CTER-GFP, NTER-GFP ou de la GFP seule par immunofluorescence. Le panel de droite représente la combinaison de la fluorescence du Hoechst et du marquage gH2AX. B) Pourcentage de cellules ayant des foci gH2AX. N=2 avec plus d'une centaine de cellules par condition. Barre d'échelle=10 μ m. Test du Khi2, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Outre le marquage γ H2AX, nous nous sommes aussi intéressés à l'activation d'une autre voie de signalisation centrale dans la réparation de l'ADN : la signalisation par poly(ADP-ribosylation) (PARylation). La PARylation est une modification post-traductionnelle catalysée par les protéines poly(ADP-ribose) polymérases (PARP) lors de leur fixation aux niveaux de dommages dans l'ADN dont notamment les cassures simple et double brins. Les chaînes de poly(ADP-ribose) (PAR) constituent

un ensemble de ramifications linéaires ou ramifiées de groupements ADP-ribosyl. Présentes au niveau des lésions, ces chaînes de PAR contribuent au recrutement de protéines impliquées dans différentes voies de réparation (Wei et Yu 2016). De plus, il a été décrit que la signalisation par PARylation contribue au remodelage local de la chromatine, favorisant ainsi l'accès aux dommages pour les acteurs ultérieurs de la réparation (Sellou et al. 2016; Smith et al. 2018).

Les niveaux de PARylation ont été comparés dans des cellules exprimant TET1-GFP ou la GFP seule. En l'absence d'induction de dommages externes, le niveau de PARylation est trois fois plus élevé dans les cellules surexprimant TET1 comparé au contrôle (Fig9 A et B). Nous avons aussi étudié la signalisation PAR après induction de dommages par traitement des cellules au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Martello et al. 2016). En accord avec la littérature, une forte augmentation de la PARylation est observée dans les cellules contrôle après traitement au H_2O_2 . Cette augmentation est aussi observable dans les cellules exprimant TET1 mais le niveau d'induction semble plus faible qu'en condition contrôle, avec une augmentation de signal PAR d'un facteur ~ 10 par rapport aux cellules non traitées au lieu de ~ 100 dans les cellules contrôles (Fig9. B). Cette plus faible induction de dommage pourrait être en accord avec l'augmentation de l'efficacité de réparation décrite précédemment en présence de TET1 (D. Jiang et al. 2015). Alternativement, il est également possible que la suractivation de la PARylation avant induction de dommages dans les cellules exprimant TET1 épuise le niveau de substrat nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) dont PARP1 est dépendant. En conséquence, seule une faible activation de la PARylation serait observée après ajout d' H_2O_2 dans les cellules exprimant TET1.

Les PAR sont les produits d'activité des PARP, des enzymes dépendantes du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) (Shieh et al. 1998). Il existe environ 17 membres connus appartenant à cette famille. Parmi ceux-ci, PARP1 est une protéine nucléaire très abondante et est la principale enzyme responsable de la présence de la PARylation (Shieh et al. 1998; Yamanaka et al. 1989). PARP1 est une protéine impliquée dans l'initiation de la réparation en reconnaissant les sites de dommage et en PARylant les histones et des effecteurs de la voie de réparation. De plus, PARP1

interagit avec TET1 et la PARylation de TET1 stimule son activité de dioxygénase *in vitro* (Ciccarone et al. 2015). En plus de son association avec TET1 *in vitro*, PARP1 forme un complexe avec CTCF et DNMT1 afin de maintenir les sites de liaison de CTCF dans un état hypométhylé (Zampieri et al. 2012).

Afin de poursuivre l'étude du lien entre la réparation et les protéines TET, la dynamique de PARP1 en présence de TET1 a été analysée par FRAP (Fig9. C et D). Il apparaît que dans les cellules U2OS surexprimant TET1, PARP1 a une dynamique légèrement plus faible qu'en condition contrôle (Fig9. C et D). Ces données indiquent que bien que cette polymérase puisse être potentiellement responsable de l'augmentation du niveau de PAR, elle ne semble cependant pas fortement associée à la chromatine en présence de TET1.

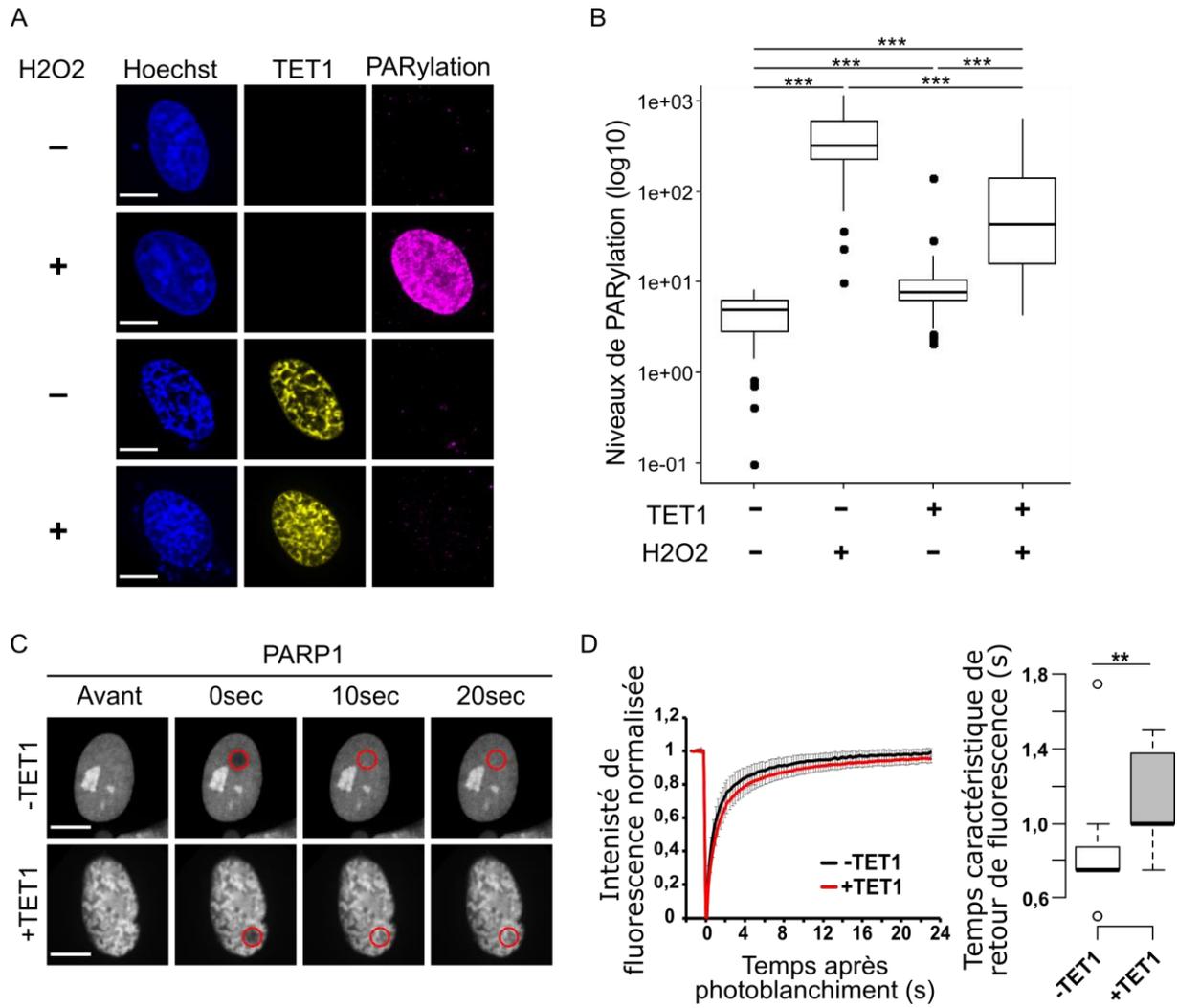


Figure9. La surexpression de TET1 induit une augmentation du niveau de PARylation sur la chromatine. A) et B) Imagerie et quantification du taux de PARylation déterminées par immunofluorescence en absence (1^{er} et 3^{ème} panel) ou en présence (2^{ème} et 4^{ème} panel) de 0,500mM de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 10min et de TET1 (3^{ème} et dernier panel). N=1 avec une trentaine de cellules par condition. C) et D) Imagerie et quantification du retour de fluorescence de PARP1 après photoblanchiment en absence et en présence de TET1. N=1 avec une dizaine de cellules par condition. Barre d'échelle=10µm. Test de Wilcoxon, *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

B. Etude de l'implication du remodeleur ALC1 dans la réorganisation chromatinienne induite par la surexpression de TET1

Au sein de l'équipe, il a été démontré qu'à la suite de lésions induites par irradiation laser, la chromatine se décondense aux sites de dommages. Cet événement implique la protéine de réparation PARP1 qui est recrutée aux sites de dommages et PARyle les histones ainsi qu'elle-même. La PARylation va permettre le recrutement d'un remodeleur de la chromatine, ALC1 (Sellou et al. 2016), qui par son activité catalytique va réorganiser la chromatine afin de la rendre accessible à d'autres remodeleurs ainsi qu'à la machinerie de réparation (Smith et al. 2018).

ALC1 est un remodeleur ATP-dépendant de la famille des hélicases SNF2. Il contient deux domaines hélicase en région N-terminale et un macrodomaine interagissant avec la PARylation en région C-terminale.

Etant donné que le niveau de PARylation est plus élevé dans les cellules U2OS surexprimant TET1, nous nous sommes demandé si le remodeleur ALC1 était retenu sur la chromatine en présence de TET1. Dans ce contexte, la dynamique de ALC1 a été analysée par FRAP, et il s'avère que celle-ci est fortement ralentie lorsque TET1 est présent dans les cellules U2OS (Fig10. A-C).

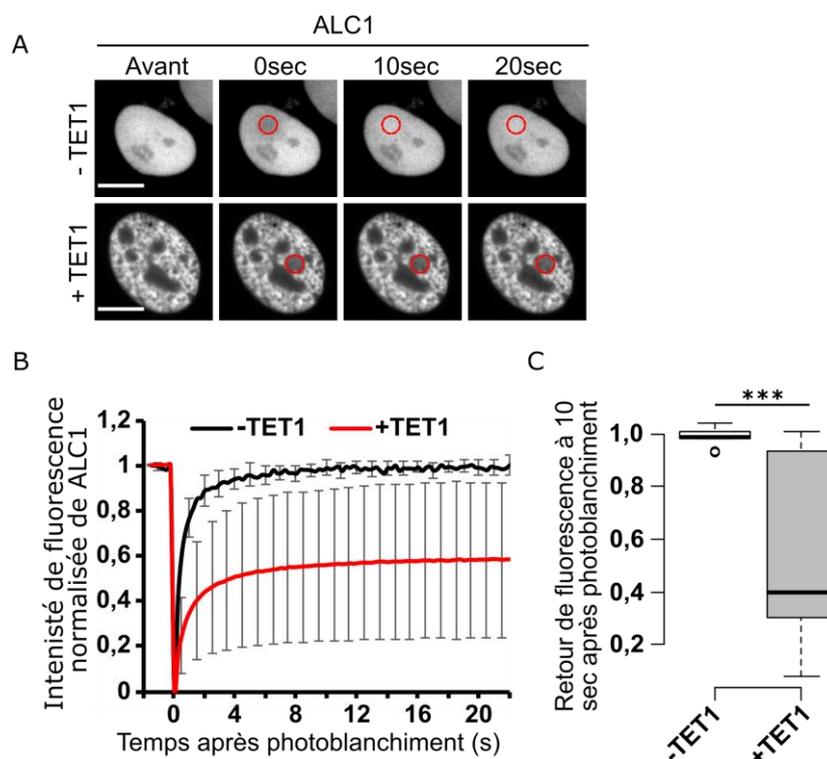


Figure10. Le remodelleur ALC1 est retenu à la chromatine en présence de TET1. A) Imagerie du FRAP de ALC1 en absence (panel du haut) ou en présence de TET1 (panel du bas). B) et C) Quantification du taux de retour de fluorescence normalisé de ALC1 dans la zone photoblanchie dans les deux conditions. N=3 avec une quinzaine de cellules par condition. Barre d'échelle=10µm. Test de Wilcoxon *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Afin d'étudier si cette rétention de ALC1 sur la chromatine en présence de TET1 est dépendante de la présence de PARP1, la dynamique de ALC1 a été également étudiée dans des cellules U2OS dépourvues de PARP1 (U2OS PARP1-KO) (Fig11. A, B et C). Dans ces cellules PARP1-KO, la rétention d'ALC1 sur la chromatine associée à la surexpression de TET1 n'est plus observée (Fig11. A, B et C). En revanche, lorsque PARP1 est ré-exprimée dans les cellules PARP1-KO, la dynamique de ALC1 se trouve de nouveau ralentie en présence de TET1 (Fig11. D). Ces données confirment que l'association de ALC1 à la chromatine en condition de surexpression de TET1 est dépendante de PARP1.

Dans le but de discriminer entre l'effet de la présence de PARP1 et de son activité catalytique sur la rétention d'ALC1 sur la chromatine, nous avons étudié l'impact de la réexpression d'un mutant PARP1-E988Q (PARP1-EQ), incapable d'effectuer de la

poly(ADP)ribosylation, dans les U2OS PARP1-KO (Fig11. A et E). En présence de ce mutant, la dynamique de ALC1 ne se trouve pas ralentie dans les cellules PARP1-KO exprimant TET1 (Fig11. A et E), suggérant que c'est l'activité catalytique de PARP1, et donc la PARylation, qui est nécessaire à la rétention de ALC1 à la chromatine en présence de TET1.

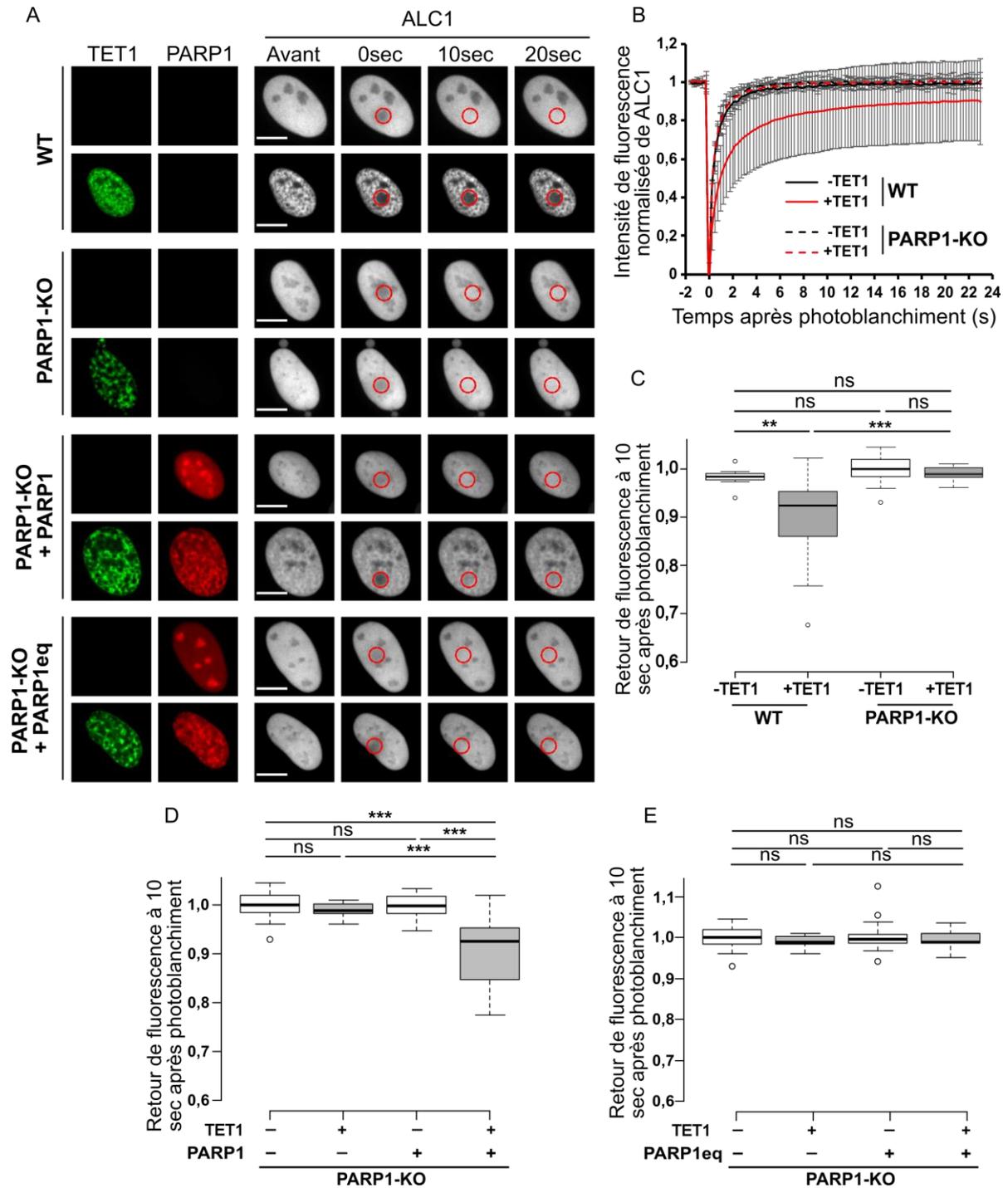


Figure 11. La rétention de ALC1 à la chromatine en présence de TET1 est dépendante de l'activité catalytique de PARP1. A) Imagerie du FRAP de ALC1 en condition de surexpression de TET1 ou non, dans des cellules U2OS WT (panel 1 et 2), PARP1-KO (panel 3 et 4) réexprimant PARP1 (panel 5 et 6) ou PARP1eq (panel 7 et 8). B) et C) quantification du retour de fluorescence de ALC1 dans la zone photoblanchie dans les U2OS WT et déficiente pour PARP1 en présence ou non de TET1. Analyse de la dynamique de ALC1 dans les cellules PARP1-KO exprimant PARP1 D) ou PARP1eq E). N=1 avec une quinzaine de cellules par condition. Barre d'échelle=10 μ m; Test-t et Test de Wilcoxon *p<0,05 ;**p<0,01 ;***p<0,001.

Considérant que ALC1 est un remodeleur de la chromatine et qu'il y semble plus fortement associé lorsque TET1 se trouve surexprimée, un des rôles hypothétiques de ALC1 serait de participer à la réorganisation chromatinienne induite par la présence de TET1. Afin de tester cette hypothèse, TET1 a été surexprimée dans des cellules déficientes pour ALC1 (ALC1-KO) et la distribution nucléaire de cette dioxygénase, qui reflète la structure chromatinienne sous-jacente (Fig1. B), a été analysée (Fig12.). Il s'avère cependant que même en absence de ALC1, TET1 présente une distribution inhomogène au sein du noyau, révélatrice d'une réorganisation de la chromatine. Il semble donc que la présence d'ALC1 ne soit pas nécessaire à la restructuration de la chromatine observée en cas de surexpression de TET1.

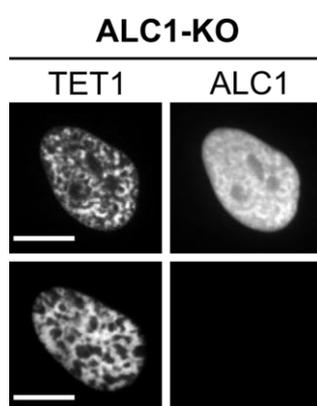


Figure 12. Le remodeleur ALC1, en présence de TET1, ne participe pas à la réorganisation de la chromatine. Imagerie de TET1 couplée à la GFP (panel de gauche) et ALC1 couplée à la mcherry (panel de droite) dans des cellules U2OS déficientes pour ALC1 (ALC1-KO). Barre d'échelle=10µm.

C. Etude des liens entre activité catalytique de TET1 et induction de la signalisation par PARylation

La signalisation par PARylation joue un rôle central dans la réparation des cassures simple brin (SSB). Or, les dérivés oxydés issus de l'activité enzymatique de TET1, 5caC et 5fC, sont remplacés par des cytosines non oxydées via la réparation par

excision de base (BER), dont un des intermédiaires de réparation est une SSB (Weber et al. 2016). Par conséquent, nous avons cherché à déterminer si l'induction de la PARylation observée en présence de TET1 était liée à son activité enzymatique. Les niveaux de PARylation ont ainsi été mesurés par immunofluorescence dans des cellules surexprimant des versions actives ou catalytiquement inactives de TET1 et de son domaine CTER, ainsi que le domaine NTER de cette enzyme. Il apparaît que l'expression du domaine CTER de TET1 est suffisante pour induire une augmentation des niveaux de PARylation. Cette augmentation est drastiquement réduite pour les versions catalytiquement inactives de la protéine entière ou du domaine CTER (Fig. 13. A et B), suggérant que l'activité d'oxydation des cytosines de TET1 est nécessaire à l'augmentation de la signalisation PAR. Cependant, une partie de cette augmentation de signalisation PAR induite par la surexpression de TET1 pourrait être indépendante de l'activité enzymatique. En effet, l'expression du domaine NTER semble suffisante pour induire une élévation des niveaux de PARylation. Par ailleurs, il semblerait que la PARylation s'accumule au sein de régions dépourvues de chromatine en présence du NTER. Une analyse supplémentaire du niveau de PARylation dans le nucléoplasme pourrait être réalisée.

