



**HAL**  
open science

# Analyse de la dynamique du facteur de transcription HSF1 "Heat Shock Factor 1" par microscopie de fluorescence

Gaëtan Herbomel

► **To cite this version:**

Gaëtan Herbomel. Analyse de la dynamique du facteur de transcription HSF1 "Heat Shock Factor 1" par microscopie de fluorescence. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV030 . tel-00771403

**HAL Id: tel-00771403**

**<https://theses.hal.science/tel-00771403>**

Submitted on 8 Jan 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Gaëtan HERBOMEL**

Thèse dirigée par **Catherine SOUCHIER**

préparée au sein du  
**Laboratoire Stress, cancer et dynamique de l'organisation du  
génomme – Equipe10**  
**Institut Albert BONNIOT**  
**CRI-U823 - Université Joseph FOURIER**  
dans l'École Doctorale Chimie Sciences du Vivant

# Analyse de la dynamique du facteur de transcription HSF1 « Heat Shock Factor 1 » par microscopie de fluorescence

Thèse soutenue publiquement le **19 Octobre 2012**,  
devant le jury composé de :

**Mme, Valérie, MEZGER**

DR2 - UMR7216-Université Paris Diderot, Rapporteur

**Mr, François, AMBLARD**

DR2 - Institut Curie, CNRS-Université Pierre et Marie Curie, Rapporteur

**Mr, Laurent, HELIOT**

IR1 – IRI, CNRS-Université de Lille 1, Examineur

**Mr, Antoine, DELON**

PR2 – LIPhy, CNRS-Université Joseph Fourier, Examineur

**Mme, Catherine, SOUCHIER**

CR1 - IAB, INSERM-Université Joseph FOURIER, Directrice de thèse





*A ma famille,  
Et à tous ceux qui me sont chers,*

## *Remerciements*

Je remercie le docteur Valérie Mezger et le docteur François Amblard pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que le docteur Laurent Héliot et le professeur Antoine Delon pour avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Je tiens aussi à remercier Claire Vourc'h pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et Catherine Souchier, pour m'avoir encadré et tant appris au cours de ces trois années. Je te remercie pour tous tes conseils professionnels et extra-professionnels ainsi que pour la liberté que tu m'as accordée.

Je remercie tous les membres de l'équipe 10 à l'IAB, notamment mes voisines et mon voisin de paillasse : Edwige C., Jessica P., Lydia, Solenne et Eric, qui m'ont supporté, et le mot doit leur sembler bien faible. Si ces trois années se sont si bien passées c'est grâce à la bonne humeur qui régnait dans le labo et lors des repas, pauses et surtout les goûters !!

Je remercie aussi tous les collaborateurs avec qui j'ai pu travailler au cours de ces années et sans qui ces travaux n'auraient pas pu se réaliser : Antoine Delon, Meike Kloster-Landsberg, Irène Wang et Rémi Galland, pour les membres ou ex-membres de l'équipe MOTIV au LIPhy, ainsi que Yves Usson, et Virgile Adam. Je vous remercie pour toutes les discussions que nous avons pu avoir et pour le savoir que vous acceptez de partager. Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Annie Mola et Patrick Lomonte, pour les discussions critiques et les conseils que vous m'avez apportés lors de nos différentes réunions. Je remercie également la région Rhône Alpes, qui a financé mes travaux de thèse sur trois ans et l'ANR qui a financé le projet « Dynastress ».

Au cours de ces trois années j'ai rencontré des personnes merveilleuses qui ont fait de ma thèse une expérience unique, au-delà des supers soirées, ils m'ont aidé à surpasser les petits tracas quotidiens et sont devenus de bon amis, pour tous les

excellents moments passés en votre compagnie : un grand merci à Alexandra, Aurore, Emilie, Jessica P., Jonathan, Lydia, Sandrine, Solenne, Tanguy et les deux Vincent.

Enfin je souhaiterais remercier ceux qui ont aussi participé à leur manière au bon déroulement de ces trois années : Aurélia, Cyril, Edwige B., Emeline, Faycal, Jessica V., Leila, Nicolas, Sébastien et Sophie.

Je tiens à remercier ceux qui de loin ont aussi participé au bon déroulement de ces années de thèse, je parle de mes amis Toulousains qui m'ont toujours encouragé et ont toujours été présents lors de mes retours à Toulouse : Jade, Ilfad, Thomas, Marine, Jérôme et Sébastien.

Enfin je tiens plus particulièrement à remercier ma famille qui m'a toujours soutenu, même dans les moments difficiles et ce malgré la distance. Je mesure chaque jour la chance que j'ai de vous avoir à mes côtés.

## Résumé

La majorité des études sur la dynamique des facteurs de transcription en cellules vivantes s'accordent sur une dynamique rapide. Il existe cependant quelques exceptions, comme la dynamique du facteur de transcription HSF « Heat Shock Factor », sur les chromosomes polyténiques de drosophile. Notre projet a consisté à étudier la dynamique d'HSF1 dans des cellules humaines. L'exposition des cellules à un stress tel qu'un choc thermique induit une réponse ubiquitaire et transitoire, dont la fonction est de protéger les cellules contre les effets délétères du stress. Au cours d'un choc thermique, plusieurs phénomènes se produisent : i) un arrêt global de la transcription excepté pour certains gènes tels que ceux codant pour les protéines de choc thermique (HSPs), dont l'expression est sous le contrôle du facteur de transcription HSF1. ii) une activation d'HSF1 qui se relocalise de façon rapide et transitoire sur les corps nucléaires de stress (nSBs), où il induit la transcription des séquences satellite III. Les nSBs forment un site d'activité naturellement amplifié et visible en microscopie.

Nous avons utilisé deux techniques complémentaires pour étudier la dynamique d'HSF1 en cellules vivantes : le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) et la spectroscopie à corrélation de fluorescence multi-confocale (mFCS), qui permet l'analyse FCS en plusieurs points simultanément. En cellules HeLa, la protéine HSF1-eGFP présente une dynamique rapide qui est significativement ralentie suite à un choc thermique. En mFCS, nous avons obtenu des constantes de diffusion de  $14 \mu\text{m}^2/\text{s}$  avant choc thermique et de  $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  après choc thermique. En FRAP, le temps de demi-recouvrement est de 0,2 s avant choc thermique, 2,6 s après choc thermique dans le nucléoplasme et 65 s sur les corps nucléaires de stress. Le ralentissement de la dynamique d'HSF1 s'explique par deux phénomènes : i) la formation de complexes de haut poids moléculaire, ii) une augmentation des interactions avec la chromatine. Pour mieux caractériser le changement de dynamique d'HSF1 après choc thermique, plusieurs mutants ont été analysés. Le domaine de trimérisation est indispensable pour le changement de dynamique après choc thermique, alors que le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation n'ont que peu d'effet sur le changement de dynamique. Ce changement ne peut donc pas être expliqué uniquement par les interactions directes à la chromatine du domaine de liaison à l'ADN, ni même par les liaisons indirectes du domaine de transactivation via d'autres protéines. La protéine HSF1 pourrait interagir de façon aspécifique avec la chromatine lors de la recherche de site de liaison, ou d'autres protéines via d'autres domaines pourraient entraîner des interactions indirectes avec la chromatine.

# Sommaire

Chapitre I	Introduction.....	1
1.	L'initiation de la transcription .....	1
1.1.	L'organisation structurale et fonctionnelle du noyau : la chromatine.....	1
1.2.	L'initiation de la transcription .....	2
2.	Méthodes d'étude des facteurs de transcription en microscopie de fluorescence.....	7
2.1.	L'avènement des protéines fluorescentes .....	7
2.2.	Modèles d'amplification de gènes .....	11
2.2.1.	Les sites artificiels.....	11
2.2.1.1.	pBPV-MMTV-LTR-ras (MMTV array) .....	11
2.2.1.2.	pHIV-LTR-CFP-SKL (site HIV) .....	12
2.2.1.3.	Les sites lactose .....	12
2.2.1.4.	pX-PRLdsRed2-SKL (site prolactine) .....	13
2.2.2.	Les sites naturels .....	13
2.2.2.1.	Les gènes ribosomaux dans le nucléole .....	14
2.2.2.2.	Le locus CUP1 de la levure <i>S.cerevisiae</i> .....	14
2.2.2.3.	Les chromosomes polyténiques de drosophile.....	14
2.3.	Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) .....	16
2.3.1.	Principe.....	16
2.3.2.	Modèle de diffusion pure .....	17
2.3.3.	Modèle de diffusion effective .....	17
2.3.4.	Modèle à réaction dominante.....	18
2.3.5.	Modèle analytique de diffusion et interaction.....	18
2.3.6.	Modèle numérique de diffusion et interaction.....	18
2.3.7.	Conclusion sur les modèles d'analyses de FRAP .....	19
2.3.8.	Méthodes dérivées du FRAP .....	19
2.4.	La spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) et ses variantes.....	21

2.4.1.	Principe.....	21
2.4.2.	Modèles.....	22
2.4.2.1.	Modèle de diffusion libre 3D.....	22
2.4.2.2.	Calcul théorique de la constante de diffusion.....	23
2.4.2.3.	Analyse des triplets .....	23
2.4.2.4.	Modèle de diffusion effective .....	23
2.4.2.1.	Modèle de diffusion à deux composants .....	25
2.4.2.2.	Modèle de diffusion et interaction .....	25
2.4.3.	La spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence .....	25
2.4.4.	Au-delà de la FCS traditionnelle .....	27
3.	La dynamique du processus de transcription en cellules vivantes .....	28
3.1.	La recherche des sites d'interaction.....	28
3.2.	Les ARN Polymérase .....	30
3.2.1.	L'ARN polymérase I.....	30
3.2.2.	L'ARN polymérase II.....	31
3.2.2.1.	Sur chromosomes polyténiques.....	31
3.2.2.2.	Sur site d'amplification.....	32
3.3.	La dynamique des facteurs généraux.....	32
3.3.1.	TFIID (TATA Binding Protein et TBP-associated factor) .....	33
3.3.2.	TFIIH.....	33
3.4.	La dynamique des facteurs spécifiques de transcription et cofacteurs .....	35
3.4.1.	Les récepteurs nucléaires.....	35
3.4.1.1.	Le récepteur au glucocorticoïde.....	35
3.4.1.2.	Le récepteur à l'œstrogène .....	37
3.4.1.3.	Le récepteur à l'androgène .....	38
3.4.1.4.	Le récepteur à la progestérone .....	39
3.4.1.5.	Les récepteurs nucléaires de type II.....	39
3.4.1.6.	Conclusion sur la dynamique des récepteurs nucléaires .....	41