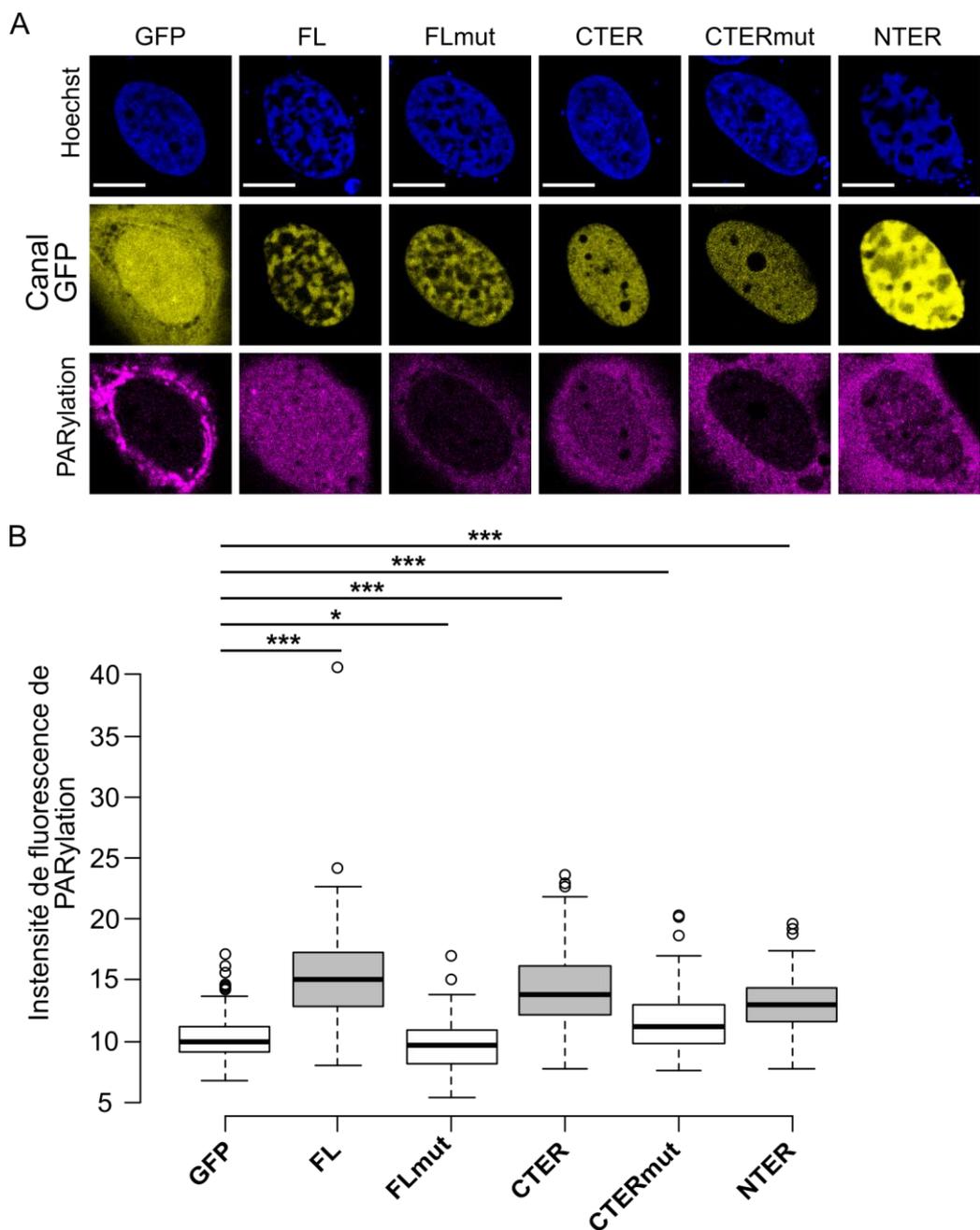


Fig13. Les niveaux de PARylations sont élevés chez les cellules U2OS surexprimant le FL, le CTER et le NTER. A) Immunofluorescence de la PARylation en présence des versions actives FL et CTER ou inactives et du NTER et de la GFP. B) Quantification du niveau de PARylation dans ces différentes conditions. N=1 avec plus d'une centaine de cellules par condition. Barre d'échelle=10µm; Test de Wilcoxon *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Nous avons aussi cherché à déterminer si l'induction de la PARylation observée en cas d'augmentation de l'activité d'oxydation des cytosines par TET1 induisait un

recrutement sur la chromatine des effecteurs de cette voie de signalisation. Nous avons ainsi étudié la dynamique d'interaction avec la chromatine du remodeleur ALC1 dans des cellules surexprimant des versions actives ou catalytiquement inactives de TET1 et de son domaine CTER ainsi que le domaine NTER de cette enzyme (Fig 14. A). Il apparaît que l'expression du domaine CTER de TET1 est suffisante pour induire un renforcement de l'association entre ALC1 et la chromatine similaire à ce qui est observé avec la protéine TET1 entière. Cet effet n'est pas présent en cas d'expression des versions catalytiquement inactives de la protéine TET1 entière ou de son domaine CTER. Enfin, l'expression du domaine NTER ne semble pas avoir d'impact sur la mobilité d'ALC1 au sein du noyau, indiquant que l'induction modérée de la PARylation observée en présence de ce domaine n'est pas capable de promouvoir le recrutement de ce remodeleur sur la chromatine (Fig14. A-C). L'ensemble des résultats obtenus suggère donc que c'est principalement l'activité d'oxydation des cytosines par TET1 qui promeut l'activation de la signalisation par PARylation et le recrutement de ses effecteurs sur la chromatine.

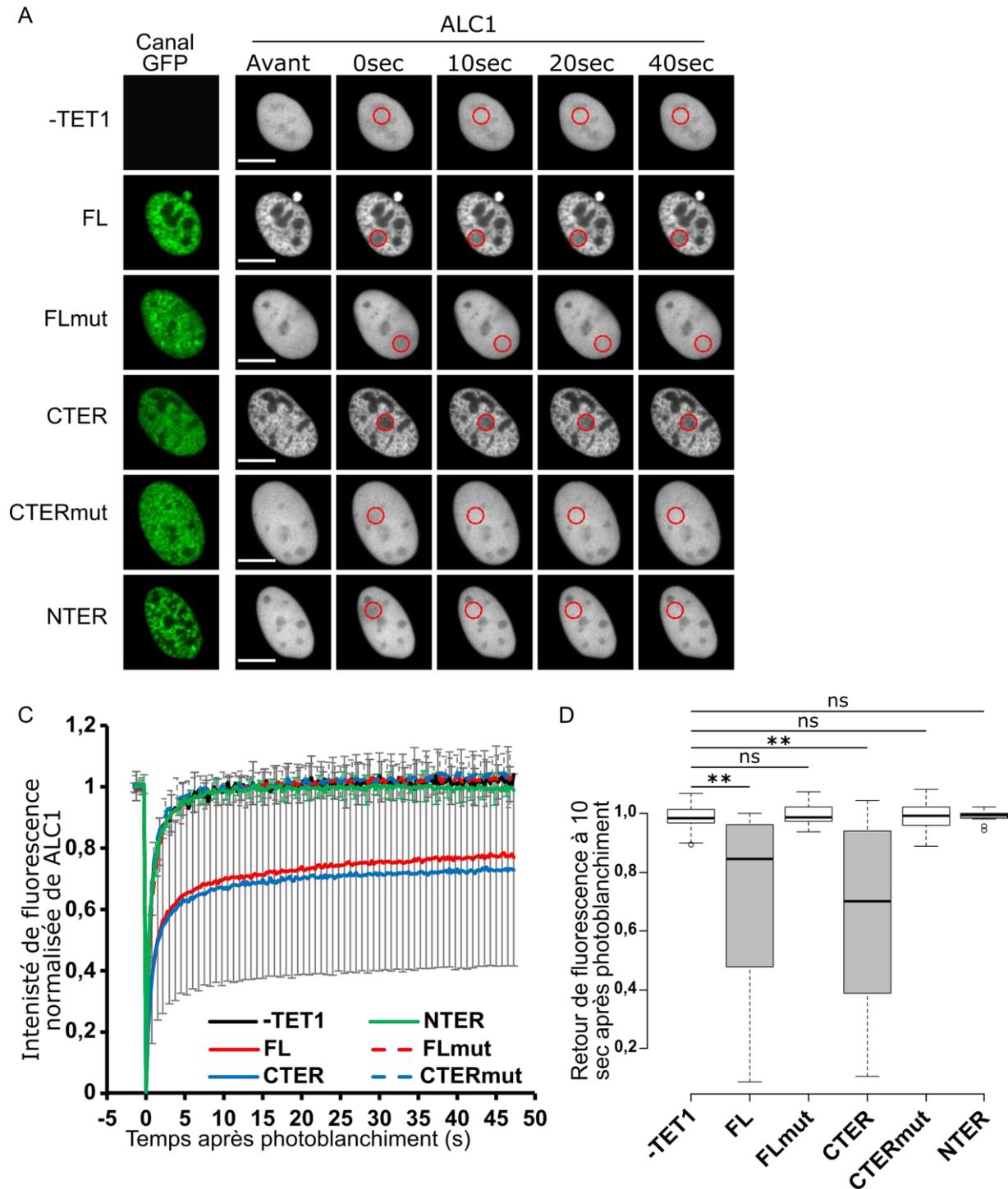


Figure 14. Le remodelleur ALC1 est retenu à la chromatine de manière dépendante à l'activité catalytique de TET1. A) Imagerie du FRAP de ALC1 dans les cellules U2OS exprimant le FL, CTER, NTER ou les versions inactives FLmut et CTERmut. C) et D) Quantification du retour de fluorescence normalisée de ALC1 à 10sec après photoblanchiment dans ces différentes conditions. N=1 avec une quinzaine de cellules par condition. Barre d'échelle=10 μ m, Test-t et Test de Wilcoxon: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

DISCUSSION

I. Relation entre le domaine N-terminal de TET1 et la dynamique d'organisation de la chromatine

A travers la réalisation de mon projet de thèse, il a pu être décrit que TET1, et en particulier son domaine N-terminal, participe à la modulation de l'architecture de la chromatine. L'expression du NTER aboutit à la formation au sein du noyau de régions denses en chromatine séparées entre elles par des zones de nucléoplasme quasiment dépourvues de chromatine, suggérant une séparation entre phase chromatinienne et phase nucléoplasmique. Ce phénomène est associé à une modification de la dynamique des histones H1 et H2B ainsi qu'à une altération du niveau global de la transcription.

A. Le domaine N-terminal de TET1 semble participer à la condensation de la chromatine

Les fonctions du domaine N-terminal de TET1 (1 à 639aa) sont très peu décrites dans la littérature. Celui-ci comporte un domaine en doigt de zinc CXXC, permettant de cibler de manière préférentielle les protéines TET1 et TET3 vers les régions CGI. Cependant, ce domaine CXXC ne semble pas être impliqué dans la restructuration de la chromatine (Fig2.C). En effet, la surexpression de TET1, qui possède un domaine CXXC, et de TET2, isoforme ne contenant pas ce domaine, induit une réorganisation similaire de la chromatine. De plus TET3, tout comme TET1, possède un domaine CXXC mais ne semble cependant pas capable de promouvoir une restructuration chromatinienne. L'ensemble de ces données indique que le domaine CXXC n'est pas impliqué dans cette réorganisation de la chromatine. Deux hypothèses peuvent expliquer l'absence de restructuration de la chromatine en présence de TET3. La première hypothèse possible pour expliquer l'absence d'effet de TET3 sur la structure chromatinienne serait une concentration insuffisante de cette dioxygénase au sein du noyau pour induire une restructuration de la chromatine observable en microscopie optique. En effet, contrairement aux isoformes TET1 et TET2 qui sont exclusivement nucléaire, TET3 est retrouvée aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. Il a été montré que l'augmentation de

l'expression de TET1 était associée à une élévation du niveau de réorganisation de la chromatine au cours du temps (Fig1.E). Ainsi, il semble y avoir une corrélation entre la concentration en protéines TET au sein du noyau et le niveau de restructuration de la chromatine. Il serait intéressant d'étudier l'effet sur la structure chromatinienne d'une construction chimérique combinant TET3 avec des séquences d'adressage au noyau, forçant ainsi son accumulation au sein de cet organite. Une seconde hypothèse pouvant expliquer l'absence d'effet de TET3 sur la structure chromatinienne serait que cette protéine ne comporte pas le domaine responsable de cette réorganisation, présent sur TET1 et TET2. Par alignement, avec l'outil CLUSTAL-OMEGA disponible sur le site EMBL-EBI, des séquences en acides aminés des domaines NTER de TET1, TET2 et TET3, nous n'avons cependant pas pu identifier une séquence d'homologie entre TET1 et TET2 qui serait absente de TET3. Alternativement, des fragments de la partie N-terminale de TET1 développés par le laboratoire de Wei Xie pourraient être exprimés dans les cellules U2OS afin de définir plus finement la région du domaine NTER de TET1 responsable de la réorganisation chromatinienne. L'analyse des caractéristiques de cette région permettrait de définir si un domaine similaire est présent sur TET2 tout en étant absent de TET3.

Associé au réarrangement chromatinien, l'expression du domaine N-terminal de TET1 entraîne un ralentissement de la dynamique d'échange de l'histone de cœur H2B. Si cette dernière peut être modulée selon certains processus cellulaires notamment la transcription, Kimura et al ont néanmoins décrit que la dynamique d'échange de la population lente de H2B, dont le retour de fluorescence est étudié sur des temps longs (plusieurs heures), est indépendante de l'état transcriptionnel (Kimura et Cook 2001). Ainsi, il semble peu probable que le ralentissement de la dynamique de H2B, observé en présence du NTER, soit une conséquence d'une diminution de la transcription également identifiée dans ce contexte. L'altération de l'efficacité d'échange de H2B reflèterait donc l'impact de l'expression du domaine NTER sur l'organisation chromatinienne.

La combinaison des données issues de l'imagerie confocale et électronique ainsi que les analyses de dynamique de l'histone de cœur H2B, du niveau de transcription et

d'enrichissement de H3K27me3 suggère que les régions denses en chromatine observées en cas de surexpression de TET1 ont un statut qui se rapproche de l'état hétérochromatinien. Cependant, l'observation d'une éviction partielle de l'histone de liaison H1 apparaît incompatible avec cette hypothèse. Contrairement à celles concernant H2B, les données de FRAP obtenues révèlent que la dynamique de l'histone H1 apparaît plus rapide en présence du NTER ou de la protéine entière. Ce résultat est étonnant et ne coïncide pas avec l'inhibition de la transcription observée dans ce contexte. En effet, de manière générale l'éviction de H1 corrèle avec l'expression génique (Ju et al. 2006; Krishnakumar et Kraus 2010; Shimada et al. 2019) et à l'inverse, l'enrichissement de l'histone de liaison est associé à une répression de la transcription (Juan et al. 1997; Laybourn et Kadonaga 1991; Cheung, Zarifyan, et Kraus 2002). Afin de définir plus précisément les propriétés de l'environnement chromatinien généré par la surexpression de TET1 et de son domaine N-terminale, d'autres marques épigénétiques spécifiques de l'euchromatine et de l'hétérochromatine pourraient être analysées. L'acétylation des histones, marque caractéristique d'une transcription active, est associée à l'éviction de H1 (Shimada et al. 2019). Il serait donc pertinent d'étudier si la dynamique d'échange accélérée avec la chromatine observée pour H1 en présence du domaine NTER de TET1 est corrélée à une augmentation des marques d'acétylation. J'ai pu montrer une augmentation de la marque H3K27me3, caractéristique de l'hétérochromatine facultative (Cai et al. 2021; Hosogane et al. 2016), en présence du domaine NTER. En complément, la distribution de H3K9me3, une modification d'histone caractéristique de l'hétérochromatine constitutive pourrait également être étudiée ainsi que celle de HP1, une protéine impliquée dans la formation et le maintien du statut hétérochromatinien (Bannister et al. 2001; Rangasamy 2013). A l'aide d'une analyse par immunofluorescence ciblant ces marques spécifiques et la protéine HP1, il sera probablement plus aisé de définir l'état hétérochromatinien induit par l'expression de la partie N-terminale et de la protéine entière TET1.

Par ailleurs, le processus de senescence, qui est caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire, est accompagné d'une restructuration de la chromatine (Funayama et al. 2006; Narita et al. 2003). Lors de la senescence, la chromatine s'organise sous forme de foci. Une analyse de l'état transcriptionnel de ces cellules révèle que les

ARN sont exclus de ces foci et sont en revanche localisés dans le nucléoplasme. Ces foci sont donc réfractaires au processus de transcription et possèdent les caractéristiques d'un statut hétérochromatinien (Funayama et al. 2006; Narita et al. 2003). Dans ce contexte, la présence de ces foci apparaît dépendante de l'éviction de H1 de la chromatine, H1 étant remplacée les protéines high-mobility group (HMG) (Funayama et al. 2006). Il est ainsi possible que la dynamique d'échange de H1 rapide en présence du NTER soit le résultat d'un remplacement des histones H1 par les protéines HMG, ces deux protéines étant en compétition pour leur site de liaison (Catez et al. 2002). Bien que la chromatine en présence du NTER ne s'organise pas en foci comme il a pu être décrit lors de la senescence, la distribution des ARN néosynthétisés apparaît similaire. Il est ainsi possible que l'expression du NTER et de TET1 favorise l'entrée en senescence. Pour confirmer cela, une analyse d'activité de la β galactosidase, l'élévation de son activité étant associée à la senescence, pourrait être réalisée par cytométrie en flux.

B. Comment le NTER pourrait-il affecter l'architecture de la chromatine ?

J'ai pu montrer que le domaine NTER de TET1 était à l'origine du remodelage chromatinien induit par cette dioxygénase, ce qui exclut une contribution de l'activité d'oxydation des cytosines dans ce processus. Dès lors, plusieurs phénomènes pourraient être responsables de la restructuration de la chromatine en présence du domaine NTER de TET1.

Tout d'abord, la distribution observée semble se rapprocher de celle observée lors de la condensation des chromosomes en prophase (Rieder et Khodjakov 2003). Cependant, dans cette configuration, chaque région dense en chromatine correspond à un chromosome individuel. L'utilisation de sondes FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization) marquant des chromosomes entiers (Bolzer et al. 2005) permettrait de vérifier si les régions isolées denses en chromatine observées en présence du domaine NTER de TET1 correspondent elles aussi à des chromosomes individuels. Peu de fonctions des protéines TET dans la mitose ont été décrites dans

la littérature hormis la présence d'une interaction entre TET1 et la cycline B. L'association entre ces deux protéines limiterait la dégradation de la cycline et favoriserait ainsi la progression en G2/M (Chrysanthou et al. 2018). Cependant, au cours des différentes analyses en microscopie sur échantillons vivants, aucune cellule présentant une structure chromatinienne remodelée du fait de la surexpression de TET1 ou de son domaine NTER, n'a pu être observée réalisant une mitose complète. Il est donc possible que la présence de TET1 engage de manière prématurée la cellule dans un des premiers stades de mitose, correspondant à la condensation de la chromatine, sans engager la suite des étapes de la division cellulaire. Une étude de l'état du cycle cellulaire par cytométrie en flux permettrait de caractériser un potentiel effet de la surexpression de TET1 dans la progression du cycle cellulaire.

Une seconde hypothèse expliquant l'effet du domaine NTER de TET1 sur la chromatine serait que celui-ci puisse servir de plateforme de recrutement pour des effecteurs de la chromatine qui réorganiseraient l'architecture de la chromatine. En effet, le domaine N-terminal n'a pas d'activité enzymatique décrite et sa présence au sein de la protéine TET1 mène au recrutement de la O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) à la chromatine (W. Zhang et al. 2016). De plus, il a été montré que les enzymes TET interagissaient avec différentes protéines qui participent à la modulation de l'architecture de la chromatine telles que Sin3A (F. Zhu et al. 2018), les sous-unité du complexe PRC2 (Neri et al. 2013), OGT (Deplus et al. 2013; Vella et al. 2013) et le facteur pionnier FOXA1 (Yang et al. 2016). Les protéines interagissant avec le NTER et ayant une fonction dans la modulation de l'organisation de la chromatine pourraient être identifiées à l'aide d'une co-immunoprécipitation ciblant le NTER suivi d'une analyse par spectrométrie de masse.