3.4.2.	p53.....	41
3.4.3.	Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B.....	42
3.4.4.	Le facteur de transcription dépendant du cuivre : Ace1.....	44
3.4.5.	Analyse de Gal 4 et Hif-1-par CHIP compétitive en temps réel.....	44
3.4.5.1.	GAL 4 (Chip levure).....	45
3.4.5.2.	Le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ ).....	45
3.5.	Généralités sur la dynamique des facteurs de transcription.....	45
4.	HSF1 et la réponse au stress thermique.....	47
4.1.	Les effecteurs de la réponse au choc thermique.....	47
4.1.1.	La famille des facteurs de transcription HSF.....	47
4.1.1.1.	HSF1.....	48
4.1.1.2.	HSF2.....	48
4.1.1.3.	HSF3.....	49
4.1.1.4.	HSF4.....	49
4.1.2.	Les cibles d'HSFs : les éléments de réponse au stress (HSE).....	49
4.2.	La structure de la protéine HSF1.....	53
4.2.1.	Le domaine de liaison à l'ADN (DBD).....	53
4.2.2.	Le domaine de trimérisation (TRIM).....	54
4.2.3.	Le domaine de régulation (RD).....	54
4.2.1.	Le domaine de transactivation (TAD).....	56
4.3.	La régulation de l'activité d'HSF1.....	56
4.3.1.	Les mécanismes senseurs du stress.....	56
4.3.2.	Les modifications post-traductionnelles.....	59
4.3.2.1.	Phosphorylation.....	59
4.3.2.2.	Sumoylation.....	60
4.3.2.3.	Acétylation.....	60
4.4.	Les corps nucléaires de stress.....	61
4.5.	La dynamique du facteur HSF1.....	63

4.6.	Implication d'HSF1 dans différentes maladies .....	64
Chapitre II	Résultats .....	66
1.	Caractérisation de lignées cellulaires exprimant la protéine humaine HSF1 sauvage ou mutée fusionnée à la protéine eGFP .....	67
1.1.	Description des constructions .....	67
1.2.	Sélection de lignées cellulaires stables.....	69
1.3.	Localisation et expression des différentes constructions .....	71
1.4.	Analyse de la capacité de liaison à l'ADN des différentes constructions .....	73
1.5.	Analyse de la capacité de la protéine sauvage et des mutants à former des complexes moléculaires avant et après choc thermique.....	79
2.	Développement d'un système multi-confocal FCS (mFCS) pour l'analyse de la dynamique du facteur de transcription HSF1. ....	83
2.1.	Intérêt.....	83
2.2.	Description du système mFCS .....	85
2.3.	Mise au point du système d'induction du choc thermique sur microscope.....	87
2.4.	Validation du système mFCS .....	89
3.	Analyse de la dynamique d'HSF1 par mFCS et FRAP.....	91
3.1.	Analyse de la dynamique de la protéine eGFP.....	91
3.2.	Analyse de la dynamique d'HSF1 .....	94
3.3.	Analyse de la dynamique des mutants d'HSF1 .....	102
Chapitre III	Discussion .....	107
1.	Complémentarité des méthodes de dynamique : FCS et FRAP .....	107
2.	Dynamique d'HSF1 dans les cellules HeLa et U87.....	108
3.	Rôle des différents domaines dans la dynamique d'HSF1 .....	111
Chapitre IV	Conclusion et Perspectives.....	116
Chapitre V	Matériels et méthodes .....	119
Références.....		129
Annexes .....		146

1. Articles.....	146
2. Résultats préliminaires.....	147
2.1. Etude de la trimérisation d’HSF1 en cellules vivantes .....	147
2.2. Visualisation en super-résolution des corps nucléaires de stress.....	150
2.3. Analyse des changements de texture chromatinienne induits par le choc thermique ..	151

## Liste d'abréviations

ACF : Courbe d'autocorrélation  
AD : Domaine d'activation  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ARN pol I : ARN polymérase I  
ARN pol II : ARN polymérase II  
ARN : Acide RiboNucléique  
DBD : Domaine de liaison à l'ADN  
eGFP : Protéine fluorescence verte améliorée  
EMCCD : Caméra de dispositif à transfert de charge à multiplication d'électrons  
FCCS : Spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence  
FCS : Spectroscopie à corrélation de fluorescence  
FP : Protéine fluorescente  
FRAP : Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment  
HAT: Histone acetyltransférase  
HDAC : Histone déacetylase  
HR : « Heptad Repeat »  
HRE : Élément de réponse aux hormones  
HS : Choc thermique  
HSE : Élément de réponse au choc thermique  
HSF : Facteur de choc thermique  
HSP : Protéine de choc thermique  
IFP 1.4 : Protéine fluorescente infrarouge 1.4  
mFCS : Spectroscopie à corrélation de fluorescence multi-confocale  
MMTV : « Mouse Mammary Tumour Virus »  
NLS : Séquence de localisation nucléaire  
NR : Récepteur Nucléaire  
nSB : Corps nucléaire de stress  
PALM : Microscopie de localisation par photoactivation  
PI : Point isoélectrique  
RD : Domaine de régulation  
Sat III : Satellite III  
sHSP : petite protéine de choc thermique  
SLM : Modulateur spatial de lumière  
SMT : Suivi de molécule unique  
STED : Déplétion par émission stimulée  
SUMO : « Small Ubiquitin-like Modifier »  
TAD : Domaine de transactivation  
TAF : Facteurs associés à la protéine TBP  
TBP : Protéine de liaison à la boîte TATA  
wHTH : domaine en Hélice Tour Hélice ailé

# Chapitre I Introduction

## 1. L'initiation de la transcription

### 1.1. L'organisation structurale et fonctionnelle du noyau : la chromatine

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est organisé en une structure supérieure appelée chromatine. Dans un premier temps, la fonction première de la chromatine a été associée à la compaction de l'ADN dans le noyau. Cependant la chromatine joue aussi un rôle majeur dans tous les processus reliés à l'ADN tels que la réplication, la recombinaison, la réparation de l'ADN, la formation des kinétochores, des centromères et la transcription. Le nucléosome compose l'unité fondamentale répétée de la chromatine. Il est composé d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3, H4), sur lequel s'enroule 147 pb d'ADN. Les 147 pb d'ADN sont enroulés sur 1,65 tour, avec 14 points de contact entre les histones, protéines basiques, et l'ADN, faisant du nucléosome un complexe relativement stable. Cependant ce complexe est aussi très dynamique et est étroitement régulé par les marques épigénétiques, que sont les modifications post-traductionnelles des histones, et de multiples complexes protéiques (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Les histones possèdent un corps globulaire et une queue N-terminale non structurée qui est sujette à des modifications post-traductionnelles très variées. 130 sites uniques de modifications ont été recensés jusqu'à présent, principalement sur la queue N-terminale mais aussi dans le corps globulaire et la queue C-terminale. Il existe 13 types de modifications sur les histones, les principales sont l'acétylation (Lys), la méthylation (Lys, Arg), la phosphorylation (Ser, Thr), l'ubiquitylation (Lys), la sumoylation (Lys), l'ADP-ribosylation (Arg, Glu) et la crotonylation (Lys) (Tan et al., 2011). Les marques épigénétiques sont associées à différents états de la chromatine (Strahl and Allis, 2000), ainsi les modifications localisées dans les gènes et régions inactives telles que la méthylation de la lysine 9 ou 27 de l'histone H3 (H3K9 et H3K27), sont associées à l'hétérochromatine. Au contraire, les modifications associées avec les régions transcriptionnellement actives telles que l'acétylation des histones H3 et H4, la crotonylation (Tan et al., 2011), ainsi que la di ou tri-méthylation de H3K4 sont communément associées à l'euchromatine qui représente un état ouvert de la chromatine (Li et al., 2007; Kouzarides, 2007).

Dans les régions transcriptionnellement actives, les modifications des histones sont distribuées différemment le long du gène. En effet, la position de chaque modification est étroitement régulée et est cruciale pour son effet sur la transcription. L'acétylation des lysines se produit sur de multiples résidus : elle est catalysée par une variété d'histones acétyl-transférases (HAT)

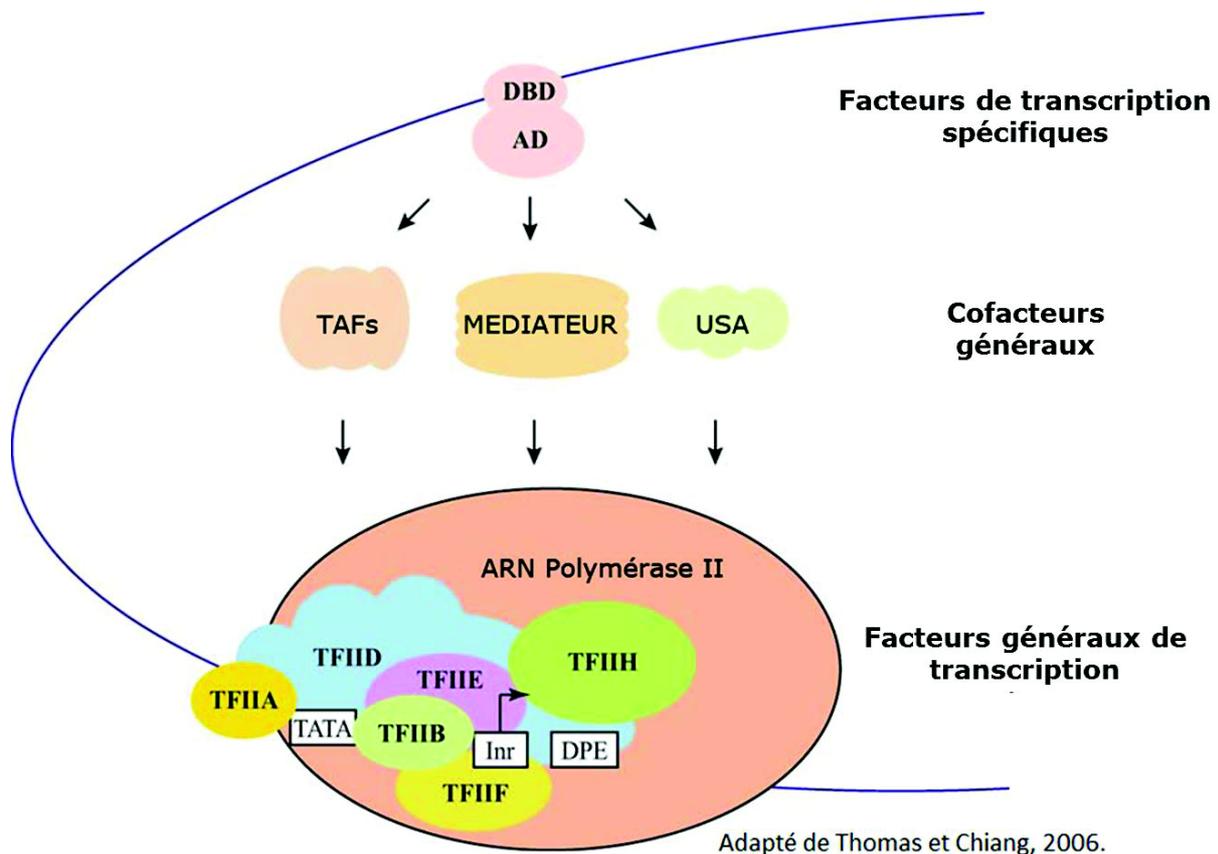
divisées en trois familles : GNAT, MYST et CBP/p300. Au contraire, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitylation sont souvent catalysées par des enzymes spécifiques à des sites spécifiques. Les modifications sont transitoires. Il existe des enzymes capables de retirer la majorité des marques épigénétiques des histones. Les histones déacétylases (HDAC) sont responsables du retrait des groupements acétyles sur les histones et sont divisées en trois classes : les HDAC de classe I, de classe II et de classe III NAD-dépendante de la famille Sirtuine. Les modifications des histones ont différentes fonctions : 1) à l'exception de la méthylation, les autres modifications induisent un changement net de la charge du nucléosome, conduisant à la perte ou à la fragilisation des interactions entre l'ADN et les histones et entre les histones de nucléosomes adjacents, 2) les modifications sont reconnues par des protéines effectrices qui peuvent influencer la dynamique et la fonction de la chromatine, 3) certaines modifications, comme H4K16ac qui empêche la formation de la fibre de 30nm, agissent directement sur les structures supérieures chromatinienne (Kouzarides, 2007).

Un autre niveau de régulation de la structure chromatinienne est effectué par les facteurs de remodelage ATP-dépendants, comme SWI/SNF. Ces complexes sont responsables de l'ouverture de l'ADN par rapport à l'octamère d'histones, la formation d'une boucle d'ADN, des évictions ou des déplacements de nucléosomes par glissement le long de l'ADN. Tous ces phénomènes changent l'accessibilité de l'ADN nucléosomal pour les facteurs de transcription. Les histones du nucléosome peuvent aussi être échangées par les facteurs de remodelage. La coopérativité entre la liaison des facteurs de transcription, les complexes de remodelage, l'ARN polymérase II active, peut entraîner un déplacement des histones pour favoriser l'activité de transcription. Ce déplacement nécessite aussi l'intervention de chaperonnes d'histones telles que Asf1, Nap1 et nucléophosmine (Workman, 2006).

Le dernier élément capable de réguler la structure chromatinienne est l'incorporation de variants d'histones. Les histones de cœur canoniques sont synthétisées et incorporées au cours de la phase S du cycle cellulaire. Les variants d'histones sont produits et incorporés de manière indépendante de la réplication ; ils ont différents impacts sur la structure de la chromatine et possèdent différentes fonctions vis-à-vis de la transcription. (Li et al., 2007; Kouzarides, 2007)

## **1.2. L'initiation de la transcription**

L'information génétique est transmise de l'ADN vers les protéines en passant par l'ARN. La production de l'ARN aussi appelée transcription, est un processus hautement coordonné par l'ARN polymérase. Cette enzyme peut synthétiser l'ARN à partir d'une matrice d'ADN et a un rôle universel dans la transcription chez les eucaryotes et les procaryotes. Aujourd'hui, quatre ARN



**Figure 1** Protéines et complexes protéiques impliqués dans la régulation de l'initiation de la transcription.

L'initiation de la transcription est régulée par trois acteurs principaux. Les facteurs généraux de transcription capables de reconnaître des séquences dans le promoteur proximal, et de recruter d'autres facteurs pour former le complexe de pré-initiation. Les facteurs spécifiques de transcription, capables de réguler plus finement la transcription des gènes en réponse à différents stimuli. Les cofacteurs généraux, qui sont capables de transmettre le signal des facteurs de transcription spécifiques vers la machinerie basale de transcription. (Adaptée de Thomas et Chiang, 2006).

polymérase différentes ont été identifiées chez les eucaryotes supérieurs, contre une seule chez les procaryotes. Chez les eucaryotes supérieurs, l'ARN polymérase I est principalement impliquée dans la transcription des ARN ribosomiaux 18S et 28S, et est localisée à l'intérieur des nucléoles. L'ARN polymérase II transcrit les ARN messagers et l'ARN polymérase III transcrit les ARN ribosomiaux 5S, les ARN de transfert, et les ARN VA des adénovirus. Les ARN polymérases II et III sont normalement présentes dans le nucléoplasme. La quatrième ARN polymérase, récemment identifiée chez les plantes, facilite la synthèse des petits ARN interférents (siARN) (Herr et al., 2005; Zhang et al., 2007). Chacune de ces polymérases possède des propriétés biochimiques uniques, telles que des profils d'élution chromatographique distincts, leur localisation à l'intérieur du noyau, la sensibilité à l' $\alpha$ -amanitine, inhibiteur de la transcription, et aussi le nombre de leur sous-unités. L'ARN polymérase I est composée de 14 sous-unités, l'ARN pol II de 12 sous-unités et l'ARN pol III de 17 sous-unités. Les 12 sous-unités de l'ARN pol II sont désignées de RPB1 à RPB12 par ordre décroissant de leur masse moléculaire. Sur les 12 sous-unités de pol II, cinq (RPB5, 6, 8, 10 et 12) sont communes aux trois ARN polymérases, quatre (RPB1, 2, 3 et 11) présentent des homologies de séquence avec leurs homologues chez pol I et pol III. Seules les sous-unités RPB4, 7, 9 et la queue C-terminale de la sous-unité RPB1 sont spécifiques de l'ARN polymérase II. RPB1 et RPB2 sont majoritairement responsables de l'activité catalytique de la polymérase et sont essentielles pour la formation des ponts phosphodiester entre les nucléotides. Cependant, il manque aux ARN polymérases une capacité de reconnaissance des séquences spécifiques des régions initiateuses de la transcription. Cette étape nécessite l'appui de facteurs de transcription.

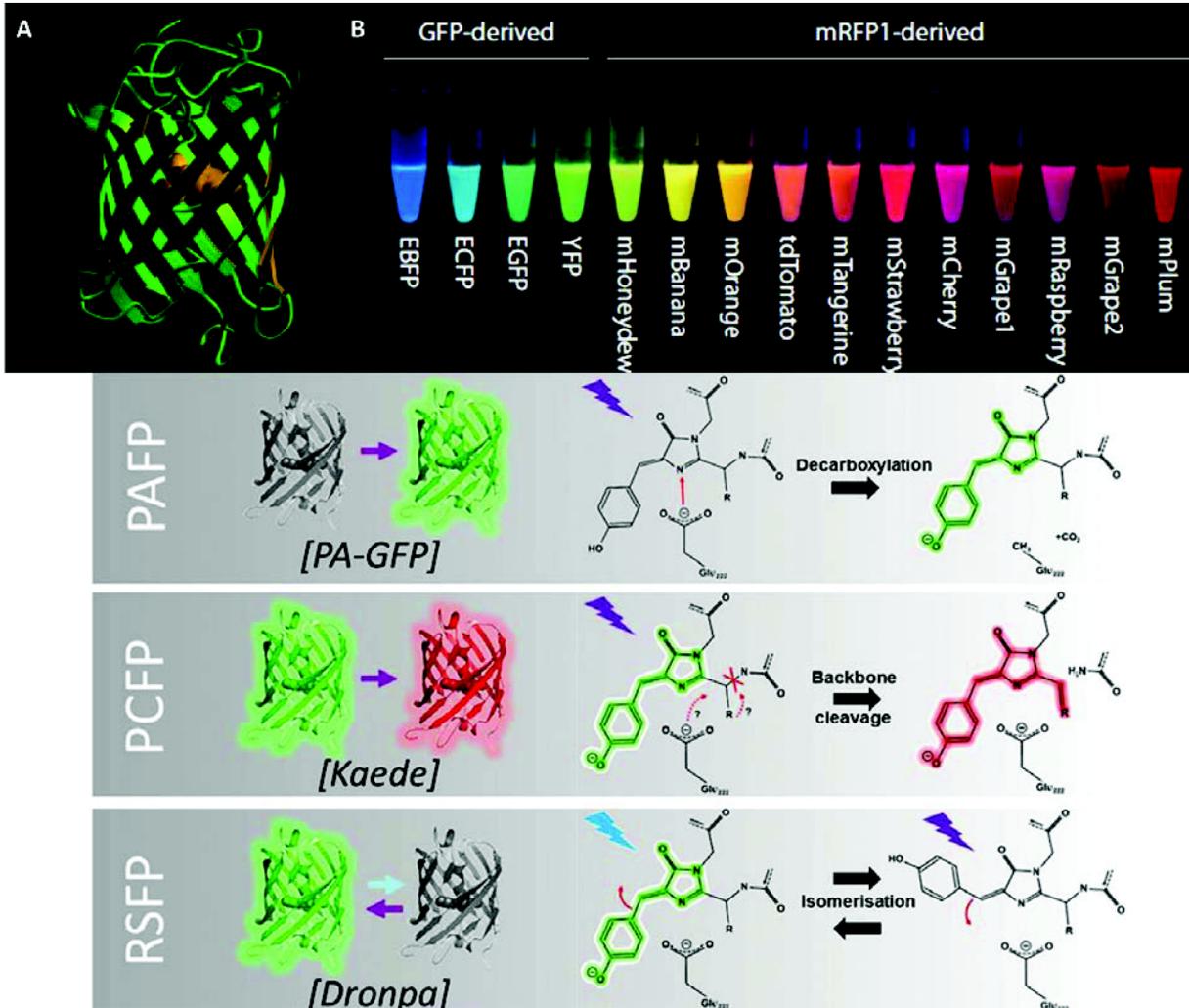
Les premiers facteurs de transcription à avoir été identifiés pour l'ARN pol II sont les facteurs généraux de transcription dénommés TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIF, TFIIF (Figure 1). Le facteur le plus important dans la reconnaissance du promoteur est le facteur TFIID, qui est en fait un complexe multi-protéique composé de la protéine TBP «TATA Binding Protein» ainsi que de plusieurs TAFs (1 à 15) «TBP-Associated Factor». Le promoteur basal ou «core» est situé entre 40 et 50 pb en amont du point +1, point de départ de la transcription. Il peut contenir de multiples séquences promotrices. Il a longtemps été pensé que la séquence universelle était la boîte TATA, localisée de 25 à 30 nucléotides en amont du point +1. Cependant il s'avère que les promoteurs contenant la séquence TATA ne représentent que 22% des promoteurs. Il existe d'autres séquences promotrices associées avec le point +1 telles que l'INR «initiator», le DPE «Downstream Promoter Element», l'élément de reconnaissance de TFIIB (BRE), le DCE «Downstream Core Element» et le MTE «Mutation Ten Element». Chaque séquence peut être reconnue par des facteurs différents. Ainsi, la boîte TATA est reconnue par la protéine TBP, l'INR par TAF1 et TAF2, le DPE par TAF6 et 9, le DCE par TAF1 et BRE par TFIIB. Plusieurs séquences sont

reconnues par le complexe TFIID, qui est en fait très variable. La présence dans TFIID, de TAFs différentes, et de la protéine TBP, pourrait expliquer l'existence et la reconnaissance de différents promoteurs (Müller et al., 2007).

Les facteurs généraux de transcription et l'ARN polymérase II forment le complexe de pré-initiation de la transcription (PIC). Il existe deux voies principales permettant la formation du complexe de pré-initiation : soit le PIC s'assemblerait de façon séquentielle sur le promoteur, soit il existerait sous une forme pré-assemblée d'holoenzymes. La voie séquentielle suggère un modèle de formation du PIC respectant un ordre précis d'addition des facteurs. TFIID vient se lier dans les régions promotrices, TFIIA et TFIIB viennent ensuite stabiliser l'interaction entre TFIID et les régions promotrices, permettant ainsi le recrutement de l'ARN pol II et de TFIIF. Les facteurs TFIIE et TFIIH sont ensuite recrutés sur le complexe. TFIIH possède une activité hélicase permettant l'ouverture du promoteur, ainsi qu'une activité kinase permettant la phosphorylation de la queue du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II. L'autre voie de formation du PIC, suggère l'existence d'une holoenzyme pol II. Le complexe contiendrait l'ARN pol II, TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH et des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (GCN5, SWI/SNF). Le complexe serait dépourvu de TFIID et TFIIA. Il semblerait que les deux voies existent simultanément *in vivo* et que leur intervention dépendrait de molécules de signalisation spécifiques (Thomas and Chiang, 2006; Hahn, 2008).