Troisièmement, le phénomène de séparation de phase pourrait être impliqué dans le réarrangement chromatinien induit par le NTER. La séparation de phase est un phénomène impliquant la séparation de macromolécules de manière distincte de leur environnement et sans délimitation physique. Au sein du noyau, l'on distingue la PPPS, correspondant à une ségrégation de régions chromatiniennes médiée par la

liaison de protéines, de la LLPS formée à partir de l'accumulation de constituants protéiques s'organisant de manière sphérique et ayant des propriétés similaires à celles d'un liquide (Erdel et Rippe 2018). L'une des caractéristiques principales des protéines participant à la séparation de phase concerne leur état peu structuré. Ces domaines flexibles au regard de leur organisation tri-dimensionnelle favoriseraient l'apparition de multiples interactions (aussi appelé multivalence) (Burke et al. 2015; Nott et al. 2015). Bien que les régions désordonnées soient associées à la formation de ces structures, leur fonction dans la mise en place de la séparation de phase reste à définir. Nous avons donc souhaité identifier l'état d'organisation du domaine NTER à l'aide de deux outils informatiques : IUPred (Dosztányi 2018) et PONDR (Obradovic et al. 2003; Romero et al. 2001). A titre de comparaison, le domaine N-terminal de la protéine FUS (UniProtKB, p35637, FUS_HUMAN), connu comme étant déstructuré (Burke et al. 2015), a également été analysé par ces deux programmes de prédiction. Il est supposé que les domaines protéiques désordonnés sont constitués d'acides aminés ne pouvant favorablement pas former d'interactions entre eux (Erdős et Dosztányi 2020). IUPred est un outil de prédiction basé sur l'estimation de l'énergie de la séquence en acides aminés. Celle-ci tient compte du nombre et de la nature des liaisons entre acides aminés. De manière différente, PONDR est un programme de prédiction fonctionnant d'après des algorithmes d'apprentissage, entraînés à partir de données obtenues en cristallographie (atomes et électrons manquant) et par NMR. En accord avec la littérature, le domaine N-terminal de FUS apparaît fortement désorganisé d'après ces deux outils (Fig15. A et B). Le domaine N-terminal de TET1, semble contenir plusieurs segments d'acides aminés (aa) désorganisés : l'extrémité N-terminale de de 1 à 95 aa \pm 10aa, environ quatre segments centraux : de 120 à 140aa \pm 20aa, de 220 à 280aa \pm 20aa, de 430 à 480aa \pm 20aa, de 505 à 560aa \pm 10aa, et l'extrémité C-terminale de 620 à 639aa \pm 5aa.

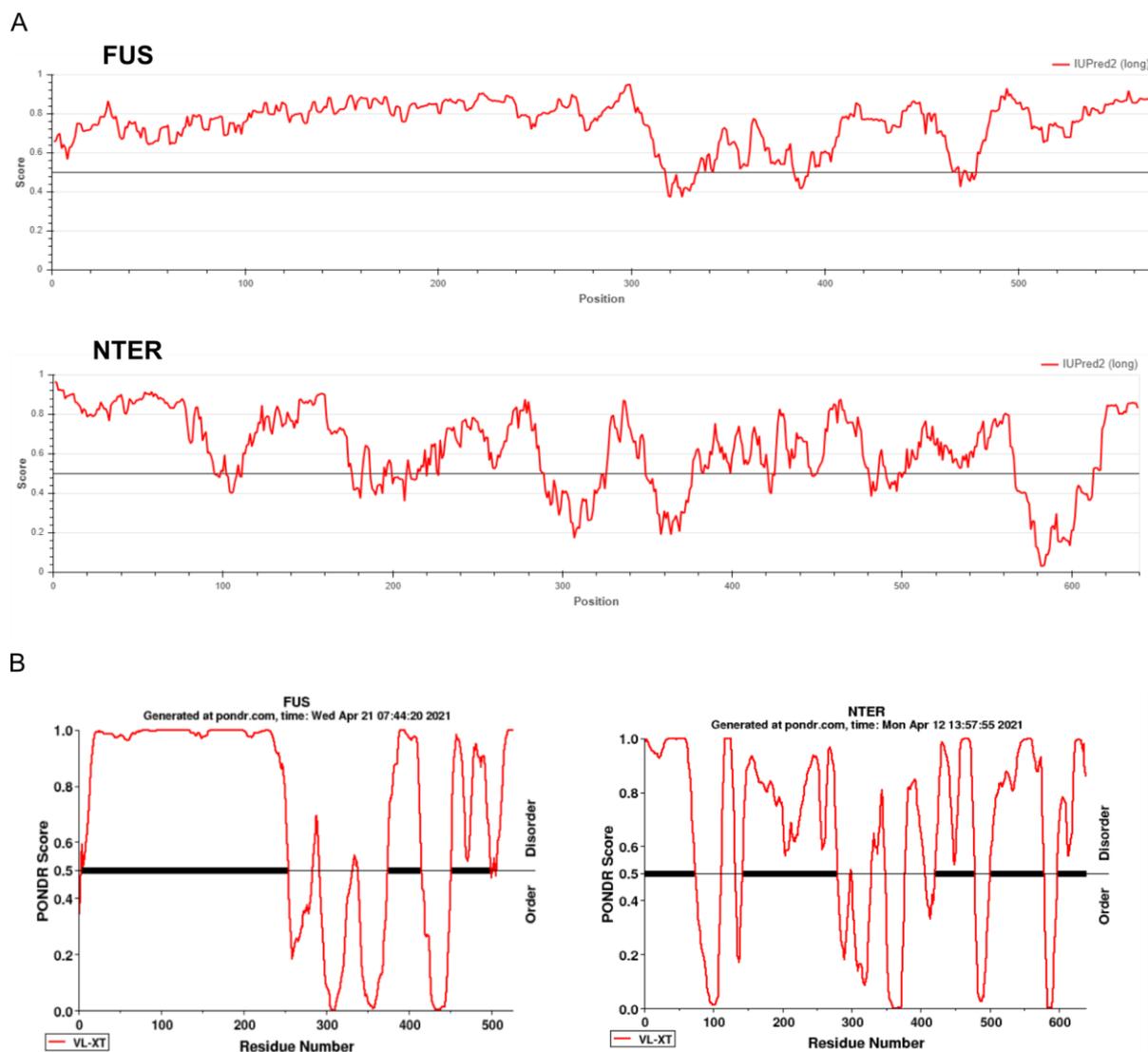


Fig15. Prédiction de domaines désordonnés dans la région N-terminale de TET1. A) Représentation de domaines désorganisés, de la protéine FUS (FUS_HUMAN-p35637) à partir de la séquence en acides-aminés provenant du site UniProtKB et du NTER, caractérisés par le programme IUPred2. Le programme IUPred2 détermine le niveau de structuration à partir de l'estimation de l'énergie de chaque acide aminé. Ce profil a été déterminé via le mode "long disorder" qui prédit le niveau de structuration sur plus de 30 acides aminés consécutifs. B) Représentation de domaines désorganisés de la protéine FUS (à gauche) et du NTER (à droite) déterminés par le programme PONDRA. Cet outil est basé sur des algorithmes d'apprentissage à partir de données obtenues par cristallographie et en NMR.

Ces données de prédictions de domaines désordonnés suggèrent que le domaine N-terminal de TET1 pourrait avoir les propriétés caractéristiques des protéines participant à la séparation de phase. Dans ce contexte deux phénomènes sont

possibles. Le domaine N-terminal de TET1 pourrait être impliqué dans la PPPS, en s'associant à diverses régions chromatiniennes, et formerait dans ce cas des « ponts » entre ceux-ci. De cette manière, le NTER favoriserait les interactions entre polymères de chromatine via son association à celle-ci. L'augmentation de ces contacts entre fragments de chromatine formerait cette structure où la chromatine se trouve ségréguée du nucléoplasme et qui a pu être observée en condition de surexpression du NTER à l'échelle du noyau (Fig16.A). D'une autre manière, les multiples liaisons des fragments NTER sur la chromatine pourraient modifier les propriétés physico-chimiques de celle-ci conduisant à la LLPS. Ce phénomène pourrait participer à la ségrégation de la chromatine du nucléoplasme en présence de ce domaine protéique de TET1 (Fig16.B).

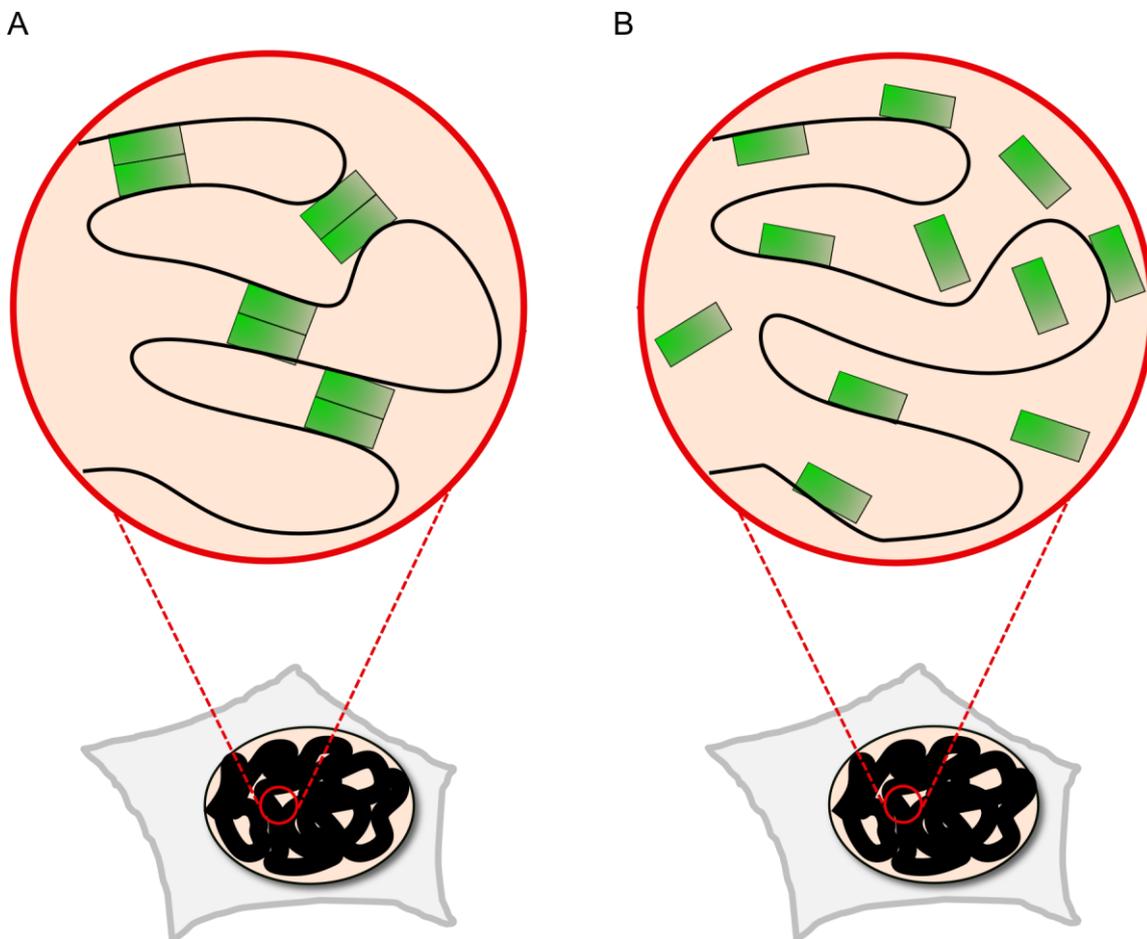


Fig16. Schéma représentant la fonction du NTER dans la séparation de phase. A) Le domaine NTER (en vert) participerait à la PPPS en s'associant à la chromatine forme des ponts entre les polymères de chromatine ou B) La liaison du NTER sur la chromatine change les propriétés physico-chimiques de celle-ci induisant sa ségrégation du nucléoplasme.

Ainsi, en favorisant les interactions entre les fibres chromatiniennes ou en modifiant la nature de celles-ci, le NTER pourrait participer à la séparation de phase. Les fonctions du NTER dans ce phénomène restent encore à prouver expérimentalement, que ce soit *in vitro* ou encore au sein même de la cellule. Une première étude pourrait être menée *in vitro* en analysant en microscopie la capacité des régions N-terminales de TET1 à former des gouttelettes et à fusionner entre-elles (Z. Wang, Zhang, et Zhang 2018). La dynamique d'échange au sein de ces gouttelettes par FRAP pourrait ensuite être examinée afin de déterminer les propriétés physiques de cette structure. L'analyse de la PPPS est plus complexe et nécessite de pouvoir modéliser le processus par lequel la chromatine pourrait être ségrégée, en la comparant aux interactions existantes au sein de la cellules et caractérisées par capture de conformation de chromosomes (Hi-C) (Chiariello et al. 2016).

C. Les potentielles fonctions du domaine N-terminal de TET1

La restructuration de la chromatine induite par le domaine NTER de TET1 est associée à une diminution globale de la transcription. Dans la littérature, il a été décrit que la protéine TET1 possède un rôle à la fois répressif et activateur de la transcription (Neri et al. 2013; H. Wu et al. 2011) dans les cellules souches embryonnaires (ESCs). Ces deux fonctions antinomiques de TET1 dans la régulation de l'expression génique sont médiées par l'activité enzymatique de cette dioxygénase mais également par le recrutement de modificateurs de la chromatine (Neri et al. 2013; Su et al. 2019; H. Wu et al. 2011; Zhong et al. 2017). Alors que la surexpression de la protéine longue TET1 ou de sa région N-terminale induit une restructuration de la chromatine ainsi qu'une diminution du taux de transcription de manière globale, l'expression de l'isoforme nouvellement identifié TET1-courte (CTER) ne semble pas impacter l'expression génique ni l'architecture de la chromatine. Si TET1 et le variant, TET1-courte/CTER, possèdent toutes deux le domaine catalytique, ces deux versions, en revanche, diffèrent par l'absence du

NTER dans le cas de l'isoforme TET1-courte. Ensemble, ces données suggèrent que l'inhibition de la transcription n'est pas le résultat de l'activité catalytique de TET1 mais plutôt de la présence du domaine N-terminal de TET1. La présence ou l'absence du domaine NTER est capable d'impacter différenciellement i) l'organisation de la chromatine et ii) la régulation de l'expression génique médiée par TET1 au niveau global. Il a été décrit que la présence du domaine NTER, différenciant TET1-longue et TET1-courte, participerait au recrutement de TET1 à la chromatine (W. Zhang et al. 2016); ce que nous confirmons par nos données de FRAP. Le NTER permet également de recruter indirectement un modificateur de la chromatine, OGT (W. Zhang et al. 2016). Ce domaine en complément de sa fonction de chargement de TET1 sur la chromatine, pourrait participer au recrutement de protéines modifiant l'organisation de la chromatine et ainsi induire l'inhibition de la transcription aussi bien à l'échelle du noyau qu'au niveau de gènes cibles de TET1. L'ensemble de ces données renforce celles précédemment décrites dans la littérature concernant les fonctions distinctes entre la protéine entière et le variant trouvé surexprimé dans certaines lignées cancéreuses (Good et al. 2017).

II. Relation entre TET1 et la réparation des dommages à l'ADN

La surexpression de TET1 induit une augmentation du nombre de dommages à l'ADN qui a été révélée par une augmentation du signal de γ H2AX et de PARylation. Cette élévation du taux de lésions génomiques semble corrélée à la fois à la restructuration de la chromatine favorisée par le domaine NTER de la dioxygénase, et à la fois par l'activité d'oxydation des cytosines médiée par le domaine CTER. Ces deux phénomènes sont probablement indépendants l'un de l'autre, et la relation entre l'apparition des dommages dans ces deux contextes, la réorganisation de la chromatine et la présence de bases nucléiques oxydées sera détaillée ci-après.

A. Lien entre les réarrangements chromatinien induit par le NTER et l'apparition de lésions

La réorganisation de la chromatine, observée en présence du NTER, est associée à l'apparition de lésions génomiques qui ont été mises en évidence par une élévation des taux de γ H2AX et de PARylation. Il est possible, bien que la molécule d'ADN soit de nature flexible, que cette restructuration importante de la chromatine exerce une tension trop élevée sur les fibres chromatinien entraînant l'apparition de cassures dans l'ADN. Alternativement, il se peut également que le nombre important de lésions, dans ce contexte, soit médié par des enzymes. Les topoisomérases sont décrites pour leur fonction d'élimination des contraintes physiques présentent au sein de la molécule d'ADN (J. C. Wang 2002). Lors des processus de réplication et de transcription par exemple, les deux brins complémentaires de l'ADN se dissocient, entraînant des tensions topologiques au sein de la molécule. Cette tension est alors atténuée ou éliminée par le clivage momentané de la double hélice via l'activité des topoisomérases (Seol et Neuman 2016). Dans le contexte où la chromatine se trouve ségréguée du nucléoplasme et fortement remaniée, il est possible que ce phénomène conduise à une augmentation de l'activité des topoisomérases qui participeraient au « démêlage » de fragments d'ADN potentiellement entremêlés à la suite de cette ségrégation chromatinien induite par le domaine NTER de TET1. Afin de tester cette hypothèse, une étude par immunofluorescence de γ H2AX pourrait être réalisée en présence et en absence d'inhibiteur de topoisomérase. D'un autre point de vue, ce réarrangement chromatinien massif et persistant dans le temps peut être nocif pour le maintien de l'intégrité cellulaire. Dans cette situation, l'apoptose pourrait être activée via l'activité de protéines caspases. Ces dernières clivent plusieurs protéines cibles parmi lesquelles l'hétérodimère DNA fragmentation factor (DFF). Il en résulte une séparation et une activation des deux sous-unités protéiques composant le DFF. Ces deux sous-unités sont responsables de la fragmentation de l'ADN (Xuesong Liu et al. 1997). L'augmentation du nombre de lésions peut possiblement être le résultat de l'activation de caspases qui initient la mort cellulaire. Il serait intéressant de déterminer par immunofluorescence l'état d'activation des caspases dans les cellules dont la chromatine a été réorganisée par la présence du domaine NTER de TET1.

Ainsi, différents phénomènes, qui restent encore à caractériser, pourraient être responsables de l'apparition de lésions au sein de la chromatine réorganisée.

B. Lien entre l'activité enzymatique de TET1 et la présence de dommages à l'ADN

Si des niveaux importants de γ H2AX et de PARylation ont pu être observés en présence du NTER, fragment dépourvu d'activité catalytique, des taux élevés ont également été révélés en présence des versions catalytiquement actives de la protéine TET1, le FL et le CTER. En plus d'une élévation du taux de γ H2AX, la surexpression de la protéine TET1 entière mais aussi de son domaine catalytique situé dans la région CTER, se traduit aussi par une induction de la signalisation PAR, vraisemblablement catalysée par PARP1. Cette activation de la PARylation participe à la rétention du remodeleur ALC1 sur la chromatine. Ces phénomènes ne sont pas observables en présence des versions inactives de TET1, suggérant que le recrutement de PARP1 et ALC1 à la chromatine ne se fait pas à travers des interactions protéiques avec TET1, s'associant avec la chromatine, mais via l'activité enzymatique de la dioxygénase. L'activité enzymatique de TET1 enrichie la chromatine en formes oxydées de la 5mC qui sont 5hmC (comme montré en Fig 2.C), 5fC et 5caC. Les deux dernières formes oxydées issues de cette activité catalytique, 5fC et 5caC, sont rapidement reconnues et excisées par la glycosylase TDG, créant un site abasique. Ce dernier est ensuite clivé par l'endonucléase APE1, créant un site de cassure simple brin « SSB » (Weber et al. 2016). Les fonctions principales de PARP1 et ALC1 étant associées à la réparation des dommages à l'ADN, il est donc possible que la présence de cassures simple brins (SSBs), induites par l'action combinée de la dioxygénase TET1 (FL ou CTER), de la glycosylase TDG et de l'endonucléase APE1, soit à l'origine de l'activation des signalisations γ H2AX et PAR. La PARylation catalysée par PARP1 mènerait ensuite au recrutement de ALC1. La protéine ALC1 via son activité de remodeleur de la chromatine, ouvrirait cette dernière afin de créer un environnement chromatinien favorable au recrutement des autres acteurs impliqués dans la voie du BER notamment la DNA ligase III et l'ADN polymérase β . Afin de vérifier si la présence de dommages pourrait être liée à la réparation des formes oxydées des 5mC, les niveaux de γ H2AX pourraient être

analysés en présence du CTER mais en absence de la protéine qui initie cette réparation, la TDG, par interférence à ARN. L'implication de ALC1 dans la réparation de SSBs induites par l'activité de TET1 pourrait être étudiée par FRAP dans ce même contexte, c'est-à-dire en condition d'expression du CTER et en absence de la TDG. Ainsi, si la dynamique de ALC1 est impactée par l'absence de la TDG, cela renforcera l'hypothèse du rôle de ce remodeleur dans la réparation de SSBs résultant des activités combinées de TET1-TDG-APE1 (Fig 17.A).

Dans certains cas, la présence de cassures et leur réparation au sein de régions régulatrices de gènes sont associées à la stimulation de la transcription de gènes cibles (Ju et al. 2006; Madabhushi et al. 2015; Puc, Aggarwal, et Rosenfeld 2017; Puc et al. 2015; Trotter, King, et Archer 2015). L'implication de PARP1 dans la réparation des dommages induits par les topoisomérases a déjà été rapportée (Ju et al. 2006; Trotter, King, et Archer 2015). L'induction de cassures par ces enzymes ou par le système CRISPR-Cas9 serait suffisante pour l'activation de la transcription (Madabhushi et al. 2015). Dans ce contexte, il est suggéré que la fonction des topoisomérases serait d'éliminer les contraintes topologiques de l'ADN et de la chromatine dans le cas où des régions distales et proximales se trouvent associées (Madabhushi et al. 2015). Il est possible que, indépendamment de la réparation des formes oxydées de 5mC, l'élévation du taux de dommages soit le résultat de l'activité des topoisomérases. La présence de ces enzymes au sein de régions régulatrices de gènes semble être favorisée par des stimulateurs de la transcription tels que le N-methyl-D-aspartate, stimulant l'activité neuronale, et des hormones, stimulant la transcription de gènes hormonaux-dépendants (Ju et al. 2006; Puc et al. 2015; Trotter, King, et Archer 2015). Dans ce contexte, les produits d'activité des protéines TET, 5hmC, 5fC et 5caC, représenteraient des signaux positifs et concomitants à la présence de facteurs de transcription au sein de régions régulatrices. Cette étape d'initiation de la transcription serait ensuite suivie par le recrutement des enzymes topoisomérases afin de limiter les contraintes topologiques au niveau des gènes cibles. Les lésions double brins induites par les topoisomérases se trouveraient ensuite réparées par l'action combinée de PARP1 et de ALC1, l'ouverture de la chromatine par ALC1 permettant de recruter la machinerie de réparation. L'élimination des tensions architecturales de la chromatine ainsi que la réparation

des lésions nécessaires à l'atténuation des contraintes participeraient ensemble à la stimulation de la transcription (Fig17.B). Pour vérifier cette possibilité, une analyse des niveaux de γ H2AX et PAR par immunofluorescence, lors de l'altération de l'activité enzymatique des topoisomérases et en présence du CTER, pourraient être réalisée.

Cependant, la réparation de lésions dans l'ADN n'est pas la seule fonction connue de PARP1. Cette polymérase a également un rôle de régulateur de la transcription en maintenant un statut accessible de la chromatine au niveau de promoteurs, principalement via l'éviction de H1 (Ju et al. 2006; Krishnakumar et Kraus 2010). En plus de son action sur l'architecture de la chromatine au sein de régions régulatrices proximales, PARP1 permet le recrutement d'activateurs de la transcription notamment l'histone acétyl-transférase P300 (Robaszkiewicz et al. 2018), le facteur de transcription NF- κ B (Hassa et al. 2003) et bien d'autres acteurs impliqués dans la transcription (Kraus et Lis 2003). PARP1 a également été décrit *in vitro* comme interagissant avec TET1, permettant une régulation réciproque de leur activité (Ciccarone et al. 2015). Ces données révèlent un lien entre la déméthylation induite par TET1 et l'activité polymérase de PARP1. De plus, indépendamment de la présence de dommages, la présence de PARylation promeut l'hydroxylation de 5mC par TET1 autour du site de liaison du récepteur nucléaire peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) (Fujiki et al. 2013), révélant un lien entre la PARylation et l'activité de TET1 dans la régulation de la transcription. Il est ainsi possible que l'enrichissement en marques oxydées de la cytosine et la PARylation puisse ensemble participer à l'élaboration d'un code épigénétique modulant l'expression génique. La présence de 5hmC, de 5fC et/ou de 5caC au sein de régions régulatrices, pourrait mener directement ou indirectement, via le recrutement de protéines de liaison, à l'enrichissement de PARP1 sur la chromatine. L'activation de PARP1, indépendamment de la présence de dommages, pourrait induire une augmentation des niveaux de PARylation des histones et/ou des facteurs de transcription, menant ainsi au recrutement du remodeleur de la chromatine ALC1. Des fonctions de ce remodeleur dans la régulation de la transcription ont été décrites. La protéine ALC1, aussi appelée CHD1L, peut en effet s'accumuler au niveau de promoteurs de certains gènes et induire l'ouverture locale de la

chromatine, favorisant la transcription des gènes concernés (M. Liu et al. 2016). En association avec l'activité de PARP1, ALC1 module l'organisation de la chromatine de gènes de pluripotence lors de l'induction de la reprogrammation cellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris (B.-H. Jiang et al. 2015). Dans ce contexte, le recrutement de ALC1 au niveau de chaînes de PAR permettrait via son activité de remodelleur de la chromatine, d'ouvrir celle-ci afin de la rendre accessible à la machinerie de transcription (Fig17.C). Ensemble, ces protéines pourraient participer à l'établissement d'un environnement chromatinien favorable ou non au processus de transcription. Si cela est le cas une nouvelle relation entre PARP1-TET1 et ALC1 pourrait être mise en évidence.

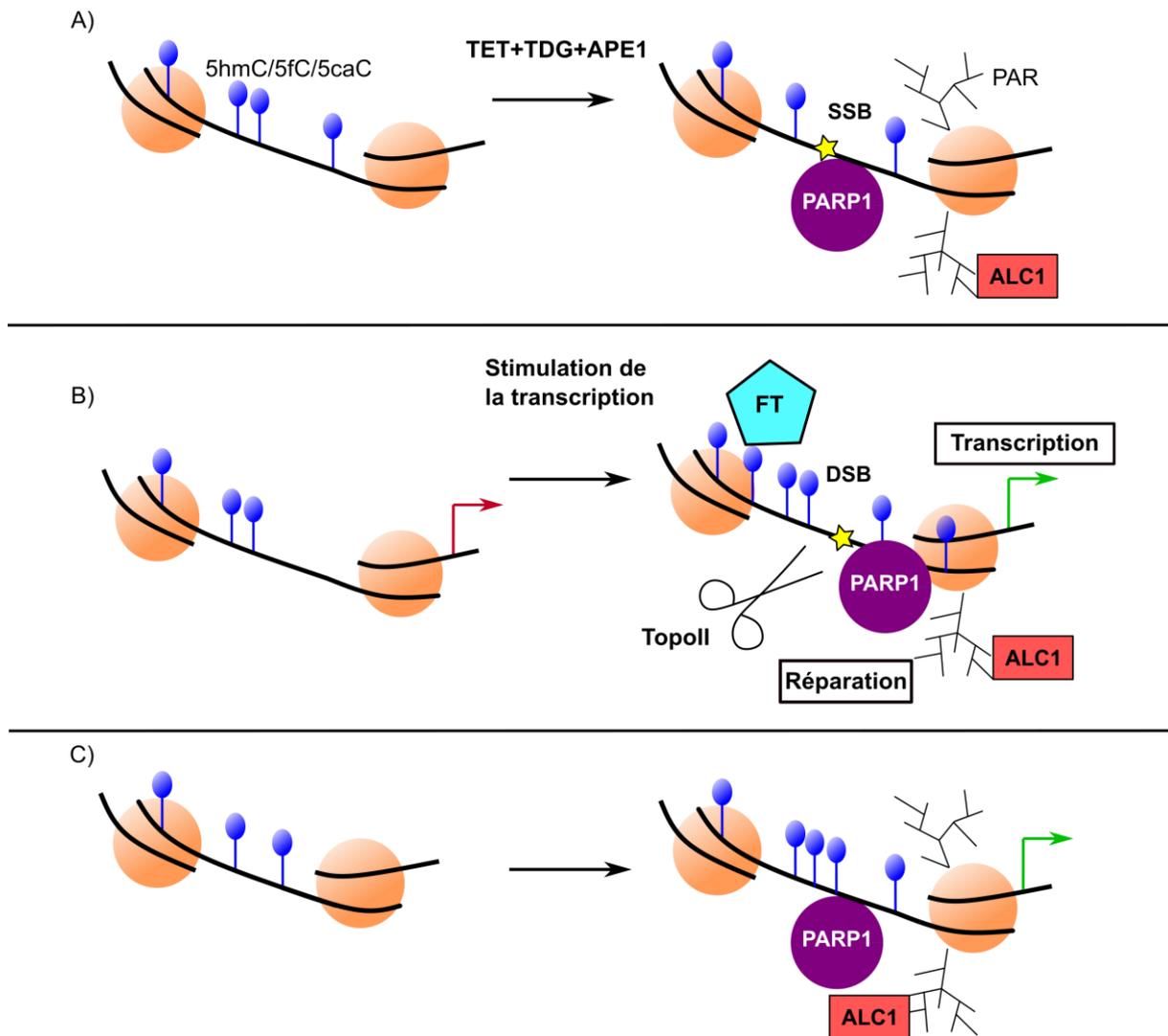


Fig17. Représentation schématique des plausibles liens entre l'activité enzymatique des TET et PARP1/ALC1. A) La réparation des formes oxydées (éléments bleus) de 5mC induisent la présence de cassures simple brins "SSB" (étoile jaune) qui sont reconnues par la protéine de réparation PARP1. PARP1 PARyle (branchements noirs) les protéines environnantes menant au recrutement de ALC1 à la chromatine. B) La stimulation de la transcription entraîne la liaison de facteur de transcription, de l'apparition de formes oxydées de 5mC et la présence de la Topoisomérase "Topo II". La topoisomérase clive l'ADN, créant un dommage (étoile jaune). Celui-ci est reconnu et signalé par la PARylation médiée par PARP1. La PARylation mène au recrutement de ALC1 qui en tant que remodelleur, permet le recrutement de la machinerie de réparation à la lésion désormais accessible. La réparation de la lésion induit l'activation de la transcription. C) Indépendamment de la présence de dommages, l'enrichissement en formes oxydées de la cytosine peut promouvoir le recrutement de PARP1. La PARylation favorise le recrutement de ALC1 rendant la chromatine accessible à la machinerie de transcription et favorable pour ce processus.

III. Les effets observés à l'échelle du noyau peuvent être le reflet d'événements se déroulant à l'échelle d'un locus

Bien que ces expériences aient été réalisées dans un contexte de surexpression, il reste néanmoins possible que les événements décrits ici se produisent aussi dans des conditions physiologiques, au sein de régions génomiques ciblées par TET1. La réorganisation de la chromatine est observée à l'échelle du noyau lorsque la protéine TET1 ou son domaine NTER est surexprimé. Dans des conditions physiologiques, la présence de TET1 au niveau de régions régulatrices, pourrait via son domaine NTER participer à la réorganisation locale de la chromatine notamment lors du processus de transcription. Cette restructuration affecterait la dynamique d'échange des histones, avec notamment une éviction de l'histone H1. A l'échelle du gène, la déplétion de l'histone H1 au sein de régions liées par le domaine NTER de TET1 pourrait être révélée par immunoprécipitation de la chromatine. De la même manière au sein de ces régions, les marques d'histones positives et négatives pour la transcription pourraient être analysées. En présence du domaine NTER, l'état transcriptionnel des gènes dont la ou les région(s) régulatrice(s) sont liées par celui-ci pourra être caractérisé en parallèle par RT-qPCR. De telles données, obtenues en présence du NTER, pourraient être comparées à celles obtenues en présence de la protéine entière afin de mieux définir le rôle du domaine N-terminal de TET1 dans la modulation de l'architecture de la chromatine et de l'expression génique.

CONCLUSION :

En conclusion, ce projet a permis d'établir que les régions N-terminale et C-terminale de TET1 ont des effets distincts sur la chromatine et l'expression génique. Ces données suggèrent donc que la protéine longue TET1 et son variant nouvellement identifié TET1-courte pourraient avoir des fonctions distinctes. Outre son implication dans le recrutement de TET1 au sein de régions génomiques, nos résultats montrent que le domaine NTER participe lui-même à la modulation de l'organisation de la chromatine. Le domaine CTER quant à lui, via son activité catalytique, entraîne

l'apparition de dommages à l'ADN et le recrutement du remodeleur ALC1 dont la fonction dans ce contexte reste à caractériser.

Références

- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, et Peter Walter. 2002. « DNA-Binding Motifs in Gene Regulatory Proteins ». *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26806/>.
- Angelov, Dimitar, Joseph M. Vitolo, Vesco Mutskov, Stefan Dimitrov, et Jeffrey J. Hayes. 2001. « Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6599-6604. <https://doi.org/10.1073/pnas.121171498>.
- Aoki, Asako, Isao Suetake, Junichi Miyagawa, Takayuki Fujio, Takahito Chijiwa, Hiroyuki Sasaki, et Shoji Tajima. 2001. « Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases ». *Nucleic Acids Research* 29 (17): 3506-12. <https://doi.org/10.1093/nar/29.17.3506>.
- Attikum, Haico van, Olivier Fritsch, et Susan M. Gasser. 2007. « Distinct Roles for SWR1 and INO80 Chromatin Remodeling Complexes at Chromosomal Double-Strand Breaks ». *The EMBO Journal* 26 (18): 4113-25. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601835>.
- Ausió, Juan. 2006. « Histone Variants--the Structure behind the Function ». *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 5 (3): 228-43. <https://doi.org/10.1093/bfgp/ell020>.
- Avner, Philip, et Edith Heard. 2001. « X-Chromosome Inactivation: Counting, Choice and Initiation ». *Nature Reviews Genetics* 2 (1): 59-67. <https://doi.org/10.1038/35047580>.
- Bachman, Martin, Santiago Uribe-Lewis, Xiaoping Yang, Heather E Burgess, Mario Iurlaro, Wolf Reik, Adele Murrell, et Shankar Balasubramanian. 2015. « 5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals ». *Nature chemical biology* 11 (8): 555-57. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1848>.
- Banères, Jean-Louis, Aimée Martin, et Joseph Parello. 1997. « The N Tails of Histones H3 and H4 Adopt a Highly Structured Conformation in the Nucleosome ». Edited by T. Richmond ». *Journal of Molecular Biology* 273 (3): 503-8. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1297>.
- Bannister, Andrew J., et Tony Kouzarides. 2011. « Regulation of Chromatin by Histone Modifications ». *Cell Research* 21 (3): 381-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- Bannister, Andrew J., Philip Zegerman, Janet F. Partridge, Eric A. Miska, Jean O. Thomas, Robin C. Allshire, et Tony Kouzarides. 2001. « Selective Recognition of Methylated Lysine 9 on Histone H3 by the HP1 Chromo Domain ». *Nature* 410 (6824): 120-24. <https://doi.org/10.1038/35065138>.
- Bao, Yunhe, Kasey Konesky, Young-Jun Park, Simona Rosu, Pamela N Dyer, Danny Rangasamy, David J Tremethick, Paul J Laybourn, et Karolin Luger. 2004. « Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA ». *The EMBO Journal* 23 (16): 3314-24. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600316>.
- Bartlett, Edward, Juan José Bonfiglio, Evgeniia Prokhorova, Thomas Colby, Florian Zobel, Ivan Ahel, et Ivan Matic. 2018. « Interplay of Histone Marks with Serine

- ADP-Ribosylation ». *Cell Reports* 24 (13): 3488-3502.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.092>.
- Bhattacharya, Sanjoy K., Shyam Ramchandani, Nadia Cervoni, et Moshe Szyf. 1999. « A Mammalian Protein with Specific Demethylase Activity for MCpG DNA ». *Nature* 397 (6720): 579-83. <https://doi.org/10.1038/17533>.
- Bhutani, Nidhi, David M. Burns, et Helen M. Blau. 2011. « DNA Demethylation Dynamics ». *Cell* 146 (6): 866-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.042>.
- Bickmore, Wendy A, et Kathy Oghene. 1996. « Visualizing the Spatial Relationships between Defined DNA Sequences and the Axial Region of Extracted Metaphase Chromosomes ». *Cell* 84 (1): 95-104. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80996-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80996-4).
- Bird, A., et D. Macleod. 2004. « Reading the DNA Methylation Signal ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 69 (janvier): 113-18. <https://doi.org/10.1101/sqb.2004.69.113>.
- Bird, A. P. 1980. « DNA Methylation and the Frequency of CpG in Animal DNA ». *Nucleic Acids Research* 8 (7): 1499-1504. <https://doi.org/10.1093/nar/8.7.1499>.
- . 1986. « CpG-Rich Islands and the Function of DNA Methylation ». *Nature* 321 (6067): 209-13. <https://doi.org/10.1038/321209a0>.
- Biterge, Burcu, et Robert Schneider. 2014. « Histone Variants: Key Players of Chromatin ». *Cell and Tissue Research* 356 (3): 457-66. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1862-4>.
- Blackledge, Neil P., Jin C. Zhou, Michael Y. Tolstorukov, Anca M. Farcas, Peter J. Park, et Robert J. Klose. 2010. « CpG Islands Recruit a Histone H3 Lysine 36 Demethylase ». *Molecular Cell* 38 (2-2): 179-90. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.009>.
- Bolzer, Andreas, Gregor Kreth, Irina Solovei, Daniela Koehler, Kaan Saracoglu, Christine Fauth, Stefan Müller, et al. 2005. « Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes ». *PLoS biology* 3 (juin): e157. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030157>.
- Bonfiglio, Juan José, Pietro Fontana, Qi Zhang, Thomas Colby, Ian Gibbs-Seymour, Ilian Atanassov, Edward Bartlett, Roko Zaja, Ivan Ahel, et Ivan Matic. 2017. « Serine ADP-Ribosylation Depends on HPF1 ». *Molecular Cell* 65 (5): 932-940.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.003>.
- Bourc'his, D., P. Miniou, M. Jeanpierre, D. Molina Gomes, J.-M. Dupont, G. De Saint-Basile, P. Maraschio, L. Tiepolo, et E. Viegas-Péquignot. 1999. « Abnormal Methylation Does Not Prevent X Inactivation in ICF Patients ». *Cytogenetic and Genome Research* 84 (3-4): 245-52. <https://doi.org/10.1159/000015269>.
- Branco, Miguel R., et Ana Pombo. 2006. « Intermingling of Chromosome Territories in Interphase Suggests Role in Translocations and Transcription-Dependent Associations ». *PLOS Biology* 4 (5): e138. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040138>.
- Burke, Kathleen A., Abigail M. Janke, Christy L. Rhine, et Nicolas L. Fawzi. 2015. « Residue-by-Residue View of In Vitro FUS Granules That Bind the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II ». *Molecular Cell* 60 (2): 231-41. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.006>.