Tous ces événements contribuent à l'activité de base de l'ARN polymérase II. Cependant, il existe des facteurs de transcription capables d'activer et d'augmenter l'activité de la polymérase de façon gène spécifique. Ces facteurs de transcription possèdent généralement un domaine de liaison à l'ADN (DBD), qui reconnaît des séquences spécifiques dans les régions promotrices, et un domaine d'activation (AD) capable de recruter des facteurs de remodelage de la chromatine et des co-activateurs de la transcription au voisinage du site d'initiation de la transcription. Ces co-activateurs de la transcription incluent les TAF du complexe TFIID, le médiateur et les cofacteurs dérivés d'USA « upstream stimulatory activity » (Figure 1). Le médiateur, comme TFIID, est capable de transmettre les signaux régulateurs des facteurs de transcription gène-spécifiques vers la machinerie de transcription. Le médiateur est composé d'environ 20 sous-unités protéiques, atteignant une masse totale d'environ 1 million de daltons (MDa). Il est capable de stimuler à la fois la transcription basale et la transcription dépendante d'activateurs (Kornberg, 2005).

Au début des années 2000, a émergé le concept d'usines de transcription « transcription factories ». Ces usines correspondent à des sites contenant un assemblage de facteurs impliqués dans la transcription et la maturation des ARN associés à de multiples gènes. A l'intérieur du



**Figure 2 Les protéines fluorescentes - la GFP et ses variantes**

A. Structure de la protéine GFP (d'après le site du laboratoire de Tsien). La GFP est formée d'un large feuillet  $\beta$  qui s'enroule sous la forme d'un tonneau, le chromophore est contenu sur une hélice- $\alpha$  qui rentre dans le tonneau.

B. Différentes protéines fluorescentes recouvrant le spectre du visible. (D'après Rino, et al., 2009).

C. Principales voies de photo-transformation. Entre parenthèse est présenté le membre historique de chaque groupe. PAFP = Photoactivable, PCFP = Photoconvertible, RSFP = Photocommutables. (D'après Bourgeois, et al., 2012).

noyau, il existerait des milliers de ces usines, qui contiendraient une trentaine de polymérase pour une vingtaine d'unités de transcription.

Cette compartimentalisation n'est pas sans précédent, elle est analogue à celle observée pour l'ARN polymérase I à l'intérieur des nucléoles. Elle présenterait aussi un certain avantage quant à la concentration des facteurs requis pour la transcription assurant des interactions efficaces des différents composants de la machinerie de transcription. (Misteli, 2007; Darzacq et al., 2009; Carter et al., 2008).

## **2. Méthodes d'étude des facteurs de transcription en microscopie de fluorescence**

Le recrutement temporel des facteurs de transcription sur le promoteur des gènes cibles a principalement été étudié par des techniques biochimiques. Ces techniques permettent d'évaluer où, quand et en quelle proportion un facteur de transcription lie sa cible ADN. Cependant la résolution temporelle de ces techniques est pauvre, elles sont restreintes à l'analyse d'une image statique de l'interaction protéine-chromatine dans une population cellulaire (Darzacq et al., 2009). Les récentes avancées dans le domaine des protéines fluorescentes, de la construction de sites d'amplification et le développement de techniques d'analyse de dynamique en microscopie à fluorescence, ont rendu possible l'étude de la dynamique des facteurs de transcription à l'échelle de la cellule unique et à des résolutions temporelles bien meilleures.

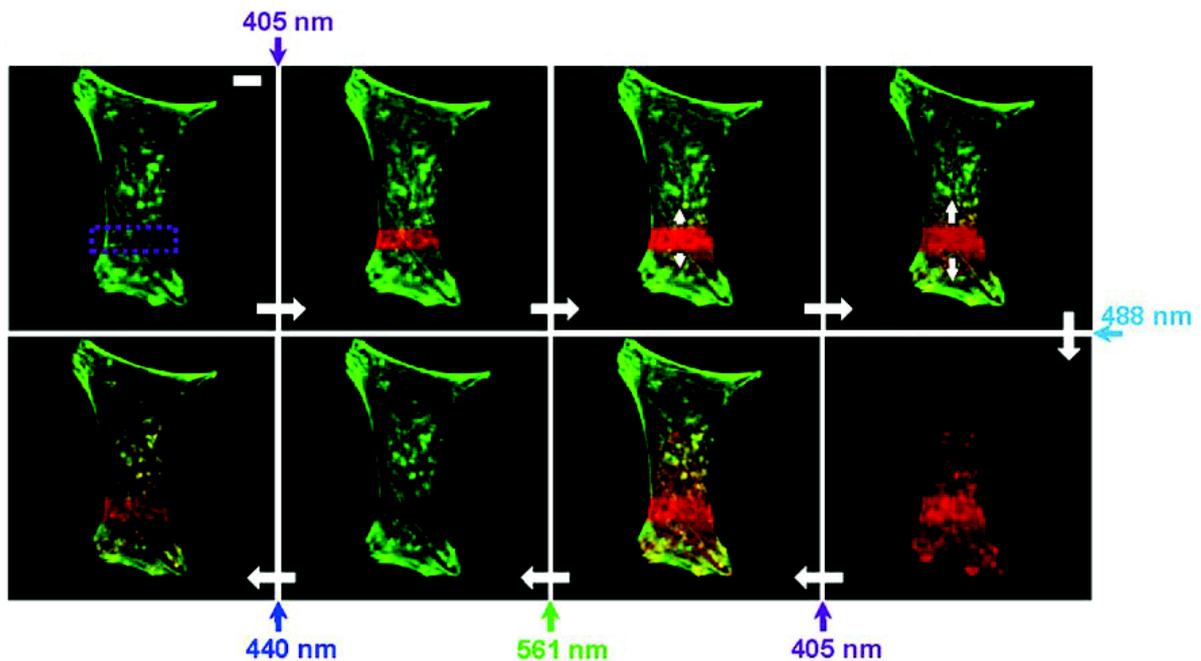
### **2.1. L'avènement des protéines fluorescentes**

La découverte et le développement de la protéine fluorescente verte (GFP) et des protéines fluorescentes (FPs) en général ont récemment été reconnus par le prix Nobel de chimie, attribué en 2008 à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien. La possibilité de fusionner n'importe quelle protéine à la protéine GFP permet de visualiser et de suivre les protéines en cellules vivantes par des techniques non-invasives. La protéine GFP dérivée de la méduse *Aequorea victoria* a été la première protéine fluorescente à avoir été clonée. Cette protéine est un monomère de 27 kDa ayant une forme cylindrique composée de 11 feuillets  $\beta$ , chaque bout du cylindre est fermé par de petits fragments d'hélices  $\alpha$ . Le chromophore est contenu sur une hélice  $\alpha$  à l'intérieur du tonneau. Malgré son grand potentiel, cette protéine sauvage possède deux pics d'excitation (396nm et 475nm), un coefficient d'extinction molaire faible ( $22\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), une maturation lente et une tendance à se dimériser. De multiples étapes de mutagénèses ont permis d'obtenir une version améliorée de cette protéine GFP, appelée eGFP, mais aussi une large variété

**Tableau 1 Propriétés photophysiques de différentes protéines fluorescentes**

Protéine	Organisme	$\lambda$ Excitation (nm)	$\lambda$ Emission (nm)	Brillance	pKa	$t_{1/2}$ maturation 37°C	Etat	$t_{1/2}$ bleach (s)	Ref
EBFP	<i>Aequorea victoria</i>	383	448	18	5,3		faible dimère	55	Shaner 2007
T-sapphire	<i>Aequorea victoria</i>	399	511	26	4,9		faible dimère	25	Shaner 2004
ECFP	<i>Aequorea victoria</i>	433/445	475/503	13	4,7		faible dimère	64	Shaner 2007
mEmerald	<i>Aequorea victoria</i>	487	509	39	6		monomère	101	Shaner 2007
mEGFP	<i>Aequorea victoria</i>	488	507	34	6		monomère	174	Shaner 2007
EYFP	<i>Aequorea victoria</i>	514	527	51	6,9		faible dimère	60	Shaner 2007
mVenus	<i>Aequorea victoria</i>	515	528	53	6		monomère	15	Shaner 2007
mCitrine	<i>Aequorea victoria</i>	516	529	59	5,7		faible dimère	49	Shaner 2007
mKO	<i>Fungia concinna</i>	548	559	31	5	4,5 h	monomère	122	Shaner 2007
mOrange	<i>Discosoma sp.</i>	548	562	49	6,5	2,5 h	monomère	9	Shaner 2007
tdTomato	<i>Discosoma sp.</i>	554	581	95	4,7	60 min	tandem-dimère	98	Shaner 2008
TagRFP	<i>Entacmaea quadricolor</i>	555	584	40	3,1	100 min	monomère	37	Shaner 2008
TagRFP-T	<i>Entacmaea quadricolor</i>	555	584	33	4,6	100 min	monomère	337	Shaner 2008
DsRed	<i>Discosoma sp.</i>	558	583	59	4,7	10 h	tétramère	326	Shaner 2008
mStrawberry	<i>Discosoma sp.</i>	574	596	26	<4,5	50 min	monomère	15	Shaner 2004
mRFP1	<i>Discosoma sp.</i>	584	607	13	4,5	<1 h	monomère	8,7	Shaner 2008
mCherry	<i>Discosoma sp.</i>	587	610	16	<4,5	15 min	monomère	96	Shaner 2008
mKate	<i>Entacmaea quadricolor</i>	588	635	15	6		monomère	166	Shaner 2007
mPlum	<i>Discosoma sp.</i>	590	649	5,9	<4,5	100 min	monomère	53	Shaner 2004
IFP 1,4	<i>Deinococcus radiodurans</i>	684	708	6,4	5-9		monomère		Shu 2009

Liste non exhaustive des protéines fluorescentes et de leurs propriétés photophysiques. La brillance correspond au produit du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique de chaque protéine. Le  $t_{1/2}$  de « bleach » correspond au temps nécessaire pour passer d'un taux d'émission initial de 1000 photons/s à 500 photons/s.



**Figure 3 Exemple de photo-transformation avec la protéine Niji-FP**

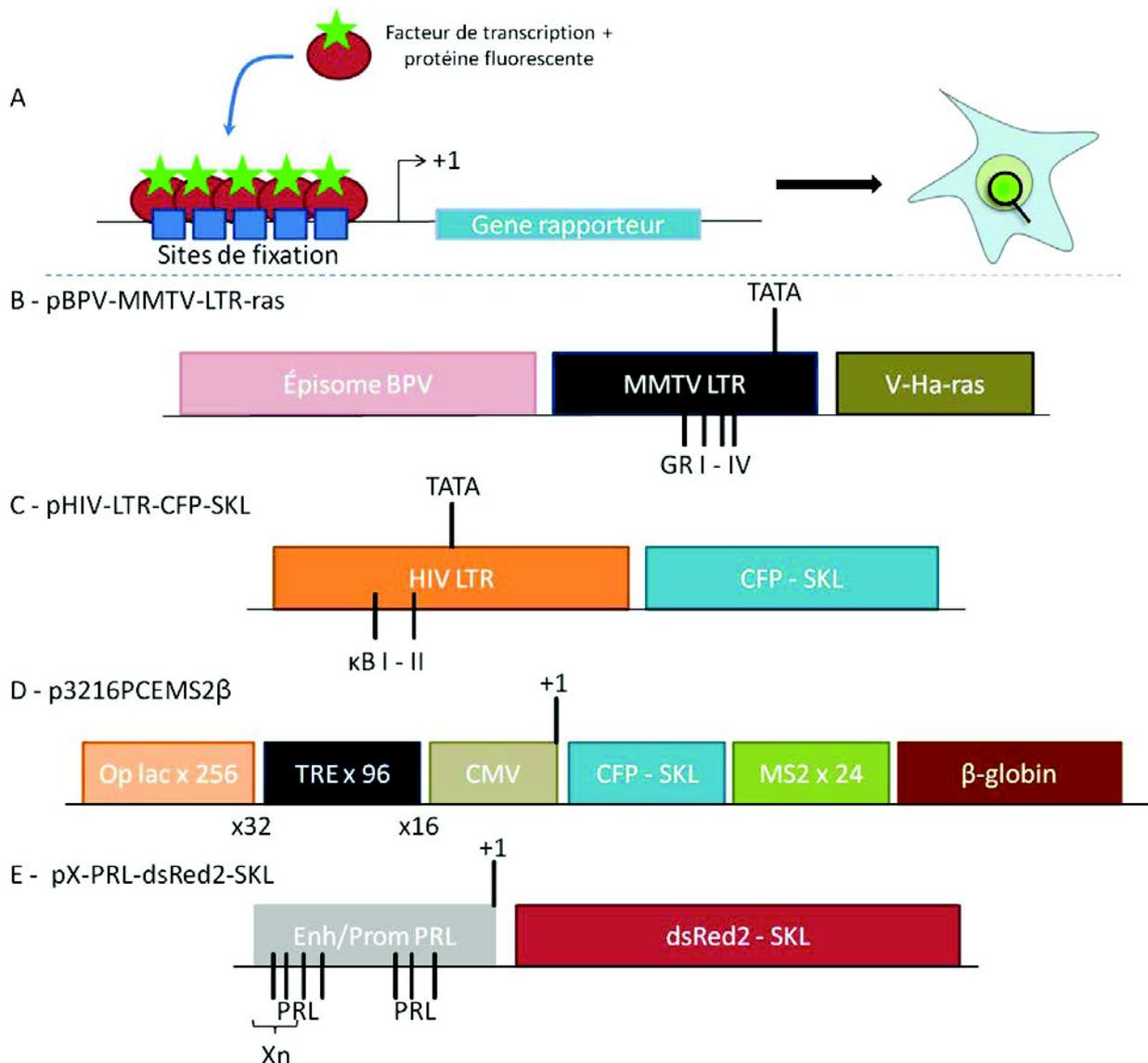
La protéine photocommutable NijiFP-actin est exprimée en cellules HeLa. La région violette est photoconvertie par une impulsion laser à 405 nm, la fluorescence passe alors du vert au rouge. Il est possible de suivre la mobilité de la protéine en suivant l'étalement de la fluorescence à partir de la région d'intérêt. La fluorescence de la protéine non photoconvertie peut être éteinte par une forte illumination à 488 nm, puis rallumée par une impulsion à 405 nm. La fluorescence de la protéine photoconvertie peut être, elle aussi, éteinte par une illumination à 561 nm et rallumée par une excitation à 440 nm. Barre = 10  $\mu$ m. (D'après Adam, et al., 2011).

de protéines fluorescentes qui diffèrent par leurs longueurs d'excitation, d'émission, temps de maturation, photostabilité, et brillance (Figure 2).

Beaucoup d'efforts ont été déployés pour le développement de protéines fluorescentes dans le rouge et le rouge lointain, car ces dernières permettent l'utilisation de longueurs d'ondes plus grandes résultant en une phototoxicité plus faible et une pénétration plus importante. Les premières protéines fluorescentes rouges ont été dérivées du corail, *Discosoma*, pour dsRed ou de l'anémone, *Entacmaea quadricolor*, pour TagRFP. Comme pour la GFP, il existe à présent de multiples variants dérivés de ces protéines (Figure 2) (Shaner et al., 2007; Shaner et al., 2008). Les avancées de ces dernières années permettent à présent de couvrir l'ensemble du spectre de la lumière visible et même au-delà. Chacune des protéines fluorescentes possède des propriétés photophysiques particulières qu'il convient de prendre en compte en fonction des expériences à réaliser et du matériel à disposition (Rino et al., 2009; Shaner et al., 2007).

L'ensemble de ces protéines fluorescentes ne dépasse pas le spectre du visible avec des longueurs d'ondes maximales d'excitation et d'émission de 598 et 655 nm respectivement. Or pour l'imagerie *in vivo* ou en tissu, les longueurs d'ondes comprises entre 650-900 nm sont plus adaptées, et permettent de mieux pénétrer dans l'échantillon. Disposer de deux protéines spectralement bien séparées peut être avantageux pour des techniques sensibles telles que la spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence (FCCS). Le développement de protéines fluorescentes à partir de phytochromes bactériens a permis le développement de protéines fluorescentes infrarouges, dont la protéine IFP 1.4 (Tableau 1) (Shu et al., 2009).

Ces dernières années, de nouvelles protéines aux propriétés photophysiques inhabituelles ont été développées. Ces protéines peuvent être activées soit pour initier l'émission de fluorescence à partir d'un état quiescent (photoactivation), soit pour convertir optiquement l'émission de fluorescence d'une bande spectrale vers une autre (photoconversion), soit la combinaison des deux états (photocommutation). La première protéine photoactivable (PA-GFP) découle d'une mutation dans la protéine GFP, conduisant à une augmentation de 100x de la fluorescence verte après irradiation avec une lumière UV (405 nm). Parmi les protéines photoconvertibles, les premières décrites possédaient une faible brillance et étaient souvent présentes sous forme d'oligomères. De nouveaux variants, tels que Dendra2 ou mEos, ont été développés, cependant ils présentent encore une faible efficacité de photoconversion (Lippincott-Schwartz et al., 2003; Rino et al., 2009; Adam et al., 2011; Shaner et al., 2007). Les protéines photocommutables sont les protéines fluorescentes les plus modulables et permettent de passer de façon irréversible du vert au rouge, et pour chaque couleur de passer de façon réversible d'un état allumé à un état éteint.



**Figure 4 Sites d'amplification artificiels permettant l'étude de la transcription en cellules vivantes**

A. Schéma d'un site d'amplification artificiel. Un gène rapporteur est sous l'influence d'un promoteur viral ou naturel, ce promoteur peut contenir des sites de liaison spécifiques pour certains facteurs de transcription, ou les sites peuvent être insérés en aval du point +1 de transcription. Les facteurs de transcription sont fusionnés à une protéine fluorescente et co-exprimés dans une lignée cellulaire contenant le site d'amplification. Le site actif devient alors visible en cellules vivantes par microscopie.

B. Le site MMTV et C. le site HIV sont constitués de promoteurs viraux contenant respectivement, des sites de liaison au récepteur au glucocorticoïde (GR) et au facteur de transcription NF-κB (κB). Les deux sites codent respectivement pour la protéine HA-ras, et la protéine CFP (Cyan Fluorescent Protein)

D. Site inductible à la tétracycline (TRE). Le répresseur de l'opéron lactose (Lac I) fusionné à une protéine fluorescente, reconnaît la séquence de l'opéron lactose et rend le site visible en fluorescence. Le site permet de visualiser à la fois l'ARNm via la séquence MS2 et la protéine finale CFP.

E. Le site prolactine contient le promoteur/amplificateur naturel de mammifère qui possède plusieurs sites de liaison à la prolactine (PRL). Il code pour la protéine dsRed2.

C'est le cas de la protéine Niji-FP (Figure 3) qui est capable de photocommutation avec une haute efficacité et une faible photofatigue, qui est le phénomène de perte de fluorescence associée à la répétition d'événements de photoconversion (Adam et al., 2011).

La révolution des protéines fluorescentes a permis la réalisation de multiples études de localisation, de dynamique, de fonction pour différents processus cellulaires (Day and Schaufele, 2005; Belmont, 2001; Giepmans et al., 2006).

## 2.2. Modèles d'amplification de gènes

L'analyse de la dynamique de facteurs de transcription en cellules vivantes, est réalisée : i) dans le nucléoplasme, ii) sur un site d'amplification artificiel, iii) sur un site d'amplification naturel. L'analyse dans le nucléoplasme permet d'obtenir des informations de dynamique moyenne résultant de la diffusion du facteur de transcription sous forme libre ou sous forme de complexe et de ses interactions spécifiques et non spécifiques avec l'ADN.

### 2.2.1. Les sites artificiels

Pour permettre l'analyse de la dynamique des facteurs de transcription et de la machinerie de transcription, plusieurs équipes ont développé au début des années 2000 des systèmes artificiels alliant conditions naturelles et contrôle de l'activité (Figure 4-A). Ces sites combinent des séquences promotrices bactériennes, virales ou de mammifères contenant de multiples sites de liaison aux facteurs de transcription, en aval de gènes rapporteurs pouvant coder pour des protéines fluorescentes. D'autres éléments peuvent être ajoutés pour permettre la détection des ARNm (séquences MS2). L'expression stable de ces constructions produit des lignées cellulaires contenant des sites multi-copies de ces constructions (Rafalska-Metcalf and Janicki, 2007).

#### 2.2.1.1. *pBPV-MMTV-LTR-ras (MMTV array)*

L'unité basique répétée du site MMTV/v-HA-ras « Mouse Mammary Tumour Virus/Harvey viral ras » est constituée du promoteur de la séquence terminale longue et répétée (LTR) du virus MMTV (~1kb) suivi d'un gène rapporteur HA-ras et de séquences additionnelles issues du papillomavirus bovin (BPV) (Figure 4-B). La formation du site MMTV dans la lignée cellulaire 3134 (dérivée d'une lignée cellulaire de souris C127) vient de l'intégration chromosomale et de l'amplification spontanée de l'épisome multi-copie de 9kb créant ainsi un site en tête-bêche de  $1,8 \cdot 10^6$  paires de bases (Kramer et al., 1999; Richard-Foy and Hager, 1987). Le promoteur MMTV contient naturellement six sites de liaisons pour le récepteur des glucocorticoïdes (GR) ainsi l'ensemble des 200 promoteurs MMTV, inclut 1200 sites de liaisons spécifiques (McNally et al., 2000). Dans les cellules 3134, le site MMTV est intégré sur la région A près du centromère du chromosome 4.

### *2.2.1.2. pHIV-LTR-CFP-SKL (site HIV)*

Le site d'amplification HIV contient le promoteur LTR du VIH, qui contient deux sites de liaison  $\kappa$ B, ciblé par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Figure 4-C). Il est cloné en amont d'un gène rapporteur CFP dirigé au peroxyosome par ajout du tripeptide SKL en position C-terminale. L'intégration de cette séquence dans un plasmide pSFV-dhfr permet au gène inductible par NF- $\kappa$ B de se répliquer dans le génome et de former des sites d'amplification en tandem. Le site est visible par la fusion du facteur de transcription NF- $\kappa$ B à une protéine fluorescente, et l'activité de transcription est visualisée par l'apparition de la protéine CFP. L'équipe de Natoli (Bosisio et al., 2006) a généré des clones cellulaires à partir de cette construction, l'un d'eux contient à peu près 2000 copies du gène.