- Cai, Yichao, Ying Zhang, Yan Ping Loh, Jia Qi Tng, Mei Chee Lim, Zhendong Cao, Anandkumar Raju, et al. 2021. « H3K27me3-Rich Genomic Regions Can Function as Silencers to Repress Gene Expression via Chromatin Interactions ». *Nature Communications* 12 (1): 719. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20940-y>.
- Calo, Eliezer, et Joanna Wysocka. 2013. « Modification of enhancer chromatin: what, how and why? » *Molecular cell* 49 (5). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.038>.
- Catez, Frédéric, David T. Brown, Tom Misteli, et Michael Bustin. 2002. « Competition between Histone H1 and HMGN Proteins for Chromatin Binding Sites ». *EMBO Reports* 3 (8): 760-66. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf156>.
- Chakravarthy, Srinivas, Sampath Kumar Y. Gundimella, Cecile Caron, Pierre-Yves Perche, John R. Pehrson, Saadi Khochbin, et Karolin Luger. 2005. « Structural Characterization of the Histone Variant MacroH2A ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (17): 7616-24. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.17.7616-7624.2005>.
- Chakravarthy, Srinivas, et Karolin Luger. 2006. « The Histone Variant Macro-H2A Preferentially Forms “Hybrid Nucleosomes” ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (35): 25522-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602258200>.
- Chang, Li-Hsin, Sourav Ghosh, et Daan Noordermeer. 2020. « TADs and Their Borders: Free Movement or Building a Wall? » *Journal of Molecular Biology* 432 (3): 643-52. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.11.025>.
- Chantalat, L., J. M. Nicholson, S. J. Lambert, A. J. Reid, M. J. Donovan, C. D. Reynolds, C. M. Wood, et J. P. Baldwin. 2003. « Structure of the Histone-Core Octamer in KCl/Phosphate Crystals at 2.15 Å Resolution ». *Acta Crystallographica Section D* 59 (8): 1395-1407. <https://doi.org/10.1107/S0907444903011880>.
- Chen, Chun-Chang, Keh-Yang Wang, et Che-Kun James Shen. 2013. « DNA 5-Methylcytosine Demethylation Activities of the Mammalian DNA Methyltransferases ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (13): 9084-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445585>.
- Chen, Danyang, Miroslav Dundr, Chen Wang, Anthony Leung, Angus Lamond, Tom Misteli, et Sui Huang. 2005. « Condensed Mitotic Chromatin Is Accessible to Transcription Factors and Chromatin Structural Proteins ». *The Journal of Cell Biology* 168 (1): 41-54. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407182>.
- Cheung, Edwin, Alla S. Zarifyan, et W. Lee Kraus. 2002. « Histone H1 Represses Estrogen Receptor α Transcriptional Activity by Selectively Inhibiting Receptor-Mediated Transcription Initiation ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (8): 2463-71. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.8.2463-2471.2002>.
- Chiariello, Andrea M., Carlo Annunziatella, Simona Bianco, Andrea Esposito, et Mario Nicodemi. 2016. « Polymer physics of chromosome large-scale 3D organisation ». *Scientific Reports* 6 (juillet). <https://doi.org/10.1038/srep29775>.
- Choy, John S., Sijie Wei, Ju Yeon Lee, Steven Chu, Song Tan, et Tae-Hee Lee. 2010. « DNA Methylation Increases Nucleosome Compaction and Rigidity ». *Journal of the American Chemical Society* 132 (6): 1782-83. <https://doi.org/10.1021/ja910264z>.
- Chrysanthou, Stephanie, Claire E. Senner, Laura Woods, Elena Fineberg, Hanneke Okkenhaug, Sarah Burge, Vicente Perez-Garcia, et Myriam Hemberger. 2018. « A Critical Role of TET1/2 Proteins in Cell-Cycle Progression of Trophoblast

- Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 10 (4): 1355-68. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.014>.
- Ciccarone, Fabio, Elisabetta Valentini, Michele Zampieri, et Paola Caiafa. 2015. « 5mC-hydroxylase activity is influenced by the PARylation of TET1 enzyme ». *Oncotarget* 6 (juin). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4476>.
- Conte, Mattia, Luca Fiorillo, Simona Bianco, Andrea M. Chiariello, Andrea Esposito, et Mario Nicodemi. 2020. « Polymer Physics Indicates Chromatin Folding Variability across Single-Cells Results from State Degeneracy in Phase Separation ». *Nature Communications* 11 (1): 3289. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17141-4>.
- Coticello, Silvestro G., Marc-Andre Langlois, Zizhen Yang, et Michael S. Neuberger. 2007. « DNA Deamination in Immunity: AID in the Context of Its APOBEC Relatives ». In *Advances in Immunology*, 94:37-73. AID for Immunoglobulin Diversity. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)94002-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)94002-4).
- Cortellino, Salvatore, Jinfei Xu, Mara Sannai, Robert Moore, Elena Caretti, Antonio Cigliano, Madeleine Le Coz, et al. 2011. « Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair ». *Cell* 146 (1): 67-79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.020>.
- Cremer, T., C. Cremer, H. Baumann, E. K. Luedtke, K. Sperling, V. Teuber, et C. Zorn. 1982. « Rabl's Model of the Interphase Chromosome Arrangement Tested in Chinese Hamster Cells by Premature Chromosome Condensation and Laser-UV-Microbeam Experiments ». *Human Genetics* 60 (1): 46-56. <https://doi.org/10.1007/BF00281263>.
- Cremer, Thomas, et Marion Cremer. 2010. « Chromosome Territories ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (3): a003889. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>.
- Csankovszki, Györgyi, András Nagy, et Rudolf Jaenisch. 2001. « Synergism of Xist Rna, DNA Methylation, and Histone Hypoacetylation in Maintaining X Chromosome Inactivation ». *The Journal of Cell Biology* 153 (4): 773-84.
- Davidson, Iain F., Benedikt Bauer, Daniela Goetz, Wen Tang, Gordana Wutz, et Jan-Michael Peters. 2019. « DNA Loop Extrusion by Human Cohesin ». *Science* 366 (6471): 1338-45. <https://doi.org/10.1126/science.aaz3418>.
- Deplus, Rachel, Benjamin Delatte, Marie K. Schwinn, Matthieu Defrance, Jacqui Méndez, Nancy Murphy, Mark A. Dawson, et al. 2013. « TET2 and TET3 Regulate GlcNAcylation and H3K4 Methylation through OGT and SET1/COMPASS ». *The EMBO Journal* 32 (5): 645-55. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.357>.
- Derreumaux, Sylvie, Mounia Chaoui, Georges Tevanian, et Serge Femandjian. 2001. « Impact of CpG methylation on structure, dynamics and solvation of cAMP DNA responsive element ». *Nucleic Acids Research* 29 (11): 2314-26.
- Detlef Doenecke, Peter Karlson. 1984. « Albrecht Kossel and the Discovery of Histones ». *Trends in Biochemical Sciences* 9 (9): 404-5. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(84\)90226-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(84)90226-3).
- Dixon, Jesse R., Siddarth Selvaraj, Feng Yue, Audrey Kim, Yan Li, Yin Shen, Ming Hu, Jun S. Liu, et Bing Ren. 2012. « Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions ». *Nature* 485 (7398): 376-80. <https://doi.org/10.1038/nature11082>.

- Dorigo, Benedetta, Thomas Schalch, Alexandra Kulangara, Sylwia Duda, Rasmus R. Schroeder, et Timothy J. Richmond. 2004. « Nucleosome Arrays Reveal the Two-Start Organization of the Chromatin Fiber ». *Science* 306 (5701): 1571-73. <https://doi.org/10.1126/science.1103124>.
- Dosztányi, Zsuzsanna. 2018. « Prediction of protein disorder based on IUPred ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 27 (1): 331-40. <https://doi.org/10.1002/pro.3334>.
- Erdel, Fabian, Anne Rademacher, Rifka Vlijm, Jana Tünnermann, Lukas Frank, Robin Weinmann, Elisabeth Schweigert, et al. 2020. « Mouse Heterochromatin Adopts Digital Compaction States without Showing Hallmarks of HP1-Driven Liquid-Liquid Phase Separation ». *Molecular Cell* 78 (2): 236-249.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.005>.
- Erdel, Fabian, et Karsten Rippe. 2018. « Formation of Chromatin Subcompartments by Phase Separation ». *Biophysical Journal* 114 (10): 2262-70. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.011>.
- Erdős, Gábor, et Zsuzsanna Dosztányi. 2020. « Analyzing Protein Disorder with IUPred2A ». *Current Protocols in Bioinformatics* 70 (1): e99. <https://doi.org/10.1002/cpbi.99>.
- Estève, Pierre-Olivier, Hang Gyeong Chin, Andrea Smallwood, George R. Feehery, Omkaram Gangisetty, Adam R. Karpf, Michael F. Carey, et Sriharsa Pradhan. 2006. « Direct Interaction between DNMT1 and G9a Coordinates DNA and Histone Methylation during Replication ». *Genes & Development* 20 (22): 3089-3103. <https://doi.org/10.1101/gad.1463706>.
- Feldmann, Angelika, Robert Ivanek, Rabih Murr, Dimos Gaidatzis, Lukas Burger, et Dirk Schübeler. 2013. « Transcription Factor Occupancy Can Mediate Active Turnover of DNA Methylation at Regulatory Regions ». *PLOS Genetics* 9 (12): e1003994. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003994>.
- Feng, Q., et Y. Zhang. 2001. « The MeCP1 Complex Represses Transcription through Preferential Binding, Remodeling, and Deacetylating Methylated Nucleosomes ». *Genes & Development* 15 (7): 827-32. <https://doi.org/10.1101/gad.876201>.
- Feng, Yang, Neng-Bin Xie, Wan-Bing Tao, Jiang-Hui Ding, Xue-Jiao You, Cheng-Jie Ma, Xiaoxue Zhang, et al. 2020. « Transformation of 5-Carboxylcytosine to Cytosine Through C–C Bond Cleavage in Human Cells Constitutes a Novel Pathway for DNA Demethylation ». *CCS Chemistry*, juillet, 994-1008. <https://doi.org/10.31635/ccschem.020.202000286>.
- Fenouil, Romain, Pierre Cauchy, Frederic Koch, Nicolas Descostes, Joaquin Zacarias Cabeza, Charlène Innocenti, Pierre Ferrier, et al. 2012. « CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters ». *Genome Research* 22 (12): 2399-2408. <https://doi.org/10.1101/gr.138776.112>.
- Ferguson-Smith, Anne C., Hiroyuki Sasaki, Bruce M. Cattanach, et M. Azim Surani. 1993. « Parental-Origin-Specific Epigenetic Modification of the Mouse H19 Gene ». *Nature* 362 (6422): 751-55. <https://doi.org/10.1038/362751a0>.
- Ferreira, Helder, Joanna Somers, Ryan Webster, Andrew Flaus, et Tom Owen-Hughes. 2007. « Histone Tails and the H3 α N Helix Regulate Nucleosome Mobility and Stability ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (11): 4037-48. <https://doi.org/10.1128/MCB.02229-06>.

- Ficz, Gabriella, Miguel R. Branco, Stefanie Seisenberger, Fátima Santos, Felix Krueger, Timothy A. Hore, C. Joana Marques, Simon Andrews, et Wolf Reik. 2011. « Dynamic Regulation of 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse ES Cells and during Differentiation ». *Nature* 473 (7347): 398-402. <https://doi.org/10.1038/nature10008>.
- Finch, J. T., et A. Klug. 1976. « Solenoidal Model for Superstructure in Chromatin. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73 (6): 1897-1901. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.6.1897>.
- Frauer, Carina, Andrea Rottach, Daniela Meilinger, Sebastian Bultmann, Karin Fellingner, Stefan Hasenöder, Mengxi Wang, et al. 2011. « Different Binding Properties and Function of CXXC Zinc Finger Domains in Dnmt1 and Tet1 ». *PLoS One* 6 (2): e16627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016627>.
- Fujii, Yoshifumi, Masatoshi Wakamori, Takashi Umehara, et Shigeyuki Yokoyama. 2016. « Crystal structure of human nucleosome core particle containing enzymatically introduced CpG methylation ». *FEBS Open Bio* 6 (6): 498-514. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12064>.
- Fujiki, Katsunori, Akihiro Shinoda, Fumi Kano, Ryuichiro Sato, Katsuhiko Shirahige, et Masayuki Murata. 2013. « PPAR γ -Induced PARylation Promotes Local DNA Demethylation by Production of 5-Hydroxymethylcytosine ». *Nature Communications* 4 (1): 2262. <https://doi.org/10.1038/ncomms3262>.
- Fujita, Naoyuki, Sugiko Watanabe, Takaya Ichimura, Yoshiaki Ohkuma, Tsutomu Chiba, Hideyuki Saya, et Mitsuyoshi Nakao. 2003. « MCAF Mediates MBD1-Dependent Transcriptional Repression ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (8): 2834-43. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.8.2834-2843.2003>.
- Funayama, Ryo, Motoki Saito, Hiroko Tanobe, et Fuyuki Ishikawa. 2006. « Loss of Linker Histone H1 in Cellular Senescence ». *The Journal of Cell Biology* 175 (6): 869-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604005>.
- Gatto, Sole, Miriam Gagliardi, M. Franzese, Sylwia Leppert, Mariarosaria Papa, Marco Cammisa, Giacomo Grillo, et al. 2017. « ICF-specific DNMT3B dysfunction interferes with intragenic regulation of mRNA transcription and alternative splicing ». *Nucleic Acids Research* 45 (février). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx163>.
- Gerdes, M G, K C Carter, P T Moen, et J B Lawrence. 1994. « Dynamic Changes in the Higher-Level Chromatin Organization of Specific Sequences Revealed by in Situ Hybridization to Nuclear Halos. » *Journal of Cell Biology* 126 (2): 289-304. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.2.289>.
- Gerlich, Daniel, Joël Beaudouin, Bernd Kalbfuss, Nathalie Daigle, Roland Eils, et Jan Ellenberg. 2003. « Global Chromosome Positions Are Transmitted through Mitosis in Mammalian Cells ». *Cell* 112 (6): 751-64. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00189-2).
- Gibcus, Johan H., et Job Dekker. 2013. « The Hierarchy of the 3D Genome ». *Molecular Cell* 49 (5): 773-82. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.011>.
- Gibcus, Johan H., Kumiko Samejima, Anton Goloborodko, Itaru Samejima, Natalia Naumova, Johannes Nuebler, Masato T. Kanemaki, et al. 2018. « A Pathway for Mitotic Chromosome Formation ». *Science* 359 (6376). <https://doi.org/10.1126/science.aa06135>.
- Gibson, Bryan A., Lynda K. Doolittle, Maximillian W. G. Schneider, Liv E. Jensen, Nathan Gamarra, Lisa Henry, Daniel W. Gerlich, Sy Redding, et Michael K.

- Rosen. 2019. « Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation ». *Cell* 179 (2): 470-484.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.037>.
- Globisch, Daniel, Martin Münzel, Markus Müller, Stylianos Michalakis, Mirko Wagner, Susanne Koch, Tobias Brückl, Martin Biel, et Thomas Carell. 2010. « Tissue Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine and Search for Active Demethylation Intermediates ». *PLoS One* 5 (12): e15367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015367>.
- Godfrey, Laura, Nicholas T. Crump, Ross Thorne, I.-Jun Lau, Emmanouela Repapi, Dimitra Dimou, Alastair L. Smith, et al. 2019. « DOT1L Inhibition Reveals a Distinct Subset of Enhancers Dependent on H3K79 Methylation ». *Nature Communications* 10 (1): 2803. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10844-3>.
- Good, Charly R., Jozef Madzo, Bela Patel, Shinji Maegawa, Nora Engel, Jaroslav Jelinek, et Jean-Pierre J. Issa. 2017. « A Novel Isoform of TET1 That Lacks a CXXC Domain Is Overexpressed in Cancer ». *Nucleic Acids Research* 45 (14): 8269-81. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx435>.
- Greer, C.B., J. Wright, J.D. Weiss, R.M. Lazarenko, S.P. Moran, J. Zhu, K.S. Chronister, et al. 2021. « Tet1 Isoforms Differentially Regulate Gene Expression, Synaptic Transmission, and Memory in the Mammalian Brain ». *The Journal of Neuroscience* 41 (4): 578-93. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1821-20.2020>.
- Guan, Pearl P., Weiqiang Zhou, et Hong Yan. 2012. « The Relationship between Geometric Patterns of Hydrogen Bonds and Periodic Dinucleotides in Nucleosome Structures ». *Journal of Theoretical Biology* 313 (novembre): 136-41. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.08.019>.
- Guelen, Lars, Ludo Pagie, Emilie Brasset, Wouter Meuleman, Marius B. Faza, Wendy Talhout, Bert H. Eussen, et al. 2008. « Domain Organization of Human Chromosomes Revealed by Mapping of Nuclear Lamina Interactions ». *Nature* 453 (7197): 948-51. <https://doi.org/10.1038/nature06947>.
- Guo, Fan, Xianlong Li, Dan Liang, Tong Li, Ping Zhu, Hongshan Guo, Xinglong Wu, et al. 2014. « Active and Passive Demethylation of Male and Female Pronuclear DNA in the Mammalian Zygote ». *Cell Stem Cell* 15 (4): 447-59. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.08.003>.
- Guo, Junjie U., Yijing Su, Chun Zhong, Guo-li Ming, et Hongjun Song. 2011. « Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain ». *Cell* 145 (3): 423-34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.022>.
- Gutiérrez, José L, Mark Chandy, Michael J Carrozza, et Jerry L Workman. 2007. « Activation Domains Drive Nucleosome Eviction by SWI/SNF ». *The EMBO Journal* 26 (3): 730-40. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601524>.
- Hagerman, P. J. 1990. « Pyrimidine 5-Methyl Groups Influence the Magnitude of DNA Curvature ». *Biochemistry* 29 (8): 1980-83. <https://doi.org/10.1021/bi00460a003>.
- Hansen, Anders S. 2020. « CTCF as a Boundary Factor for Cohesin-Mediated Loop Extrusion: Evidence for a Multi-Step Mechanism ». *Nucleus* 11 (1): 132-48. <https://doi.org/10.1080/19491034.2020.1782024>.

- Hansen, Anders S., Iryna Pustova, Claudia Cattoglio, Robert Tjian, et Xavier Darzacq. 2017. « CTCF and Cohesin Regulate Chromatin Loop Stability with Distinct Dynamics. », mai. <https://doi.org/10.7554/elife.25776>.
- Hansen, J. C., C. Tse, et A. P. Wolffe. 1998. « Structure and Function of the Core Histone N-Termini: More than Meets the Eye ». *Biochemistry* 37 (51): 17637-41. <https://doi.org/10.1021/bi982409v>.
- Hansen, R. Scott, Cisca Wijmenga, Ping Luo, Ann M. Stanek, Theresa K. Canfield, Corry M. R. Weemaes, et Stanley M. Gartler. 1999. « The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (25): 14412-17.
- Hardeland, U. 2003. « The Versatile Thymine DNA-Glycosylase: A Comparative Characterization of the Human, Drosophila and Fission Yeast Orthologs ». *Nucleic Acids Research* 31 (9): 2261-71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg344>.
- Hardwick, Jack S, Denis Ptchelkine, Afaf H El-Sagheer, Ian Tear, Daniel Singleton, Simon E V Phillips, Andrew N Lane, et Tom Brown. 2017. « 5-Formylcytosine Does Not Change the Global Structure of DNA ». *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (6): 544-52. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3411>.
- Hargreaves, Diana C., et Gerald R. Crabtree. 2011. « ATP-Dependent Chromatin Remodeling: Genetics, Genomics and Mechanisms ». *Cell Research* 21 (3): 396-420. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.32>.
- Harteis, Sabrina, et Sabine Schneider. 2014. « Making the Bend: DNA Tertiary Structure and Protein-DNA Interactions ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (7): 12335-63. <https://doi.org/10.3390/ijms150712335>.
- Hashimoto, Hideharu, Samuel Hong, Ashok Bhagwat, Xing Zhang, et Xiaodong Cheng. 2012. « Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: Its structural basis and implications for active DNA demethylation ». *Nucleic acids research* 40 (septembre). <https://doi.org/10.1093/nar/gks845>.
- Hassa, Paul O., Christine Buerki, Cornelia Lombardi, Ralph Imhof, et Michael O. Hottiger. 2003. « Transcriptional Coactivation of Nuclear Factor-KappaB-Dependent Gene Expression by P300 Is Regulated by Poly(ADP)-Ribose Polymerase-1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (46): 45145-53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307957200>.
- He, Yu-Fei, Bin-Zhong Li, Zheng Li, Peng Liu, Yang Wang, Qingyu Tang, Jianping Ding, et al. 2011. « Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 333 (6047): 1303-7. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>.
- Heinemann, U., et M. Hahn. 1992. « C-C-A-G-G-C-M5C-T-G-G. Helical Fine Structure, Hydration, and Comparison with C-C-A-G-G-C-C-T-G-G ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (11): 7332-41.
- Heintzman, Nathaniel D., Rhona K. Stuart, Gary Hon, Yutao Fu, Christina W. Ching, R. David Hawkins, Leah O. Barrera, et al. 2007. « Distinct and Predictive Chromatin Signatures of Transcriptional Promoters and Enhancers in the Human Genome ». *Nature Genetics* 39 (3): 311-18. <https://doi.org/10.1038/ng1966>.