### *2.2.1.3. Les sites lactose*

L'opérateur lactose, provient de l'opéron lactose des bactéries. Le répresseur de l'opéron lactose (Lac I) est exprimé constitutivement et se lie à l'opérateur lactose juste avant le point +1, empêchant ainsi la transcription des gènes responsables de la dégradation du lactose. En présence de lactose, le répresseur est inactivé par l'allolactose, un isomère du lactose, levant ainsi la répression de la transcription. En 2000, l'équipe de Spector, a développé un plasmide contenant 256 copies de l'opérateur lactose fusionné à 96 copies de l'élément de réponse à la tétracycline (TRE) en amont du promoteur minimal CMV (Figure 4-D). Cette séquence promotrice permet la transcription d'un gène rapporteur CFP fusionné à la séquence de localisation dans le peroxyosome et suivi de l'intron de la  $\beta$ -globin (Tsukamoto et al., 2000). En 2004 la même équipe, a amélioré ce plasmide pour permettre la visualisation de la synthèse des ARNm. Pour cela ils ont inséré 24 copies de l'opérateur traductionnel reconnu par la réplicase virale du bactériophage MS2 (19 nucléotides formant une boucle) après le gène rapporteur et la séquence SKL. Ce nouveau plasmide a ensuite été intégré dans des cellules humaine U2OS, générant ainsi des lignées stables exprimant cette construction, l'une de ces lignée (U2OS 2-6-3) contient 200 copies de ce plasmide dans la région euchromatique 1p36.

En utilisant cette construction, Janicki et al. (2004), ont étudié la décondensation de la chromatine après activation de la transcription. A l'état inactif, la chromatine du locus est condensée, formant un foyer de  $0,89 \pm 0,12 \mu\text{m}$ . Le locus est enrichi en marque H3K9 et en protéine hétérochromatique 1 (HP1), confirmant l'état hétérochromatique du locus. Après activation, la chromatine est décondensée formant un foyer de 2 à 4,5  $\mu\text{m}$ , les protéines HP1 sont absentes et l'histone H3 est remplacée par le variant H3.3 (Janicki et al., 2004).

D'autres types de sites utilisant l'opérateur lactose ont été générés. Ils sont formés par des chromosomes bactériens artificiels (BAC) contenant un gène naturel complet inductible (hsp70, dhfr, métallothionéine), un gène de sélection et une insertion de 256 opérateurs lactose. L'insertion stable de ces transgènes dans une lignée exprimant la protéine LacO-GFP permet la visualisation des gènes d'intérêt. Ces sites ont été utilisés pour analyser la décompaction et les mouvements de la chromatine induits par l'activation de la transcription (Hu et al., 2009), ainsi que l'association après activation du gène hsp70 aux « speckles », lieu de synthèse et maturation des ARNs (Hu et al., 2010).

#### *2.2.1.4. pX-PRLdsRed2-SKL (site prolactine)*

Les régions promotrices à courte (promoteur) et à longue distance (amplificateur) de la prolactine de rat contiennent des éléments régulateurs de mammifères qui sont capables de lier le récepteur à l'œstrogène et le régulateur Pit-1 (Figure 4-E). L'unité de base comprend un gène rapporteur : la protéine fluorescente dsRed2 fusionnée au peptide de localisation dans le peroxyosome (SKL) sous l'influence de la région promotrice du gène de la prolactine (-66, +1) contenant un site Pit-1. L'amplificateur « enhancer » de la prolactine (-1807, -1498) est fusionné juste en amont du promoteur de la prolactine, cet amplificateur contient quatre sites de liaison Pit-1 et cinq éléments de liaison à l'œstrogène (ERE). Des étapes de clonages répétés et de recombinaison ont permis d'obtenir des plasmides contenant de multiples répétitions de l'unité de base (13x, 26x, 52x, 104x). Le plasmide contenant 52 répétitions de l'unité de base a été intégré dans des cellules HeLa formant dans ces cellules un point unique localisable en fusionnant le récepteur à l'œstrogène à une protéine fluorescente (Sharp et al., 2006).

#### *2.2.2. Les sites naturels*

Les sites d'amplification naturels représentent 14% de l'ensemble des gènes du génome des vertébrés et 10,9% du génome de l'homme, mais la plupart sont limités à seulement deux gènes (65,4% chez l'homme). Ces amplifications sont dues à trois phénomènes principaux : recombinaison inégale, rétroposition et duplication segmentale. La recombinaison inégale résulte d'un mauvais alignement de chromosomes suivi d'un échange de matériel d'ADN entre deux régions non-homologues. La rétroposition consiste en une transcription inverse de l'ARNm suivi d'une insertion dans la double hélice d'ADN dans une région en général assez éloignée du gène d'origine. La duplication segmentale, moins fréquente chez les vertébrés, ne contient pas en général de gènes (Pan and Zhang, 2008).

### *2.2.2.1. Les gènes ribosomaux dans le nucléole*

Dans le noyau, le sous-compartiment le plus important est le nucléole. Il est formé autour d'un ensemble de gènes répétés en tandem qui codent pour les pré-ARN ribosomaux. Le nucléole est aussi composé d'éléments nécessaires pour le processus de transcription : système de repliement, de maturation, de modification et d'assemblage des pré-ARNr. Tous ces éléments s'associent avec l'ARN et font ainsi partie intégrante du nucléole. Les gènes ribosomaux sont transcrits à l'intérieur du nucléole par l'ARN polymérase I, qui s'accumule sur des « usines » nucléolaires de transcription et deviennent ainsi visibles en microscopie (Gorski et al., 2008).

### *2.2.2.2. Le locus CUP1 de la levure *S.cerevisiae**

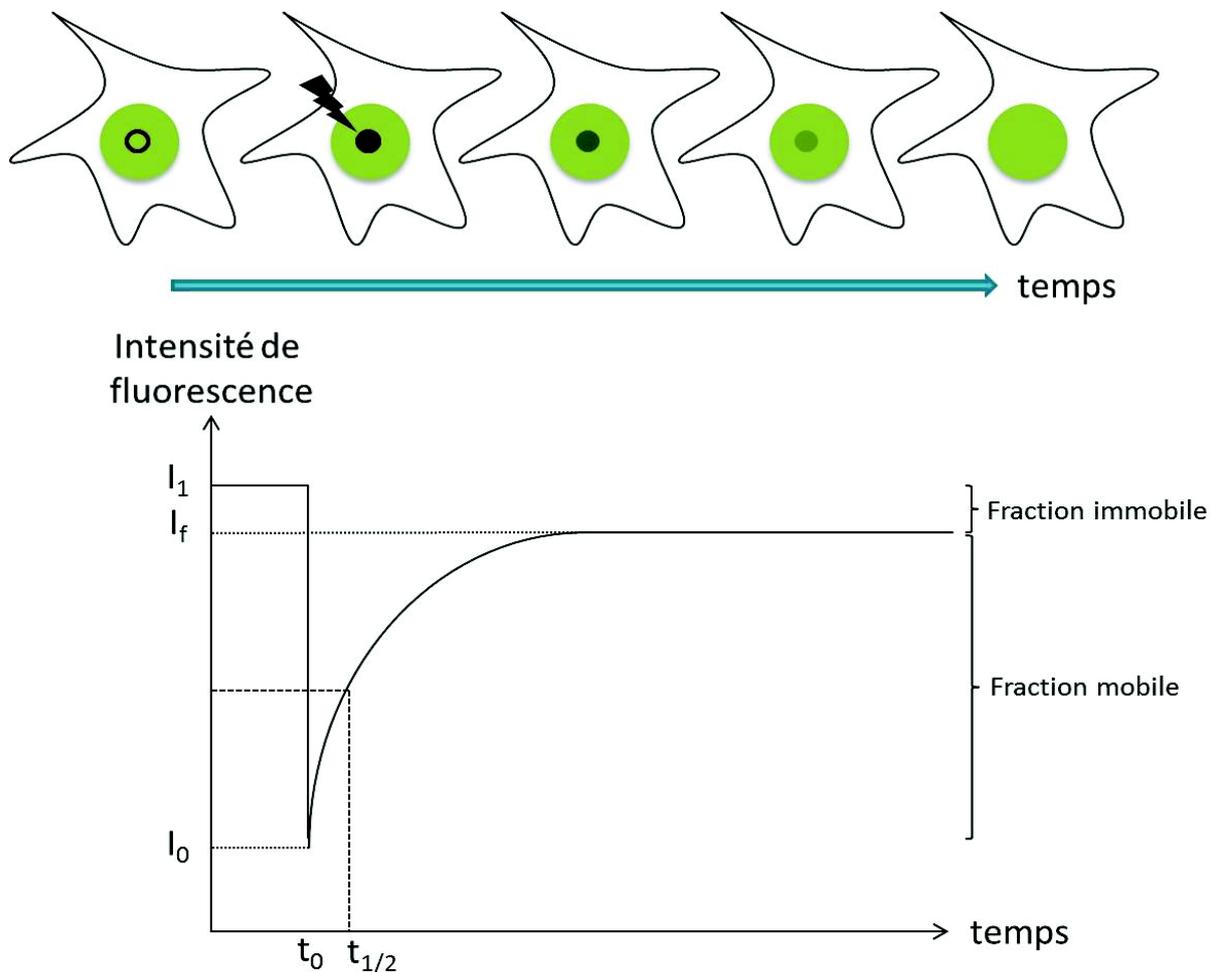
Le locus CUP1 existe sous la forme d'un petit site d'amplification naturel, de 10 copies répétées en tandem, transcrit par l'ARN polymérase II. La transcription est assurée par la liaison d'un activateur transcriptionnel Ace1, qui se lie au promoteur de CUP1 en présence de cuivre et active sa transcription. La fusion d'Ace1 à trois copies de la protéine GFP permet une visualisation du site CUP1 en cellule vivante. (Karpova et al., 2008)

### *2.2.2.3. Les chromosomes polyténiques de drosophile*

Les cellules polyténiques de drosophile se sont révélées être un bon système pour l'étude de la dynamique de la transcription en cellules vivantes. Pendant le développement larvaire de la drosophile, les chromosomes interphasiques subissent, dans les cellules des glandes salivaires, une endoréplication, c'est-à-dire une réplication de l'ADN sans division cellulaire sur environ 10 cycles. Ce phénomène résulte en la formation de noyaux géants avec des chromosomes polyténiques, contenant environ 1024 copies d'ADN juxtaposées. L'hétérochromatine et l'euchromatine forment des bandes uniques et deviennent ainsi visibles au microscope. Le motif particulier des bandes a été répertorié et nommé par Calvin Blackman Bridges et a été utilisé comme marqueur pour la localisation cytogénétique de gènes individuels. Les « puffs » correspondent à des régions relâchées de l'euchromatine, dans lesquelles l'activité de transcription est importante (Darzacq et al., 2009).

Pour étudier la dynamique de facteurs de transcription, les glandes salivaires sont disséquées et cultivées dans un milieu pour cellules d'insecte (Grace's insect medium), puis observées sous microscope. Dans ces conditions, les cellules restent viables pendant au moins deux heures. Quand les cellules sont conservées à température ambiante, les gènes impliqués dans le développement continuent de s'exprimer.

Le suivi des facteurs de transcription à l'intérieur de ces cellules nécessite cependant l'emploi de techniques de microscopie appropriées en raison de l'épaisseur du tissu. Ainsi les équipes de Watt



**Figure 5 Principe du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)**

Le FRAP consiste à photoblanchir les molécules fluorescentes à l'intérieur d'une région (cercle et éclair noir), et à suivre le retour de fluorescence dans cette région au cours du temps. La courbe de recouvrement est obtenue en traçant l'intensité de fluorescence au cours du temps. Cette courbe donne plusieurs informations : présence ou non d'une fraction immobile/lente et son importance et temps de demi recouvrement qui correspond au temps à la mi-hauteur de recouvrement.

W. Webb et John T. Lis, ont utilisé un microscope de fluorescence à excitation bi-photonique pour observer les glandes salivaires. L'excitation bi-photonique n'a lieu qu'à proximité du point focal, ainsi aucun pinhole n'est nécessaire pour éliminer la fluorescence hors focus (Yao et al., 2008).

### **2.3. Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)**

#### **2.3.1. Principe**

Développée au cours des années 70, la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment repose sur les propriétés photophysiques des molécules fluorescentes, notamment le photoblanchiment. Par une impulsion laser de forte intensité, il est possible d'éteindre irréversiblement les protéines fluorescentes sans toucher à l'activité de la protéine d'intérêt. En illuminant sélectivement les protéines d'un petit volume à l'intérieur d'un volume plus grand, il est possible de suivre, au cours du temps, le recouvrement de la fluorescence dû à la mobilité des molécules (Figure 5). Pour des comparaisons simples il est possible d'évaluer les courbes de FRAP grâce au temps de demi-récupération ( $t_{1/2}$ ), cependant cette mesure permet d'obtenir des informations uniquement sur la mobilité globale de la protéine et est dépendante de multiples paramètres expérimentaux.

Pour obtenir plus de détails sur la dynamique des protéines, il est nécessaire d'utiliser des modèles analytiques sophistiqués, pour estimer les constantes de diffusion, la proportion relative de fractions libres et liées, les temps de résidence, les vitesses effectives d'association et de dissociation. A part les paramètres extractibles à partir des courbes de FRAP, le choix et la mise en œuvre des modèles nécessitent de prendre en compte des paramètres fixes représentant les propriétés du microscope (forme et intensité du faisceau laser), les propriétés du noyau (forme et taille du noyau, distribution de la protéine d'intérêt) et les paramètres expérimentaux (taille, forme de la zone de photoblanchiment, durée du photoblanchiment, perte de fluorescence induite par le photoblanchiment des protéines lors du photoblanchiment ou lors de la phase d'acquisition) (van Royen et al., 2011).

En FRAP, les phénomènes de liaison à l'ADN ont été mis en évidence en comparant les récupérations de la GFP seule, à celle de protéines de fusion. En condition normale, la GFP récupère en moins d'une seconde, alors que certaines protéines récupèrent en plusieurs secondes voire minutes. De telles différences ne sont pas dues à la masse des protéines seules car cette dernière n'a que peu d'effet sur la constante de diffusion et sur les temps de récupération. Pour l'analyse, il existe deux cas de figures majeures en fonction de la limitation ou non induite par la diffusion (Sprague and McNally, 2005; McNally, 2008; Klein and Waharte, 2010).

L'ensemble des modèles d'ajustement des données de FRAP décrit ci-dessous sont valables pour des régions de photoblanchiment uniforme circulaires et après normalisation des courbes entre 0, valeur minimale de l'intensité de fluorescence dans la zone de photoblanchiment et 1, intensité maximale pouvant être atteinte à un temps infini.

### 2.3.2. Modèle de diffusion pure

Lorsque la protéine de fusion ne se lie pas à un élément immobile, on se trouve dans un cas de diffusion pure. Il est alors possible d'ajuster la courbe de FRAP pour obtenir la constante de diffusion de la molécule d'intérêt en utilisant l'équation suivante :

$$(1) \text{frap}(t) = e^{-\frac{2\tau_D}{t}} \left[ I_0 \left( \frac{2\tau_D}{t} \right) + I_1 \left( \frac{2\tau_D}{t} \right) \right]$$

Avec  $I_0$  et  $I_1$  les fonctions modifiées de Bessel de premier ordre. La constante de diffusion  $D$  peut être déterminée avec  $\tau_D = \omega^2/4D$ , où  $\omega$  est le rayon de la zone de photoblanchiment (Soumpasis, 1983; McNally, 2008; Klein and Waharte, 2010; Sprague et al., 2004).

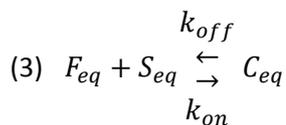
En faisant l'hypothèse que les protéines étudiées sont sous forme globulaire, la constante obtenue peut être comparée à celle calculée à partir de la constante de la protéine eGFP :

$$(2) D_{prot} = D_{GFP} \left( \frac{M_{GFP}}{M_{prot}} \right)^{1/3}$$

$M$  est la masse moléculaire soit de la protéine eGFP (27 kDa) soit de la protéine d'intérêt. Si la constante obtenue diffère de celle calculée, il est possible que la protéine d'intérêt diffuse sous la forme d'un complexe protéique, il est alors possible de déterminer la masse approximative de ce complexe.

### 2.3.3. Modèle de diffusion effective

Les données de FRAP peuvent parfois être ajustées avec un modèle de diffusion, même si la protéine de fusion est capable de diffuser et d'interagir avec l'ADN selon la réaction suivante :



Avec  $F_{eq}$  les protéines libres,  $S_{eq}$  les sites de liaisons libres,  $C_{eq}$  les protéines liées,  $k_{on}$  la constante de vitesse d'association et  $k_{off}$  la constante de vitesse de dissociation.

Dans le cas de la diffusion effective, le temps de liaison est rapide comparé au temps de diffusion. L'équation (1) ne permet plus d'obtenir une constante de diffusion pure, mais une constante de

diffusion effective. Cette constante peut être utilisée pour déterminer le rapport des constantes de vitesse d'association et de dissociation par  $\frac{k_{on}^*}{k_{off}} = \left(\frac{D_{prot}}{D_{eff}}\right) - 1$ .  $D_{prot}$  est obtenue à l'aide de l'équation (2) et  $k_{on}^*$  est une pseudo constante de vitesse d'association dépendante de la concentration en site de liaison libre définie par :  $k_{on}^* = k_{on} \times S_{eq}$  (Sprague et al., 2004; McNally, 2008).

#### 2.3.4. *Modèle à réaction dominante*

Le modèle de réaction dominante s'applique dans le cas où le temps de diffusion est très rapide et non limitant par rapport au temps nécessaire pour la liaison. La courbe de FRAP est composée de deux phases, la première, rapide, correspond à la diffusion, la seconde plus lente, à la phase de liaison. La réaction de liaison décrite par l'équation (3), peut être résolue avec une simple équation exponentielle dépendante de la constante de vitesse de dissociation ( $k_{off}$ ) et de la concentration en protéine liée ( $C_{eq}$ ) :

$$(4) \text{ frap}(t) = 1 - C_{eq}e^{-k_{off}t}$$

La fraction liée et la fraction libre peuvent être obtenues par

$$C_{eq} = \frac{k_{on}^*}{k_{on}^* + k_{off}} \text{ et } F_{eq} = 1 - C_{eq} = \frac{k_{off}}{k_{on}^* + k_{off}} \text{ (Sprague et al., 2004; McNally, 2008).}$$

S'il existe plusieurs sites de liaisons, les données doivent être ajustées avec l'équation suivante :

$$(5) \text{ frap}(t) = 1 - Ae^{-k_{1off}t} - Be^{-k_{2off}t}.$$

#### 2.3.5. *Modèle analytique de diffusion et interaction*

Lorsque le processus de diffusion est néanmoins accessible à la mesure FRAP, il faut en tenir compte au niveau du modèle. Le modèle complet analytique résulte de la combinaison des équations pour le modèle de diffusion (1) et pour le modèle d'interaction (4) (Michelman-Ribeiro et al., 2009):

$$(6) \text{ frap}(t) = F_{eq} \left( e^{-\frac{2\tau_D}{t}} \left[ I_0\left(\frac{2\tau_D}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau_D}{t}\right) \right] \right) + (1 - F_{eq})e^{-k_{off}t}$$

#### 2.3.6. *Modèle numérique de diffusion et interaction*

Le modèle complet est utilisé dans les cas où le temps d'association à un site de liaison est comparable au temps nécessaire pour la diffusion. Si aucun des deux processus ne peut être ignoré ou simplifié il n'existe pas d'expression analytique pour les courbes de FRAP. Cependant en utilisant la transformée de Laplace il est possible de résoudre numériquement les courbes. La solution en transformée de Laplace est décrite comme suit :

$$(7) \overline{frap(p)} = \frac{1}{p} - \frac{F_{eq}}{p} (1 - 2K_1(q\omega)I_1(q\omega)) \times \left(1 + \frac{k_{on}^*}{p+k_{off}}\right) - \frac{C_{eq}}{p+k_{off}}$$

Avec  $p$ , la variable de Laplace conjuguée au temps,  $\omega$  le rayon du spot de photoblanchiment,  $I_1$  et  $K_1$  sont les fonctions de Bessel de premier et second ordre, le terme  $(q\omega)$  est défini par :

$$(8) (q\omega)^2 = \frac{p\omega^2}{D_f} \left(1 + \frac{k_{on}^*}{p+k_{off}}\right).$$

Des courbes théoriques peuvent être générées informatiquement en utilisant des logiciels tels que Mathematica ou Matlab, en variant les paramètres de constante de vitesse d'association, de dissociation et de diffusion. Les courbes théoriques sont ensuite comparées aux courbes (McNally, 2008; Sprague et al., 2004).