- Hendrich, B., U. Hardeland, H. H. Ng, J. Jiricny, et A. Bird. 1999. « The Thymine Glycosylase MBD4 Can Bind to the Product of Deamination at Methylated CpG Sites ». *Nature* 401 (6750): 301-4. <https://doi.org/10.1038/45843>.
- Herzing, L. B., J. T. Romer, J. M. Horn, et A. Ashworth. 1997. « Xist Has Properties of the X-Chromosome Inactivation Centre ». *Nature* 386 (6622): 272-75. <https://doi.org/10.1038/386272a0>.
- Hizume, Kohji, Shige H. Yoshimura, et Kunio Takeyasu. 2005. « Linker Histone H1 per Se Can Induce Three-Dimensional Folding of Chromatin Fiber † ». *Biochemistry* 44 (39): 12978-89. <https://doi.org/10.1021/bi050623v>.
- Hosogane, Masaki, Ryo Funayama, Matsuyuki Shirota, et Keiko Nakayama. 2016. « Lack of Transcription Triggers H3K27me3 Accumulation in the Gene Body ». *Cell Reports* 16 (3): 696-706. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.034>.
- Hotchkiss, R. D. 1948. « The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography ». *The Journal of Biological Chemistry* 175 (1): 315-32.
- Hu, Jia-Lei, Bo O. Zhou, Run-Rui Zhang, Kang-Ling Zhang, Jin-Qiu Zhou, et Guo-Liang Xu. 2009. « The N-Terminus of Histone H3 Is Required for de Novo DNA Methylation in Chromatin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (52): 22187-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905767106>.
- Hu, Lulu, Ze Li, Jingdong Cheng, Qinhui Rao, Wei Gong, Mengjie Liu, Yujiang Geno Shi, Jiayu Zhu, Ping Wang, et Yanhui Xu. 2013. « Crystal Structure of TET2-DNA Complex: Insight into TET-Mediated 5mC Oxidation ». *Cell* 155 (7): 1545-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.020>.
- Huang, Yun, Lukas Chavez, Xing Chang, Xue Wang, William A. Pastor, Jinsuk Kang, Jorge A. Zepeda-Martínez, et al. 2014. « Distinct Roles of the Methylcytosine Oxidases Tet1 and Tet2 in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (4): 1361-66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322921111>.
- Iguchi-Ariga, S. M., et W. Schaffner. 1989. « CpG Methylation of the CAMP-Responsive Enhancer/Promoter Sequence TGACGTCA Abolishes Specific Factor Binding as Well as Transcriptional Activation. » *Genes & Development* 3 (5): 612-19. <https://doi.org/10.1101/gad.3.5.612>.
- Illingworth, Robert S., et Adrian P. Bird. 2009. « CpG Islands – ‘A Rough Guide’ ». *FEBS Letters* 583 (11): 1713-20. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>.
- Ito, Shinsuke, Ana C. D'Alessio, Olena V. Taranova, Kwonho Hong, Lawrence C. Sowers, et Yi Zhang. 2010. « Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES cell self-renewal, and ICM specification ». *Nature* 466 (7310): 1129-33. <https://doi.org/10.1038/nature09303>.
- Iurlaro, Mario, Gabriella Ficz, David Oxley, Eun-Ang Raiber, Martin Bachman, Michael J Booth, Simon Andrews, Shankar Balasubramanian, et Wolf Reik. 2013. « A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation ». *Genome Biology* 14 (10): R119. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r119>.
- Iurlaro, Mario, Gordon R. McInroy, Heather E. Burgess, Wendy Dean, Eun-Ang Raiber, Martin Bachman, Dario Beraldi, Shankar Balasubramanian, et Wolf Reik. 2016. « In vivo genome-wide profiling reveals a tissue-specific role for 5-

- formylcytosine ». *Genome Biology* 17 (juin). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1001-5>.
- Iwan, Katharina, René Rahimoff, Angie Kirchner, Fabio Spada, Arne S. Schröder, Olesea Kosmatchev, Shqiponja Ferizaj, et al. 2018. « 5-Formylcytosine to Cytosine Conversion by C-C Bond Cleavage in Vivo ». *Nature Chemical Biology* 14 (1): 72-78. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2531>.
- Jaffe, Elizabeth, et Charles Laird. 1986. « Dosage Compensation in Drosophila ». *Trends in Genetics* 2 (janvier): 316-21. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(86\)90287-8](https://doi.org/10.1016/0168-9525(86)90287-8).
- Jiang, Bo-Hua, Wei-Yi Chen, Hsin-Yang Li, Yueh Chien, Wei-Chao Chang, Pei-Chen Hsieh, Ping Wu, et al. 2015. « CHD1L Regulated PARP1-Driven Pluripotency and Chromatin Remodeling During the Early-Stage Cell Reprogramming ». *STEM CELLS* 33 (10): 2961-72. <https://doi.org/10.1002/stem.2116>.
- Jiang, Dewei, Shu Wei, Fei Chen, Ying Zhang, et Jiali Li. 2017. « TET3-Mediated DNA Oxidation Promotes ATR-Dependent DNA Damage Response ». *EMBO Reports* 18 (5): 781-96. <https://doi.org/10.15252/embr.201643179>.
- Jiang, Dewei, Ying Zhang, Ronald P. Hart, Jianmin Chen, Karl Herrup, et Jiali Li. 2015. « Alteration in 5-Hydroxymethylcytosine-Mediated Epigenetic Regulation Leads to Purkinje Cell Vulnerability in ATM Deficiency ». *Brain: A Journal of Neurology* 138 (Pt 12): 3520-36. <https://doi.org/10.1093/brain/awv284>.
- Jimenez-Useche, Isabel, Jiaying Ke, Yuqing Tian, Daphne Shim, Steven C. Howell, Xiangyun Qiu, et Chongli Yuan. 2013. « DNA Methylation Regulated Nucleosome Dynamics ». *Scientific Reports* 3 (juillet). <https://doi.org/10.1038/srep02121>.
- Johnson, Treat B., et Robert D. Coghill. 1925. « RESEARCHES ON PYRIMIDINES. C111. THE DISCOVERY OF 5-METHYL-CYTOSINE IN TUBERCULINIC ACID, THE NUCLEIC ACID OF THE TUBERCLE BACILLUS1 ». *Journal of the American Chemical Society* 47 (11): 2838-44. <https://doi.org/10.1021/ja01688a030>.
- Jørgensen, Helle F., Ittai Ben-Porath, et Adrian P. Bird. 2004. « Mbd1 Is Recruited to both Methylated and Nonmethylated CpGs via Distinct DNA Binding Domains ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (8): 3387-95. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.8.3387-3395.2004>.
- Ju, Bong-Gun, Victoria V Lunyak, Valentina Perissi, Ivan Garcia-Bassets, David W Rose, Christopher K Glass, et Michael G Rosenfeld. 2006. « A Topoisomerase IIb-Mediated DsDNA Break Required for Regulated Transcription » 312: 7.
- Juan, L. J., R. T. Utle, M. Vignali, L. Bohm, et J. L. Workman. 1997. « H1-Mediated Repression of Transcription Factor Binding to a Stably Positioned Nucleosome ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3635-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3635>.
- Jurkowski, Tomasz P. 2020. « Chapter Thirteen - Technologies and Applications for the Assessment of 5-Hydroxymethylcytosine ». In *Epigenetics Methods*, édité par Trygve Tollefsbol, 18:261-78. Translational Epigenetics. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819414-0.00013-6>.
- Kafer, Georgia Rose, Xuan Li, Takuro Horii, Isao Suetake, Shoji Tajima, Izuhito Hatada, et Peter Mark Carlton. 2016. « 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability ». *Cell Reports* 14 (6): 1283-92. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.035>.

- Kay, Graham F., Graeme D. Penny, Dipika Patel, Alan Ashworth, Neil Brockdorff, et Sohaila Rastan. 1993. « Expression of Xist during Mouse Development Suggests a Role in the Initiation of X Chromosome Inactivation ». *Cell* 72 (2): 171-82. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90658-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90658-D).
- Keppeler, Brian, et Trevor Archer. 2008. « Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets - Part 1 ». *Expert opinion on therapeutic targets* 12 (novembre): 1301-12. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.10.1301>.
- Kimura, Hiroshi, et Peter R Cook. 2001. « Kinetics of Core Histones in Living Human Cells: Little Exchange of H3 and H4 and Some Rapid Exchange of H2B ». *The Journal of Cell Biology* 153: 13.
- Kizer, Kelby, Hemali Phatnani, Yoichiro Shibata, Hana Hall, Arno Greenleaf, et Brian Strahl. 2005. « A Novel Domain in Set2 Mediates RNA Polymerase II Interaction and Couples Histone H3 K36 Methylation with Transcript Elongation ». *Molecular and cellular biology* 25 (mai): 3305-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.8.3305-3316.2005>.
- Ko, Myunggon, Jungeun An, Hozefa S. Bandukwala, Lukas Chavez, Tarmo Äijö, William A. Pastor, Matthew F. Segal, et al. 2013. « Modulation of TET2 Expression and 5-Methylcytosine Oxidation by the CXXC Domain Protein IDAX ». *Nature* 497 (7447): 122-26. <https://doi.org/10.1038/nature12052>.
- Koh, Kian Peng, Akiko Yabuuchi, Sridhar Rao, Yun Huang, Kerriane Cunniff, Julie Nardone, Asta Laiho, et al. 2011. « Tet1 and Tet2 Regulate 5-Hydroxymethylcytosine Production and Cell Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 8 (2): 200-213. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.008>.
- Kohli, Rahul M., et Yi Zhang. 2013. « TET Enzymes, TDG and the Dynamics of DNA Demethylation ». *Nature* 502 (7472): 472-79. <https://doi.org/10.1038/nature12750>.
- Komarnitsky, Philip, Eun-Jung Cho, et Stephen Buratowski. 2000. « Different Phosphorylated Forms of RNA Polymerase II and Associated MRNA Processing Factors during Transcription ». *Genes & Development* 14 (19): 2452-60. <https://doi.org/10.1101/gad.824700>.
- Kouzarides, Tony. 2007. « Chromatin Modifications and Their Function ». *Cell* 128 (4): 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
- Kowalski, Andrzej, et Jan Palyga. 2016. « Modulation of Chromatin Function through Linker Histone H1 Variants ». *Biology of the Cell* 108 (12): 339-56. <https://doi.org/10.1111/boc.201600007>.
- Kraus, W. Lee, et John T. Lis. 2003. « PARP Goes Transcription ». *Cell* 113 (6): 677-83. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00433-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00433-1).
- Kriaucionis, Skirmantas, et Nathaniel Heintz. 2009. « The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain ». *Science* 324 (5929): 929-30. <https://doi.org/10.1126/science.1169786>.
- Krishnakumar, Raga, et W. Lee Kraus. 2010. « PARP-1 Regulates Chromatin Structure and Transcription through a KDM5B-Dependent Pathway ». *Molecular Cell* 39 (5): 736-49. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.014>.
- Kurz, A., S. Lampel, J. E. Nickolenko, J. Bradl, A. Benner, R. M. Zirbel, T. Cremer, et P. Lichter. 1996. « Active and Inactive Genes Localize Preferentially in the Periphery of Chromosome Territories ». *The Journal of Cell Biology* 135 (5): 1195-1205. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.5.1195>.

- Längst, Gernot, et Laura Manelyte. 2015. « Chromatin Remodelers: From Function to Dysfunction ». *Genes* 6 (2): 299-324. <https://doi.org/10.3390/genes6020299>.
- Larson, Adam G., Daniel Elnatan, Madeline M. Keenen, Michael J. Trnka, Jonathan B. Johnston, Alma L. Burlingame, David A. Agard, Sy Redding, et Geeta J. Narlikar. 2017. « Liquid Droplet Formation by HP1 α Suggests a Role for Phase Separation in Heterochromatin ». *Nature* 547 (7662): 236-40. <https://doi.org/10.1038/nature22822>.
- Laybourn, P. J., et J. T. Kadonaga. 1991. « Role of Nucleosomal Cores and Histone H1 in Regulation of Transcription by RNA Polymerase II ». *Science (New York, N.Y.)* 254 (5029): 238-45. <https://doi.org/10.1126/science.1718039>.
- Lee, Ju Yeon, et Tae-Hee Lee. 2012. « Effects of DNA Methylation on the Structure of Nucleosomes ». *Journal of the American Chemical Society* 134 (1): 173-75. <https://doi.org/10.1021/ja210273w>.
- Leighton, PA, Jennifer Saam, R Ingram, C Stewart, et S Tilghman. 1995. « An enhancer deletion affects both H19 and IGF2 expression ». *Genes & development* 9 (octobre): 2079-89. <https://doi.org/10.1101/gad.9.17.2079>.
- Lever, Melody A, John P H Th'ng, Xuejun Sun, et Michael J Hendzel. 2000. « Rapid Exchange of Histone H1.1 on Chromatin in Living Human Cells » 408: 6.
- Li, E., C. Beard, et R. Jaenisch. 1993. « Role for DNA Methylation in Genomic Imprinting ». *Nature* 366 (6453): 362-65. <https://doi.org/10.1038/366362a0>.
- Lieberman-Aiden, Erez, Nynke L. van Berkum, Louise Williams, Maxim Imakaev, Tobias Ragoczy, Agnes Telling, Ido Amit, et al. 2009. « Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome ». *Science* 326 (5950): 289-93. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>.
- Liu, Ming, Leilei Chen, Ning-Fang Ma, Raymond Kwok Kei Chow, Yan Li, Yangyang Song, Tim Hon Man Chan, et al. 2016. « CHD1L Promotes Lineage Reversion of Hepatocellular Carcinoma through Opening Chromatin for Key Developmental Transcription Factors ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 63 (5): 1544-59. <https://doi.org/10.1002/hep.28437>.
- Liu, Xiaoli, Qinqin Gao, Pishun Li, Qian Zhao, Jiqin Zhang, Jiwen Li, Haruhiko Koseki, et Jiemin Wong. 2013. « UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9 ». *Nature communications* 4 (mars): 1563. <https://doi.org/10.1038/ncomms2562>.
- Liu, Xuesong, Hua Zou, Clive Slaughter, et Xiaodong Wang. 1997. « DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis ». *Cell* 89 (2): 175-84. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80197-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80197-X).
- Long, Hannah K., Hamish W. King, Roger K. Patient, Duncan T. Odom, et Robert J. Klose. 2016. « Protection of CpG Islands from DNA Methylation Is DNA-Encoded and Evolutionarily Conserved ». *Nucleic Acids Research* 44 (14): 6693-6706. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw258>.
- Long, Hannah K., Neil P. Blackledge, et Robert J. Klose. 2013. « ZF-CxxC Domain-Containing Proteins, CpG Islands and the Chromatin Connection ». *Biochemical Society Transactions* 41 (3): 727-40. <https://doi.org/10.1042/BST20130028>.
- Long, Mengping, Xulun Sun, Wenjin Shi, An Yanru, Sophia T. C. Leung, Dongbo Ding, Manjinder S. Cheema, et al. 2019. « A Novel Histone H4 Variant H4G

- Regulates RDNA Transcription in Breast Cancer ». *Nucleic Acids Research* 47 (16): 8399-8409. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz547>.
- Lorsbach, R. B., J. Moore, S. Mathew, S. C. Raimondi, S. T. Mukatira, et J. R. Downing. 2003. « TET1, a Member of a Novel Protein Family, Is Fused to MLL in Acute Myeloid Leukemia Containing the t(10;11)(Q22;Q23) ». *Leukemia* 17 (3): 637-41. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402834>.
- Lu, Xu, Barbara Hamkalo, Missag H. Parseghian, et Jeffrey C. Hansen. 2009. « Chromatin Condensing Functions of the Linker Histone C-terminal Domain are mediated by Specific Amino Acid Composition and Intrinsic Protein Disorder ». *Biochemistry* 48 (1): 164-72. <https://doi.org/10.1021/bi801636y>.
- Luger, Karolin. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution » 389: 12.
- Macleod, D., J. Charlton, J. Mullins, et A. P. Bird. 1994. « Sp1 Sites in the Mouse Aprt Gene Promoter Are Required to Prevent Methylation of the CpG Island ». *Genes & Development* 8 (19): 2282-92. <https://doi.org/10.1101/gad.8.19.2282>.
- Madabhushi, Ram, Fan Gao, Andreas R. Pfenning, Ling Pan, Satoko Yamakawa, Jinsoo Seo, Richard Rueda, et al. 2015. « Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes ». *Cell* 161 (7): 1592-1605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.032>.
- Maeshima, Kazuhiro, Satoru Ide, et Michael Babokhov. 2019. « Dynamic Chromatin Organization without the 30-Nm Fiber ». *Current Opinion in Cell Biology* 58: 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.02.003>.
- Maharana, Shovamayee, K. Venkatesan Iyer, Nikhil Jain, Mallika Nagarajan, Yejun Wang, et G. V. Shivashankar. 2016. « Chromosome intermingling—the physical basis of chromosome organization in differentiated cells ». *Nucleic Acids Research* 44 (11): 5148-60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw131>.
- Mahé, Elise A., Thierry Madigou, Aurélien A. Sérandour, Maud Bizot, Stéphane Avner, Frédéric Chalmel, Gaëlle Paliérne, Raphaël Métivier, et Gilles Salbert. 2017. « Cytosine modifications modulate the chromatin architecture of transcriptional enhancers ». *Genome Research* 27 (6). <https://cyberleninka.org/article/n/347255>.
- Maiti, Atanu, et Alexander C. Drohat. 2011. « Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR ACTIVE DEMETHYLATION OF CpG SITES * ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (41): 35334-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.284620>.
- Marenduzzo, Davide, Cristian Micheletti, et Peter R. Cook. 2006. « Entropy-Driven Genome Organization ». *Biophysical Journal* 90 (10): 3712-21. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.077685>.
- Marini, Monica, Andrea Falqui, et Enzo Di Fabrizio. 2016. « Direct imaging of single DNA molecules ». *SPIE Newsroom*, août. <https://doi.org/10.1117/2.1201606.006527>.
- Martello, Rita, Mario Leutert, Stephanie Jungmichel, Vera Bilan, Sara C. Larsen, Clifford Young, Michael O. Hottiger, et Michael L. Nielsen. 2016. « Proteome-Wide Identification of the Endogenous ADP-Ribosylome of Mammalian Cells and Tissue ». *Nature Communications* 7 (1): 12917. <https://doi.org/10.1038/ncomms12917>.

- Maston, Glenn A., Sara K. Evans, et Michael R. Green. 2006. « Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 7 (1): 29-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115623>.
- Mathis, Georg, et Felix R. Althaus. 1987. « Release of Core DNA from Nucleosomal Core Particles Following (ADP-Ribose)n-Modification In Vitro ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 143 (3): 1049-54. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(87\)90358-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(87)90358-5).
- Mendonca, Agnes, En Hyung Chang, Wenjie Liu, et Chongli Yuan. 2014. « Hydroxymethylation of DNA Influences Nucleosomal Conformation and Stability in Vitro ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1839 (11): 1323-29. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.09.014>.
- Michieletto, D., E. Orlandini, et D. Marenduzzo. 2016. « Polymer Model with Epigenetic Recoloring Reveals a Pathway for the *de Novo* Establishment and 3D Organization of Chromatin Domains ». *Physical Review X* 6 (4): 041047. <https://doi.org/10.1103/PhysRevX.6.041047>.
- Misteli, Tom, Akash Gunjan, Robert Hock, Michael Bustin, et David T. Brown. 2000. « Dynamic Binding of Histone H1 to Chromatin in Living Cells ». *Nature* 408 (6814): 877-81. <https://doi.org/10.1038/35048610>.
- Mohandas, T., R. S. Sparkes, et L. J. Shapiro. 1981. « Reactivation of an Inactive Human X Chromosome: Evidence for X Inactivation by DNA Methylation ». *Science (New York, N.Y.)* 211 (4480): 393-96. <https://doi.org/10.1126/science.6164095>.
- Monk, M., R. L. Adams, et A. Rinaldi. 1991. « Decrease in DNA Methylase Activity during Preimplantation Development in the Mouse ». *Development (Cambridge, England)* 112 (1): 189-92.
- Moore, Lisa D., Thuc Le, et Guoping Fan. 2013. « DNA Methylation and Its Basic Function ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38 (1): 23-38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>.
- Morgan, Hugh D., Wendy Dean, Heather A. Coker, Wolf Reik, et Svend K. Petersen-Mahrt. 2004. « Activation-Induced Cytidine Deaminase Deaminates 5-Methylcytosine in DNA and Is Expressed in Pluripotent Tissues IMPLICATIONS FOR EPIGENETIC REPROGRAMMING ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (50): 52353-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407695200>.
- Münkel, Christian, Roland Eils, Steffen Dietzel, Daniele Zink, Carsten Mehring, Gero Wedemann, Thomas Cremer, et Jörg Langowski. 1999. « Compartmentalization of Interphase Chromosomes Observed in Simulation and Experiment ». *Journal of Molecular Biology* 285 (3): 1053-65. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2361>.
- Nan, X., H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, et A. Bird. 1998. « Transcriptional Repression by the Methyl-CpG-Binding Protein MeCP2 Involves a Histone Deacetylase Complex ». *Nature* 393 (6683): 386-89. <https://doi.org/10.1038/30764>.
- Nanan, Kyster K., David M. Sturgill, Maria F. Prigge, Morgan Thenoz, Allissa A. Dillman, Mariana D. Mandler, et Shalini Oberdoerffer. 2019. « TET-Catalyzed

- 5-Carboxylcytosine Promotes CTCF Binding to Suboptimal Sequences Genome-Wide ». *IScience* 19 (septembre): 326-39. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.07.041>.
- Nanni, Luca, Stefano Ceri, et Colin Logie. 2020. « Spatial Patterns of CTCF Sites Define the Anatomy of TADs and Their Boundaries ». *Genome Biology* 21 (1): 197. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02108-x>.
- Narita, Masashi, Sabrina Nuñez, Edith Heard, Masako Narita, Athena W. Lin, Stephen A. Hearn, David L. Spector, Gregory J. Hannon, et Scott W. Lowe. 2003. « Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence ». *Cell* 113 (6): 703-16. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X).
- Naumova, Natalia, Maxim Imakaev, Geoffrey Fudenberg, Ye Zhan, Bryan R. Lajoie, Leonid A. Mirny, et Job Dekker. 2013. « Organization of the mitotic chromosome ». *Science (New York, N.Y.)* 342 (6161): 948-53. <https://doi.org/10.1126/science.1236083>.
- Neidle, Stephen. 2001. « DNA Minor-Groove Recognition by Small Molecules ». *Natural Product Reports* 18 (3): 291-309. <https://doi.org/10.1039/A705982E>.
- Neri, Francesco, Danny Incarnato, Anna Krepelova, Daniela Dettori, Stefania Rapelli, Mara Maldotti, Caterina Parlato, Francesca Anselmi, Federico Galvagni, et Salvatore Oliviero. 2015. « TET1 Is Controlled by Pluripotency-Associated Factors in ESCs and Downmodulated by PRC2 in Differentiated Cells and Tissues ». *Nucleic Acids Research* 43 (14): 6814-26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv392>.
- Neri, Francesco, Danny Incarnato, Anna Krepelova, Stefania Rapelli, Andrea Pagnani, Riccardo Zecchina, Caterina Parlato, et Salvatore Oliviero. 2013. « Genome-wide analysis identifies a functional association of Tet1 and Polycomb repressive complex 2 in mouse embryonic stem cells ». *Genome Biology* 14 (8): R91. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-8-r91>.
- Nestor, Colm E., Raffaele Ottaviano, James Reddington, Duncan Sproul, Diana Reinhardt, Donncha Dunican, Elad Katz, J. Michael Dixon, David J. Harrison, et Richard R. Meehan. 2012. « Tissue Type Is a Major Modifier of the 5-Hydroxymethylcytosine Content of Human Genes ». *Genome Research* 22 (3): 467-77. <https://doi.org/10.1101/gr.126417.111>.
- Netchine, Irène, Sylvie Rossignol, Marie-Noëlle Dufourg, Salah Azzi, Alexandra Rousseau, Laurence Perin, Muriel Houang, et al. 2007. « 11p15 Imprinting Center Region 1 Loss of Methylation Is a Common and Specific Cause of Typical Russell-Silver Syndrome: Clinical Scoring System and Epigenetic-Phenotypic Correlations ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (8): 3148-54. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0354>.
- Ng, H. H., Y. Zhang, B. Hendrich, C. A. Johnson, B. M. Turner, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D. Reinberg, et A. Bird. 1999. « MBD2 Is a Transcriptional Repressor Belonging to the MeCP1 Histone Deacetylase Complex ». *Nature Genetics* 23 (1): 58-61. <https://doi.org/10.1038/12659>.
- Ngo, Thuy T. M., Jejoong Yoo, Qing Dai, Qiucen Zhang, Chuan He, Aleksei Aksimentiev, et Taekjip Ha. 2016. « Effects of Cytosine Modifications on DNA Flexibility and Nucleosome Mechanical Stability ». *Nature Communications* 7 (février): 10813. <https://doi.org/10.1038/ncomms10813>.

- Ngo, Thuy T. M., Qiucen Zhang, Ruobo Zhou, Jaya G. Yodh, et Taekjip Ha. 2015. « Asymmetric Unwrapping of Nucleosomes under Tension Directed by DNA Local Flexibility ». *Cell* 160 (6): 1135-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.001>.
- Nicodemi, Mario, et Antonella Prisco. 2009. « Thermodynamic Pathways to Genome Spatial Organization in the Cell Nucleus ». *Biophysical Journal* 96 (6): 2168-77. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3919>.
- Nishino, Yoshinori, Mikhail Eltsov, Yasumasa Joti, Kazuki Ito, Hideaki Takata, Yukio Takahashi, Saera Hihara, et al. 2012. « Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure ». *The EMBO Journal* 31 (7): 1644-53. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.35>.
- Nordin, M., D. Bergman, M. Halje, W. Engström, et A. Ward. 2014. « Epigenetic Regulation of the Igf2/H19 Gene Cluster ». *Cell Proliferation* 47 (3): 189-99. <https://doi.org/10.1111/cpr.12106>.
- North, Justin A., Sarah Javaid, Michelle B. Ferdinand, Nilanjana Chatterjee, Jonathan W. Picking, Matthew Shoffner, Robin J. Nakkula, et al. 2011. « Phosphorylation of histone H3(T118) alters nucleosome dynamics and remodeling ». *Nucleic Acids Research* 39 (15): 6465-74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr304>.
- Norton, V. G., B. S. Imai, P. Yau, et E. M. Bradbury. 1989. « Histone Acetylation Reduces Nucleosome Core Particle Linking Number Change ». *Cell* 57 (3): 449-57. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90920-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90920-3).
- Nott, Timothy J., Evangelia Petsalaki, Patrick Farber, Dylan Jervis, Eden Fussner, Anne Plochowitz, Timothy D. Craggs, et al. 2015. « Phase Transition of a Disordered Nuage Protein Generates Environmentally Responsive Membraneless Organelles ». *Molecular Cell* 57 (5): 936-47. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.013>.
- Obradovic, Zoran, Kang Peng, Slobodan Vucetic, Predrag Radivojac, Celeste J. Brown, et A. Keith Dunker. 2003. « Predicting Intrinsic Disorder from Amino Acid Sequence ». *Proteins* 53 Suppl 6: 566-72. <https://doi.org/10.1002/prot.10532>.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber, et E. Li. 1999. « DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for de Novo Methylation and Mammalian Development ». *Cell* 99 (3): 247-57. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81656-6).
- Okano, Masaki, Shaoping Xie, et En Li. 1998. « Cloning and Characterization of a Family of Novel Mammalian DNA (Cytosine-5) Methyltransferases ». *Nature Genetics* 19 (3): 219-20. <https://doi.org/10.1038/890>.
- Ooi, Steen K. T., Chen Qiu, Emily Bernstein, Keqin Li, Da Jia, Zhe Yang, Hediye Erdjument-Bromage, et al. 2007. « DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA ». *Nature* 448 (7154): 714-17. <https://doi.org/10.1038/nature05987>.
- Osakabe, Akihisa, Fumiya Adachi, Yasuhiro Arimura, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, et Hitoshi Kurumizaka. 2015. « Influence of DNA methylation on positioning and DNA flexibility of nucleosomes with pericentric satellite DNA ». *Open Biology* 5 (10). <https://doi.org/10.1098/rsob.150128>.

- Osborne, Cameron S., Lyubomira Chakalova, Karen E. Brown, David Carter, Alice Horton, Emmanuel Debrand, Beatriz Goyenechea, et al. 2004. « Active Genes Dynamically Colocalize to Shared Sites of Ongoing Transcription ». *Nature Genetics* 36 (10): 1065-71. <https://doi.org/10.1038/ng1423>.
- Ou, Horng D., Sébastien Phan, Thomas J. Deerinck, Andrea Thor, Mark H. Ellisman, et Clodagh C. O'Shea. 2017. « ChromEMT: Visualizing 3D Chromatin Structure and Compaction in Interphase and Mitotic Cells ». *Science (New York, N. Y.)* 357 (6349). <https://doi.org/10.1126/science.aag0025>.
- Palazzo, Luca, Orsolya Leidecker, Evgeniia Prokhorova, Helen Dauben, Ivan Matic, et Ivan Ahel. 2018. « Serine Is the Major Residue for ADP-Ribosylation upon DNA Damage ». *ELife* 7 (février): e34334. <https://doi.org/10.7554/eLife.34334>.
- Pastor, William A., Utz J. Pape, Yun Huang, Hope R. Henderson, Ryan Lister, Myunggon Ko, Erin M. McLoughlin, et al. 2011. « Genome-Wide Mapping of 5-Hydroxymethylcytosine in Embryonic Stem Cells ». *Nature* 473 (7347): 394-97. <https://doi.org/10.1038/nature10102>.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, et W. M. Bonner. 2000. « A Critical Role for Histone H2AX in Recruitment of Repair Factors to Nuclear Foci after DNA Damage ». *Current Biology: CB* 10 (15): 886-95. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00610-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00610-2).
- Paulson, James, et U.K. Laemmli. 1977. « Paulson, J.R. & Laemmli, U.K. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817-828 ». *Cell* 12 (décembre): 817-28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90280-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90280-X).
- Pennings, S., G. Meersseman, et E. M. Bradbury. 1994. « Linker Histones H1 and H5 Prevent the Mobility of Positioned Nucleosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (22): 10275-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10275>.
- Pérez, Alberto, Chiara Lara Castellazzi, Federica Battistini, Kathryn Collinet, Oscar Flores, Ozgen Deniz, Maria Luz Ruiz, et al. 2012. « Impact of Methylation on the Physical Properties of DNA ». *Biophysical Journal* 102 (9): 2140-48. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.056>.
- Peric-Hupkes, Daan, Wouter Meuleman, Ludo Pagie, Sophia W.M. Bruggeman, Irina Solovei, Wim Brugman, Stefan Gräf, et al. 2010. « Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation ». *Molecular Cell* 38 (4): 603-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.016>.
- Phillips, Jennifer E., et Victor G. Corces. 2009. « CTCF: Master Weaver of the Genome ». *Cell* 137 (7): 1194-1211. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.001>.
- Pidugu, Lakshmi S., Joshua W. Flowers, Christopher T. Coey, Edwin Pozharski, Marc M. Greenberg, et Alexander C. Drohat. 2016. « Structural Basis for Excision of 5-Formylcytosine by Thymine DNA Glycosylase ». *Biochemistry* 55 (45): 6205-8. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00982>.
- Plank, Jennifer L., et Ann Dean. 2014. « Enhancer Function: Mechanistic and Genome-Wide Insights Come Together ». *Molecular Cell* 55 (1): 5-14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.015>.
- Poirier, G. G., G. de Murcia, J. Jongstra-Bilen, C. Niedergang, et P. Mandel. 1982. « Poly(ADP-Ribosyl)ation of Polynucleosomes Causes Relaxation of Chromatin Structure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (11): 3423-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3423>.

- Prokhortchouk, A. 2001. « The P120 Catenin Partner Kaiso Is a DNA Methylation-Dependent Transcriptional Repressor ». *Genes & Development* 15 (13): 1613-18. <https://doi.org/10.1101/gad.198501>.
- Puc, Janusz, Aneel K. Aggarwal, et Michael G. Rosenfeld. 2017. « Physiological Functions of Programmed DNA Breaks in Signal-Induced Transcription ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (8): 471-76. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.43>.
- Puc, Janusz, Piotr Kozbial, Wenbo Li, Yuliang Tan, Zhijie Liu, Tom Suter, Kenneth A. Ohgi, Jie Zhang, Aneel K. Aggarwal, et Michael G. Rosenfeld. 2015. « Ligand-Dependent Enhancer Activation Regulated by Topoisomerase-I Activity ». *Cell* 160 (3): 367-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.023>.
- Pugacheva, Elena M., Naoki Kubo, Dmitri Loukinov, Md Tajmul, Sungyun Kang, Alexander L. Kovalchuk, Alexander V. Strunnikov, Gabriel E. Zentner, Bing Ren, et Victor V. Lobanenkov. 2020. « CTCF Mediates Chromatin Looping via N-Terminal Domain-Dependent Cohesin Retention ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (4): 2020-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911708117>.
- Rada-Iglesias, Alvaro, Ruchi Bajpai, Tomek Swigut, Samantha A. Brugmann, Ryan A. Flynn, et Joanna Wysocka. 2011. « A Unique Chromatin Signature Uncovers Early Developmental Enhancers in Humans ». *Nature* 470 (7333): 279-83. <https://doi.org/10.1038/nature09692>.
- Raiber, Eun-Ang, Guillem Portella, Sergio Martínez Cuesta, Robyn Hardisty, Pierre Murat, Zhe Li, Mario Iurlaro, et al. 2018. « 5-Formylcytosine Organizes Nucleosomes and Forms Schiff Base Interactions with Histones in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nature Chemistry* 10 (12): 1258-66. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0149-x>.
- Ramirez-Carrozzi, Vladimir R., Daniel Braas, Dev M. Bhatt, Christine S. Cheng, Christine Hong, Kevin R. Doty, Joshua C. Black, Alexander Hoffmann, Michael Carey, et Stephen T. Smale. 2009. « A Unifying Model for the Selective Regulation of Inducible Transcription by CpG Islands and Nucleosome Remodeling ». *Cell* 138 (1): 114-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.020>.
- Rangasamy, Danny. 2013. « Distinctive Patterns of Epigenetic Marks Are Associated with Promoter Regions of Mouse LINE-1 and LTR Retrotransposons ». *Mobile DNA* 4 (1): 27. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-4-27>.
- Rao, Suhas S. P., Su-Chen Huang, Brian Glenn St Hilair, Jesse M. Engreitz, Elizabeth M. Perez, Kyong-Rim Kieffer-Kwon, Adrian L. Sanborn, et al. 2017. « Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains, Leading to Links among Superenhancers and Downregulation of Nearby Genes ». *BioRxiv*, mai, 139782. <https://doi.org/10.1101/139782>.
- Rea, Stephen, Frank Eisenhaber, Dónal O'Carroll, Brian D. Strahl, Zu-Wen Sun, Manfred Schmid, Susanne Opravil, et al. 2000. « Regulation of Chromatin Structure by Site-Specific Histone H3 Methyltransferases ». *Nature* 406 (6796): 593-99. <https://doi.org/10.1038/35020506>.
- Ricci, Maria Aurelia, Carlo Manzo, María Filomena García-Parajo, Melike Lakadamyali, et Maria Pia Cosma. 2015. « Chromatin Fibers Are Formed by Heterogeneous Groups of Nucleosomes in Vivo ». *Cell* 160 (6): 1145-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.054>.

- Rieder, Conly L., et Alexey Khodjakov. 2003. « Mitosis Through the Microscope: Advances in Seeing Inside Live Dividing Cells ». *Science* 300 (5616): 91-96. <https://doi.org/10.1126/science.1082177>.
- Robaszekiewicz, Agnieszka, Ewelina Wiśnik, Zsolt Regdon, Kinga Chmielewska, et László Virág. 2018. « PARP1 Facilitates EP300 Recruitment to the Promoters of the Subset of RBL2-Dependent Genes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1861 (1): 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.12.001>.
- Robertson, K. D., S. Ait-Si-Ali, T. Yokochi, P. A. Wade, P. L. Jones, et A. P. Wolffe. 2000. « DNMT1 Forms a Complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and Represses Transcription from E2F-Responsive Promoters ». *Nature Genetics* 25 (3): 338-42. <https://doi.org/10.1038/77124>.
- Robinson, Philip J. J., Woojin An, Andrew Routh, Fabrizio Martino, Lynda Chapman, Robert G. Roeder, et Daniela Rhodes. 2008. « 30 Nm Chromatin Fibre Decompaction Requires Both H4-K16 Acetylation and Linker Histone Eviction ». *Journal of Molecular Biology* 381 (4): 816-25. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.050>.
- Robinson, Philip J. J., Louise Fairall, Van A. T. Huynh, et Daniela Rhodes. 2006. « EM Measurements Define the Dimensions of the “30-Nm” Chromatin Fiber: Evidence for a Compact, Interdigitated Structure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (17): 6506-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601212103>.
- Robinson, Philip JJ, et Daniela Rhodes. 2006. « Structure of the ‘30nm’ Chromatin Fibre: A Key Role for the Linker Histone ». *Current Opinion in Structural Biology, Nucleic acids/Sequences and topology*, 16 (3): 336-43. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.05.007>.
- Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon, et W. M. Bonner. 1999. « Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo ». *The Journal of Cell Biology* 146 (5): 905-16. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.905>.
- Rogakou, Emmy P., Duane R. Pilch, Ann H. Orr, Vessela S. Ivanova, et William M. Bonner. 1998. « DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139 * ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858-68. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.
- Romero, Pedro, Zoran Obradovic, Xiaohong Li, Ethan C. Garner, Celeste J. Brown, et A. Keith Dunker. 2001. « Sequence Complexity of Disordered Protein ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 42 (1): 38-48. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1<38::AID-PROT50>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1<38::AID-PROT50>3.0.CO;2-3).
- Rougier, Nathalie, Déborah Bourc’his, Denise Molina Gomes, Alain Niveleau, Michelle Plachot, András Páldi, et Evani Viegas-Péquignot. 1998. « Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development ». *Genes & Development* 12 (14): 2108-13.
- Rountree, Michael R., Kurtis E. Bachman, et Stephen B. Baylin. 2000. « DNMT1 Binds HDAC2 and a New Co-Repressor, DMAP1, to Form a Complex at Replication Foci ». *Nature Genetics* 25 (3): 269-77. <https://doi.org/10.1038/77023>.
- Sanborn, Adrian L., Suhas S. P. Rao, Su-Chen Huang, Neva C. Durand, Miriam H. Huntley, Andrew I. Jewett, Ivan D. Bochkov, et al. 2015. « Chromatin

- Extrusion Explains Key Features of Loop and Domain Formation in Wild-Type and Engineered Genomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (47): E6456-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518552112>.
- Sasaki, H., P. A. Jones, J. R. Chaillet, A. C. Ferguson-Smith, S. C. Barton, W. Reik, et M. A. Surani. 1992. « Parental Imprinting: Potentially Active Chromatin of the Repressed Maternal Allele of the Mouse Insulin-like Growth Factor II (Igf2) Gene ». *Genes & Development* 6 (10): 1843-56. <https://doi.org/10.1101/gad.6.10.1843>.
- Sauer, Paul Victor, Jennifer Timm, Danni Liu, David Sitbon, Elisabetta Boeri-Erba, Christophe Velours, Norbert Mücke, et al. 2017. « Insights into the Molecular Architecture and Histone H3-H4 Deposition Mechanism of Yeast Chromatin Assembly Factor 1 ». *ELife* 6 (mars). <https://doi.org/10.7554/eLife.23474>.
- Saxonov, Serge, Paul Berg, et Douglas L. Brutlag. 2006. « A Genome-Wide Analysis of CpG Dinucleotides in the Human Genome Distinguishes Two Distinct Classes of Promoters ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (5): 1412-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>.
- Schalch, Thomas, Sylwia Duda, David F. Sargent, et Timothy J. Richmond. 2005. « X-Ray Structure of a Tetranucleosome and Its Implications for the Chromatin Fibre ». *Nature* 436 (7047): 138-41. <https://doi.org/10.1038/nature03686>.
- Schermelleh, Lothar, Andrea Haemmer, Fabio Spada, Nicole Rösing, Daniela Meilinger, Ulrich Rothbauer, M. Cristina Cardoso, et Heinrich Leonhardt. 2007. « Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation ». *Nucleic Acids Research* 35 (13): 4301-12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm432>.
- Sellou, Hafida, Théo Lebeaupin, Catherine Chapuis, Rebecca Smith, Anna Hegele, Hari R. Singh, Marek Kozlowski, et al. 2016. « The poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeler Alc1 induces local chromatin relaxation upon DNA damage ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (24): 3791-99. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0269>.
- Seol, Yeonee, et Keir C. Neuman. 2016. « The dynamic interplay between DNA topoisomerases and DNA topology ». *Biophysical Reviews* 8 (Suppl 1): 101-11. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0240-8>.
- Sérandour, Aurélien A., Stéphane Avner, Frédéric Oger, Maud Bizot, Frédéric Percevault, Céline Lucchetti-Miganeh, Gaëlle Palierne, et al. 2012. « Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers ». *Nucleic Acids Research* 40 (17): 8255-65. <https://doi.org/10.1093/nar/gks595>.
- Shakya, Anisha, Seonyoung Park, Neha Rana, et John T. King. 2020. « Liquid-Liquid Phase Separation of Histone Proteins in Cells: Role in Chromatin Organization ». *Biophysical Journal* 118 (3): 753-64. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.12.022>.
- Sharif, Jafar, Takaho A. Endo, Tetsuro Toyoda, et Haruhiko Koseki. 2010. « Divergence of CpG Island Promoters: A Consequence or Cause of Evolution? » *Development, Growth & Differentiation* 52 (6): 545-54. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2010.01193.x>.

- Sharma, Rahul, et Peter Meister. 2015. « Linking dosage compensation and X chromosome nuclear organization in *C. elegans* ». *Nucleus* 6 (4): 266-72. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1059546>.
- Shen, Li, Hao Wu, Dinh Diep, Shinpei Yamaguchi, Ana C. D'Alessio, Ho-Lim Fung, Kun Zhang, et Yi Zhang. 2013. « Genome-Wide Analysis Reveals TET- and TDG-Dependent 5-Methylcytosine Oxidation Dynamics ». *Cell* 153 (3): 692-706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.002>.
- Shi, Dong-Qiao, Iftikhar Ali, Jun Tang, et Wei-Cai Yang. 2017. « New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function ». *Frontiers in Genetics* 8: 100. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00100>.
- Shieh, W. Melissa, Jean-Christophe Amé, Mandala V. Wilson, Zhao-Qi Wang, David W. Koh, Myron K. Jacobson, et Elaine L. Jacobson. 1998. « Poly(ADP-Ribose) Polymerase Null Mouse Cells Synthesize ADP-Ribose Polymers ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (46): 30069-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30069>.
- Shimada, Miho, Wei-Yi Chen, Tomoyoshi Nakadai, Takashi Onikubo, Mohamed Guermah, Daniela Rhodes, et Robert G. Roeder. 2019. « Gene-Specific H1 Eviction through a Transcriptional Activator→p300→NAP1→H1 Pathway ». *Molecular Cell* 74 (2): 268-283.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.016>.
- Smith, Rebecca, Hafida Sellou, Catherine Chapuis, Sébastien Huet, et Gyula Timinszky. 2018. « CHD3 and CHD4 Recruitment and Chromatin Remodeling Activity at DNA Breaks Is Promoted by Early Poly(ADP-Ribose)-Dependent Chromatin Relaxation ». *Nucleic Acids Research* 46 (12): 6087-98. <https://doi.org/10.1093/nar/gky334>.
- Song, Jikui, Olga Rechkoblit, Timothy H. Bestor, et Dinshaw J. Patel. 2011. « Structure of DNMT1-DNA Complex Reveals a Role for Autoinhibition in Maintenance DNA Methylation ». *Science (New York, N.Y.)* 331 (6020): 1036-40. <https://doi.org/10.1126/science.1195380>.
- Spruijt, Cornelia G., Felix Gnerlich, Arne H. Smits, Toni Pfaffeneder, Pascal W. T. C. Jansen, Christina Bauer, Martin Münzel, et al. 2013. « Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives ». *Cell* 152 (5): 1146-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.004>.
- Stedman, Edgar, et Ellen Stedman. 1950. « Cell Specificity of Histones ». *Nature* 166 (4227): 780-81. <https://doi.org/10.1038/166780a0>.
- Steger, David J., Martina I. Lefterova, Lei Ying, Aaron J. Stonestrom, Michael Schupp, David Zhuo, Adam L. Vakoc, et al. 2008. « DOT1L/KMT4 Recruitment and H3K79 Methylation Are Ubiquitously Coupled with Gene Transcription in Mammalian Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (8): 2825-39. <https://doi.org/10.1128/MCB.02076-07>.
- Strahl, B. D., et C. D. Allis. 2000. « The Language of Covalent Histone Modifications ». *Nature* 403 (6765): 41-45. <https://doi.org/10.1038/47412>.
- Strickfaden, Hilmar, Andreas Zunhammer, Silvana van Koningsbruggen, Daniela Koehler, et Thomas Cremer. 2010. « 4D Chromatin dynamics in cycling cells: Theodor Boveri's hypotheses revisited ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 1 (mai): 284-97. <https://doi.org/10.4161/nucl.1.3.11969>.
- Strom, Amy R., Alexander V. Emelyanov, Mustafa Mir, Dmitry V. Fyodorov, Xavier Darzacq, et Gary H. Karpen. 2017. « Phase Separation Drives

- Heterochromatin Domain Formation ». *Nature* 547 (7662): 241-45. <https://doi.org/10.1038/nature22989>.
- Stroud, Hume, Suhua Feng, Shannon Morey Kinney, Sriharsa Pradhan, et Steven E Jacobsen. 2011. « 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells ». *Genome Biology* 12 (6): R54. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r54>.
- Su, Po-Hsuan, Yaw-Wen Hsu, Rui-Lan Huang, Lin-Yu Chen, Tai-Kuang Chao, Chi-Chun Liao, Chien-Wen Chen, et al. 2019. « TET1 Promotes 5hmC-Dependent Stemness, and Inhibits a 5hmC-Independent Epithelial-Mesenchymal Transition, in Cervical Precancerous Lesions ». *Cancer Letters* 450 (mai): 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.033>.
- Syed, S. H., D. Goutte-Gattat, N. Becker, S. Meyer, M. S. Shukla, J. J. Hayes, R. Everaers, D. Angelov, J. Bednar, et S. Dimitrov. 2010. « Single-Base Resolution Mapping of H1-Nucleosome Interactions and 3D Organization of the Nucleosome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (21): 9620-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000309107>.
- Tahiliani, M., K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, et al. 2009. « Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1 ». *Science* 324 (5929): 930-35. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>.
- Tazi, Jamal, et Adrian Bird. 1990. « Alternative Chromatin Structure at CpG Islands ». *Cell* 60 (6): 909-20. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90339-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90339-G).
- Thoma, F, T Koller, et A Klug. 1979. « Involvement of Histone H1 in the Organization of the Nucleosome and of the Salt-Dependent Superstructures of Chromatin. » *Journal of Cell Biology* 83 (2): 403-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.83.2.403>.
- Thomson, John P., Peter J. Skene, Jim Selfridge, Thomas Clouaire, Jacky Guy, Shaun Webb, Alastair R. W. Kerr, et al. 2010. « CpG Islands Influence Chromatin Structure via the CpG-Binding Protein Cfp1 ». *Nature* 464 (7291): 1082-86. <https://doi.org/10.1038/nature08924>.
- Toyota, Minoru, Nita Ahuja, Hiromu Suzuki, Fumio Itoh, Mutsumi Ohe-Toyota, Kohzoh Imai, Stephen B. Baylin, et Jean-Pierre J. Issa. 1999. « Aberrant Methylation in Gastric Cancer Associated with the CpG Island Methylator Phenotype ». *Cancer Research* 59 (21): 5438-42.
- Trojer, Patrick, et Danny Reinberg. 2007. « Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? » *Molecular Cell* 28 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.011>.
- Trotter, Kevin W., Heather A. King, et Trevor K. Archer. 2015. « Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activation via the BRG1-Dependent Recruitment of TOP2 β and Ku70/86 ». *Molecular and Cellular Biology* 35 (16): 2799-2817. <https://doi.org/10.1128/MCB.00230-15>.
- Turner, Abigail L., Matthew Watson, Oscar G. Wilkins, Laura Cato, Andrew Travers, Jean O. Thomas, et Katherine Stott. 2018. « Highly Disordered Histone H1-DNA Model Complexes and Their Condensates ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (47): 11964-69. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805943115>.
- Valinluck, Victoria, et Lawrence C. Sowers. 2007. « Endogenous Cytosine Damage Products Alter the Site Selectivity of Human DNA Maintenance

- Methyltransferase DNMT1 ». *Cancer Research* 67 (3): 946-50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3123>.
- Vella, Pietro, Andrea Scelfo, Sriganesh Jammula, Fulvio Chiacchiera, Kristine Williams, Alessandro Cuomo, Alessandra Roberto, et al. 2013. « Tet Proteins Connect the O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase Ogt to Chromatin in Embryonic Stem Cells ». *Molecular Cell* 49 (4): 645-56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.019>.
- Vernimmen, Douglas, et Wendy A. Bickmore. 2015. « The Hierarchy of Transcriptional Activation: From Enhancer to Promoter ». *Trends in Genetics: TIG* 31 (12): 696-708. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.004>.
- Visser, A. E., F. Jaunin, S. Fakan, et J. A. Aten. 2000. « High Resolution Analysis of Interphase Chromosome Domains ». *Journal of Cell Science* 113 (14): 2585-93.
- Wachsmuth, Malte, Christian Conrad, Jutta Bulkescher, Birgit Koch, Robert Mahen, Mayumi Isokane, Rainer Pepperkok, et Jan Ellenberg. 2015. « High-Throughput Fluorescence Correlation Spectroscopy Enables Analysis of Proteome Dynamics in Living Cells ». *Nature Biotechnology* 33 (4): 384-89. <https://doi.org/10.1038/nbt.3146>.
- Walsh, Colum P., et Timothy H. Bestor. 1999. « Cytosine methylation and mammalian development ». *Genes & Development* 13 (1): 26-34.
- Walter, Joachim, Lothar Schermelleh, Marion Cremer, Satoshi Tashiro, et Thomas Cremer. 2003. « Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages ». *The Journal of cell biology* 160 (avril): 685-97. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211103>.
- Wang, A. H., G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel, et A. Rich. 1979. « Molecular Structure of a Left-Handed Double Helical DNA Fragment at Atomic Resolution ». *Nature* 282 (5740): 680-86. <https://doi.org/10.1038/282680a0>.
- Wang, James C. 2002. « Cellular Roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (6): 430-40. <https://doi.org/10.1038/nrm831>.
- Wang, Lanfeng, Yu Zhou, Liang Xu, Rui Xiao, Xingyu Lu, Liang Chen, Jenny Chong, et al. 2015. « Molecular Basis for 5-Carboxycytosine Recognition by RNA Polymerase II Elongation Complex ». *Nature* 523 (7562): 621-25. <https://doi.org/10.1038/nature14482>.
- Wang, Zheng, Gangming Zhang, et Hong Zhang. 2018. « Protocol for analyzing protein liquid–liquid phase separation ». *Biophysics Reports* 5 (décembre). <https://doi.org/10.1007/s41048-018-0078-7>.
- Wanunu, Meni, Devora Cohen-Karni, Robert R. Johnson, Lauren Fields, Jack Benner, Neil Peterman, Yu Zheng, Michael L. Klein, et Marija Drndic. 2011. « Discrimination of Methylcytosine from Hydroxymethylcytosine in DNA Molecules ». *Journal of the American Chemical Society* 133 (3): 486-92. <https://doi.org/10.1021/ja107836t>.
- Watrin, Erwan, et Jan-Michael Peters. 2009. « The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells ». *The EMBO Journal* 28 (17): 2625-35. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.202>.

- Watson, J. D., et F. H. Crick. 1953. « Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid ». *Nature* 171 (4356): 737-38. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- Watt, F., et P. L. Molloy. 1988. « Cytosine Methylation Prevents Binding to DNA of a HeLa Cell Transcription Factor Required for Optimal Expression of the Adenovirus Major Late Promoter. » *Genes & Development* 2 (9): 1136-43. <https://doi.org/10.1101/gad.2.9.1136>.
- Weber, Alain R., Claudia Krawczyk, Adam B. Robertson, Anna Kuśnierczyk, Cathrine B. Vågbø, David Schuermann, Arne Klungland, et Primo Schär. 2016. « Biochemical Reconstitution of TET1–TDG–BER-Dependent Active DNA Demethylation Reveals a Highly Coordinated Mechanism ». *Nature Communications* 7 (1): 10806. <https://doi.org/10.1038/ncomms10806>.
- Wei, Huiting, et Xiaochun Yu. 2016. « Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways ». *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, SI: Genome Stability, 14 (3): 131-39. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.001>.
- Wijesinghe, Priyanga, et Ashok S. Bhagwat. 2012. « Efficient deamination of 5-methylcytosines in DNA by human APOBEC3A, but not by AID or APOBEC3G ». *Nucleic Acids Research* 40 (18): 9206-17. <https://doi.org/10.1093/nar/gks685>.
- Willcockson, Michael A., Sean E. Heaton, Cary N. Weiss, Boris A. Bartholdy, Yair Botbol, Laxmi N. Mishra, Dhruv S. Sidhwani, et al. 2021. « H1 Histones Control the Epigenetic Landscape by Local Chromatin Compaction ». *Nature* 589 (7841): 293-98. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3032-z>.
- Williams, Kristine, Jesper Christensen, Marianne Terndrup Pedersen, Jens V. Johansen, Paul A. C. Cloos, Juri Rappsilber, et Kristian Helin. 2011. « TET1 and Hydroxymethylcytosine in Transcription and DNA Methylation Fidelity ». *Nature* 473 (7347): 343-48. <https://doi.org/10.1038/nature10066>.
- Wing, Richard, Horace Drew, Tsunehiro Takano, Chris Broka, Shoji Tanaka, Keiichi Itakura, et Richard E. Dickerson. 1980. « Crystal Structure Analysis of a Complete Turn of B-DNA ». *Nature* 287 (5784): 755-58. <https://doi.org/10.1038/287755a0>.
- Wolffe, Alan P., et Jeffrey J. Hayes. 1999. « Chromatin disruption and modification ». *Nucleic Acids Research* 27 (3): 711-20. <https://doi.org/10.1093/nar/27.3.711>.
- wu, Chenyi, Andrew Bassett, et Andrew Travers. 2008. « A variable topology for the 30-nm chromatin fibre ». *EMBO reports* 8 (janvier): 1129-34. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401115>.
- Wu, Hao, Ana C. D'Alessio, Shinsuke Ito, Kai Xia, Zhibin Wang, Kairong Cui, Keji Zhao, Yi Eve Sun, et Yi Zhang. 2011. « Dual Functions of Tet1 in Transcriptional Regulation in Mouse Embryonic Stem Cells ». *Nature* 473 (7347): 389-93. <https://doi.org/10.1038/nature09934>.
- Wu, Liang, Ye Shen, Xianzhen Peng, Simin Zhang, Ming Wang, Guisheng Xu, Xianzhi Zheng, Jianming Wang, et Cheng Lu. 2016. « Aberrant promoter methylation of cancer-related genes in human breast cancer ». *Oncology Letters* 12 (6): 5145-55. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5351>.
- Wyatt, G. R., et S. S. Cohen. 1953. « The Bases of the Nucleic Acids of Some Bacterial and Animal Viruses: The Occurrence of 5-Hydroxymethylcytosine ». *The Biochemical Journal* 55 (5): 774-82. <https://doi.org/10.1042/bj0550774>.

- Yamanaka, H., C. A. Penning, E. H. Willis, D. B. Wasson, et D. A. Carson. 1989. « Characterization of Poly(ADP-Ribose) Polymerase with Human Autoantibodies ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 253B: 259-65. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5676-9_38.
- Yang, Yeqing A., Jonathan C. Zhao, Ka-wing Fong, Jung Kim, Shangze Li, Chunxiao Song, Bing Song, Bin Zheng, Chuan He, et Jindan Yu. 2016. « FOXA1 potentiates lineage-specific enhancer activation through modulating TET1 expression and function ». *Nucleic Acids Research* 44 (17): 8153-64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw498>.
- Yen, P H, P Patel, A C Chinault, T Mohandas, et L J Shapiro. 1984. « Differential methylation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase genes on active and inactive human X chromosomes. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (6): 1759-63.
- Yoon, Ho-Geun, Doug W. Chan, Albert B. Reynolds, Jun Qin, et Jiemin Wong. 2003. « N-CoR Mediates DNA Methylation-Dependent Repression through a Methyl CpG Binding Protein Kaiso ». *Molecular Cell* 12 (3): 723-34. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.008>.
- Yosefzon, Yahav, Cfir David, Anna Tsukerman, Lilach Pnueli, Sen Qiao, Ulrich Boehm, et Philippa Melamed. 2017. « An Epigenetic Switch Repressing Tet1 in Gonadotropes Activates the Reproductive Axis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (38): 10131-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704393114>.
- Yu, Miao, Gary C. Hon, Keith E. Szulwach, Chun-Xiao Song, Liang Zhang, Audrey Kim, Xuekun Li, et al. 2012. « Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine in the Mammalian Genome ». *Cell* 149 (6): 1368-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.027>.
- Yusufaly, Tahir I., Yun Li, Gautam Singh, et Wilma K. Olson. 2014. « Arginine-phosphate salt bridges between histones and DNA: Intermolecular actuators that control nucleosome architecture ». *The Journal of Chemical Physics* 141 (16): 165102. <https://doi.org/10.1063/1.4897978>.
- Zampieri, Michele, Tiziana Guastafierro, Roberta Calabrese, Fabio Ciccarone, Maria G. Bacalini, Anna Reale, Mariagrazia Perilli, Claudio Passananti, et Paola Caiafa. 2012. « ADP-ribose polymers localized on Ctcf–Parp1–Dnmt1 complex prevent methylation of Ctcf target sites ». *Biochemical Journal* 441 (Pt 2): 645-52. <https://doi.org/10.1042/BJ20111417>.
- Zhang, Ruihan, Jochen Erler, et Jörg Langowski. 2017. « Histone Acetylation Regulates Chromatin Accessibility: Role of H4K16 in Inter-Nucleosome Interaction ». *Biophysical Journal* 112 (3): 450-59. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.015>.
- Zhang, Wenhao, Weikun Xia, Qiujun Wang, Aaron J Towers, Jiayu Chen, Rui Gao, Yu Zhang, et al. 2016. « Isoform Switch of TET1 Regulates DNA Demethylation and Mouse Development ». *Molecular Cell* 64 (6): 1062-73. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.030>.
- Zhong, Jianing, Xianfeng Li, Wanshi Cai, Yan Wang, Shanshan Dong, Jie Yang, Jian'an Zhang, et al. 2017. « TET1 modulates H4K16 acetylation by controlling auto-acetylation of hMOF to affect gene regulation and DNA repair function ». *Nucleic Acids Research* 45 (2): 672-84. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw919>.

- Zhou, Weiqiang, et Hong Yan. 2010. « Relationship between Periodic Dinucleotides and the Nucleosome Structure Revealed by Alpha Shape Modeling ». *Chemical Physics Letters* 489 (4): 225-28. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.02.074>.
- Zhu, Bing, Yong Zheng, Daniel Hess, Herbert Angliker, Steffen Schwarz, Michel Siegmann, Stéphane Thiry, et Jean-Pierre Jost. 2000. « 5-Methylcytosine-DNA Glycosylase Activity Is Present in a Cloned G/T Mismatch DNA Glycosylase Associated with the Chicken Embryo DNA Demethylation Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (10): 5135-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.100107597>.
- Zhu, Fugui, Qianshu Zhu, Dan Ye, Qingquan Zhang, Yiwei Yang, Xudong Guo, Zhenping Liu, et al. 2018. « Sin3a–Tet1 interaction activates gene transcription and is required for embryonic stem cell pluripotency ». *Nucleic Acids Research* 46 (12): 6026-40. <https://doi.org/10.1093/nar/gky347>.
- Zippo, Alessio, Riccardo Serafini, Marina Rocchigiani, Susanna Pennacchini, Anna Krepelova, et Salvatore Oliviero. 2009. « Histone Crosstalk between H3S10ph and H4K16ac Generates a Histone Code That Mediates Transcription Elongation ». *Cell* 138 (6): 1122-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.031>.

Titre : Caractérisation du rôle de la protéine Ten-eleven translocation 1 (TET1) dans la dynamique de l'organisation de la chromatine

Mots clés : Chromatine, Transcription, Epigénétique, Microscopie.

Résumé : La chromatine, composée d'ADN et de protéines histones, possède une structure multi-échelle complexe et dynamique participant notamment à la régulation de la transcription. Son état de compaction peut être régulé par des modifications épigénétiques trouvées sur la queue des histones et sur l'ADN. Les enzymes Ten-eleven translocation (TET) sont responsables de l'oxydation des 5-méthylcytosines. Parmi les formes oxydées, l'accumulation de la 5-hydroxyméthylcytosine au sein de régions régulatrices géniques est associée à l'activation de la transcription et à un état ouvert de la chromatine. Outre leur activité catalytique, les protéines TET sont aussi impliquées dans le recrutement de facteurs de remodelage chromatinien. Les protéines TET participent donc à la régulation de la structure chromatinienne via différents mécanismes qui restent cependant à être mieux caractérisés.

En analysant l'état de structuration de la chromatine en microscopie confocale et électronique, j'ai pu démontrer qu'indépendamment de l'activité enzymatique de TET1, la surexpression de la région N-terminale de TET1 dans les cellules humaines est responsable d'une réorganisation chromatinienne aboutissant à une démixion entre phase chromatinienne et nucléoplasme. Cette réorganisation est aussi associée à une modification de la dynamique d'échange des histones au niveau du nucléosome. Au niveau fonctionnel, le remodelage chromatinien induit par le domaine N-terminal de TET1 est associé à un enrichissement d'une marque d'histone répressive, H3K27me3 et une diminution globale du niveau transcriptionnel. L'ensemble de ces données suggère que le domaine N-terminal de TET1, pourrait participer à la régulation de la transcription via son rôle dans le remodelage de la structure chromatinienne.

Title : Characterisation of the role of the protein Ten-eleven translocation 1 (TET1) in the dynamic of chromatin organisation.

Keywords : Chromatin, Transcription, Epigenetic, Microscopy.

Abstract : The chromatin, composed of DNA and histone proteins, displays a complex and dynamic multiscale structure involved in the regulation of transcription. The chromatin compaction state is regulated by epigenetic tags found on both histones and DNA. Ten-eleven translocation (TET) enzymes are responsible for the oxidation of 5-methylcytosines. Among the oxidized forms, the accumulation of the the 5-hydroxymethylcytosine at regulatory regions is associated with transcriptional activation and an open chromatin state. Besides their catalytic activity, TET proteins are also involved in the recruitment of chromatin remodelers. Therefore, TET proteins participate in the regulation of the chromatin structure via several pathways that still need further investigations.

By analysing the structural state of the chromatin by electron and confocal microscopy, I demonstrated that independently of the activity of TET1, the overexpression of the N-terminal domain of TET1 in human cells is responsible for a chromatin reorganisation leading to an unmixing of the chromatin phase from the nucleoplasm. This reorganisation is also associated with a change of histone turnover at the nucleosome. The chromatin reorganisation induced by the presence of the N-terminal domain of TET1 is associated with an enrichment in the repressive histone mark, H3K27me3 and a global shut down of the transcription. All these data suggest that the N-terminal domain of TET1 could participate in transcription regulation via its role in chromatin remodeling.