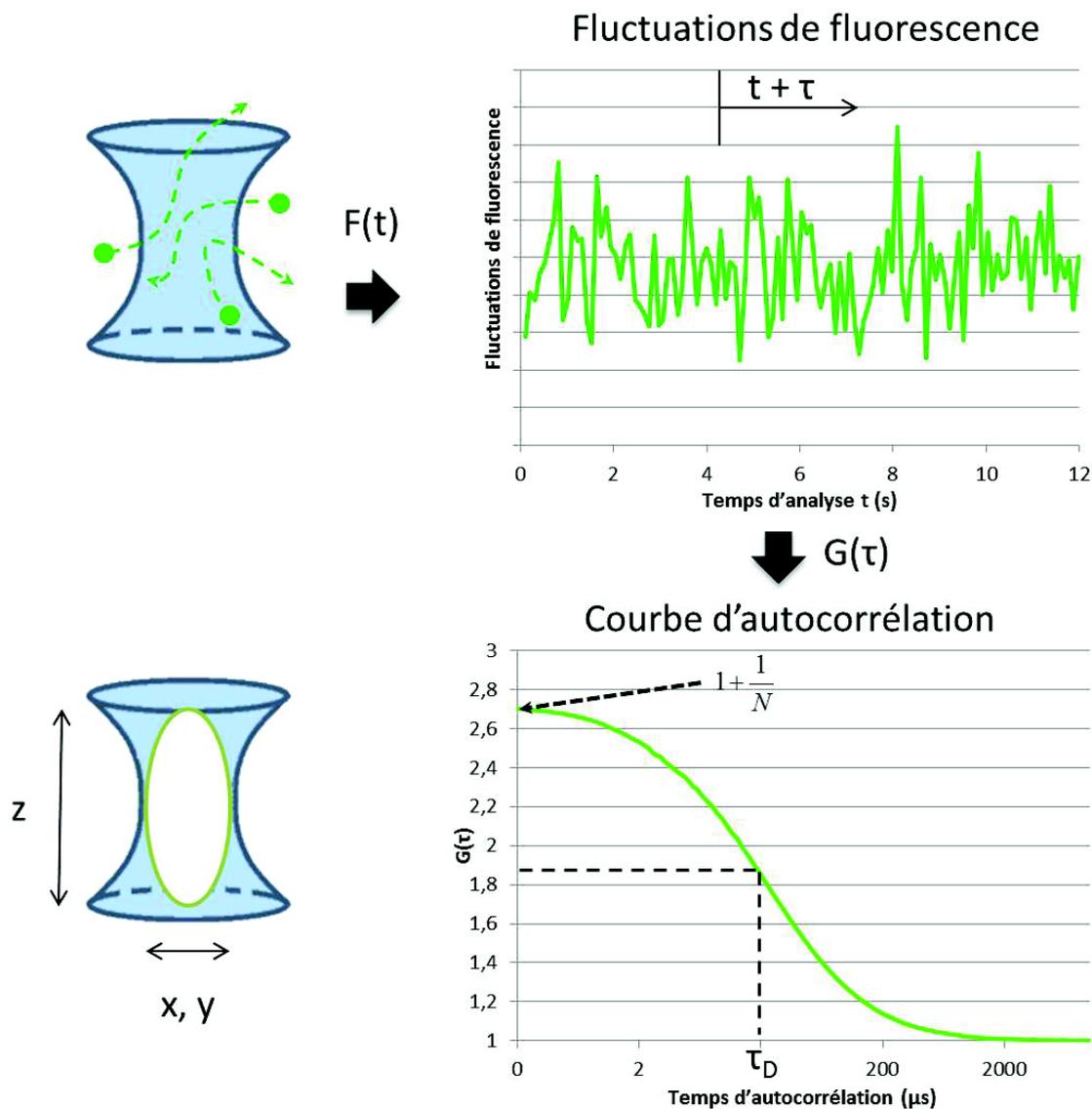
### ***2.3.7. Conclusion sur les modèles d'analyses de FRAP***

En FRAP de multiples erreurs peuvent provenir des différents modes d'acquisition ainsi que des modèles utilisés lors de l'analyse. Il faut ainsi prendre en considération la géométrie de la région d'analyse (finie, infinie, ...), les conditions d'acquisition (forme de la région de photoblanchiment, durée, ...), le caractère de la diffusion (instantanée, simple ou anormale), le nombre de sites de liaison, leur distribution et le caractère de la réaction (simple, séquentiel, complexe) (Mueller et al., 2010; Mueller et al., 2008; Beaudouin et al., 2006).

### ***2.3.8. Méthodes dérivées du FRAP***

D'autres techniques dérivées du FRAP ont été développées et permettent de mesurer ou de suivre différents événements. La technique de perte de fluorescence au cours d'un photoblanchiment local (FLIP) consiste à photoblanchir de façon répétée une région cellulaire définie, l'intensité de fluorescence étant mesurée en parallèle dans des régions d'intérêt distantes de la région de photoblanchiment. Cette technique permet de mesurer le déplacement des molécules des régions d'intérêt vers la région photoblanche. Le FRAP inverse consiste à photoblanchir l'intégralité d'une cellule ou d'une sous-structure cellulaire, à l'exception d'une région d'intérêt et de suivre la perte de fluorescence à l'intérieur de cette région. Cette technique permet d'obtenir des informations sur la mobilité et le temps de résidence de la protéine marquée dans la région d'intérêt (Day and Schaufele, 2005). Cependant, le temps nécessaire au photoblanchiment de telles régions devient considérable, et cette technique ne peut s'appliquer que pour des protéines avec des cinétiques lentes (Rino et al., 2009).

L'utilisation de protéines fluorescentes photoactivables ou photoconvertibles permet de passer outre cette limitation. Pour étudier la dynamique des protéines, il est possible « d'allumer » les protéines d'une région d'intérêt et ainsi identifier et suivre au cours du temps cette population



**Figure 6 Principe de la spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)**

La FCS consiste à mesurer les fluctuations de fluorescences à l'intérieur d'un petit volume confocal, défini par les dimensions  $x$ ,  $y$  et  $z$ . Les intensités de fluorescence  $F(t)$  sont ensuite corrélées aux temps  $t + \tau$ , ce qui permet d'obtenir une courbe d'autocorrélation  $G(\tau)$ . De cette courbe deux informations principales sont obtenues : le nombre de molécules passant à travers le volume confocal ( $N$ ) et le temps de diffusion, correspondant approximativement au temps à la mi-hauteur de la courbe ( $\tau_D$ ), lorsque la molécule diffuse librement.

spécifique. Comme la fluorescence ne provient que des protéines activées, les protéines nouvellement synthétisées n'interfèrent pas lors de l'analyse des données (Lippincott-Schwartz et al., 2003; Rino et al., 2009).

## 2.4. La spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) et ses variantes

### 2.4.1. Principe

La spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) a été développée au début des années 70, à partir de la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Le principe de la FCS est de corréler les fluctuations de fluorescence au cours du temps dans un système à l'équilibre thermodynamique. Les fluctuations de fluorescence proviennent des mouvements des molécules fluorescentes (entrée et sortie) à l'intérieur du volume confocal ( $0,1\mu\text{m}^3$  ou 0,1 femtolitre). Ces fluctuations peuvent être quantifiées en réalisant une autocorrélation temporelle de l'intensité de fluorescence enregistrée (Figure 6). La courbe d'autocorrélation (ACF) ainsi obtenue est définie par:

$$(9) \quad G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1$$

Avec  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ ,

avec  $\langle F(t) \rangle = \overline{F(t)}$ , la moyenne de fluorescence et

$\delta F(t)$  les fluctuations de fluorescence du signal  $F(t)$ .

La courbe d'autocorrélation permet de quantifier l'auto-similitude d'un signal après un décalage donné  $\tau$  et reflète la probabilité qu'une molécule passant à travers le volume confocal en  $t$  y soit encore aux temps  $t$  et  $t + \tau$ . Ainsi, aux faibles valeurs de  $\tau$ , la valeur de  $G(\tau)$  est maximale. Lorsque  $\tau$  augmente, l'ACF tend vers la valeur minimale de 1, plus ou moins vite en fonction du temps de résidence de la molécule à l'intérieur du volume confocal. En d'autres termes, la probabilité qu'une même protéine fluorescente se trouve à l'instant  $t$  et  $t + \tau$ , dans le volume confocal est forte quand  $\tau$  est petit et diminue quand  $\tau$  augmente, en fonction de la mobilité de la protéine étudiée. (Ferrand et al., 2011; Ries and Schwille, 2012; Haustein and Schwille, 2007; Elson, 2011).

Comme les fluctuations de fluorescence deviennent petites lorsque le nombre de molécules augmente, il est important de minimiser le nombre moyen de molécules dans le volume confocal entre 0,1 et 500. Les concentrations correspondantes vont de l'ordre du nano- au micromolaire ( $10^{-10}$  à  $10^{-6}\text{M}$ ) (Haustein and Schwille, 2007).

### 2.4.2. Modèles

Les courbes d'autocorrélation sont ajustées selon différents modèles. Le choix du modèle dépend du système biologique étudié. Par exemple un modèle de diffusion en 2D sera utilisé pour une protéine membranaire et un modèle de diffusion 3D pour une protéine nucléaire ou cytoplasmique. Un modèle de diffusion libre à un ou plusieurs composants est toujours bien adapté aux mesures en solution, par contre un modèle de diffusion et interaction peut être utile en cellules vivantes quand l'un des partenaires est fixe, comme dans les cas de liaison à l'ADN.

#### 2.4.2.1. Modèle de diffusion libre 3D

L'expression analytique de l'ACF peut être étendue à une large variété de processus physique. Dans le cas d'une espèce diffusant librement en 3D l'ACF est :

$$(10) G_{3D}(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + S^2 \frac{\tau}{\tau_D}}} \right)$$

Avec N, le nombre de molécules dans le volume confocal,  $\tau_D$ , le temps de résidence moyen de la molécule à l'intérieur du volume confocal, et S un paramètre qui rend compte de l'allongement du volume confocal, défini par  $S = \omega_{xy}/\omega_z$ , avec  $\omega_{xy}$  est le rayon transversal et  $\omega_z$  la mi-hauteur axiale du volume confocal.

L'un des avantages de la FCS est la possibilité de déterminer la concentration de la molécule d'intérêt. L'amplitude de l'ACF est inversement proportionnelle au nombre moyen de molécules à l'intérieur du volume d'observation. Le nombre de molécules est la valeur de  $G(\tau)$  lorsque  $\tau$  tend vers 0, ce qui correspond à l'ordonnée à l'origine :

$$(1) G(0) = 1 + \frac{1}{N} = 1 + \frac{1}{V_{eff} \cdot C}.$$

Avec C, la concentration en molécule.

La constante de diffusion ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ) d'une molécule est obtenue à partir du temps de diffusion, par

$$(2) D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_D}$$

La constante de diffusion est une constante physicochimique, alors que le temps de diffusion est lié à l'instrumentation et dépend de du volume confocal.

La taille et la forme du volume de détection, données par les valeurs  $\omega_{x,y}$  et  $\omega_z$  sont déterminées en utilisant des standards de calibration tels que la Rhodamine-6G, de constante de diffusion

connue. Le volume effectif de détection est défini par  $V_{eff} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z$ , dans le cas où le volume confocal est approximé par une gaussienne à trois dimensions.

#### 2.4.2.2. Calcul théorique de la constante de diffusion

La constante de diffusion peut être déterminée théoriquement pour une protéine globulaire à partir du rayon hydrodynamique  $R_h$  et la viscosité du microenvironnement  $\eta_V$ , grâce à l'équation de Stokes-Einstein :

$$(3) \quad D = \frac{\kappa T}{6\pi\eta_V R_h}$$

Avec T la température et  $\kappa$  la constante de Boltzmann (Ferrand et al., 2011; Ries and Schwille, 2012). La constante de diffusion dépend de la racine cubique de la masse moléculaire, la technique de FCS est peu sensible à des changements de masse moléculaire faible. Par exemple un temps de diffusion multiplié par deux correspond à une masse moléculaire multipliée par huit. La FCS peut cependant servir pour l'étude d'interactions protéine/protéine qui sont souvent accompagnées de changements importants de taille (Zorrilla et al., 2008). D'autres modèles existent pour des molécules de formes différentes, par exemple de forme allongée comme pour des oligonucléotides.

#### 2.4.2.3. Analyse des triplets

Les fluctuations de fluorescence ne proviennent pas uniquement de la diffusion de la molécule à l'intérieur du volume confocal, mais aussi de dynamiques internes telles que la rotation du fluorophore, ou des fluctuations photophysiques notamment due à la population de l'état triplet résultant de l'excitation du fluorophore. L'ACF peut s'écrire :

$$(4) \quad G(\tau) = G_{diff}(\tau) \cdot G_{trip}(\tau)$$

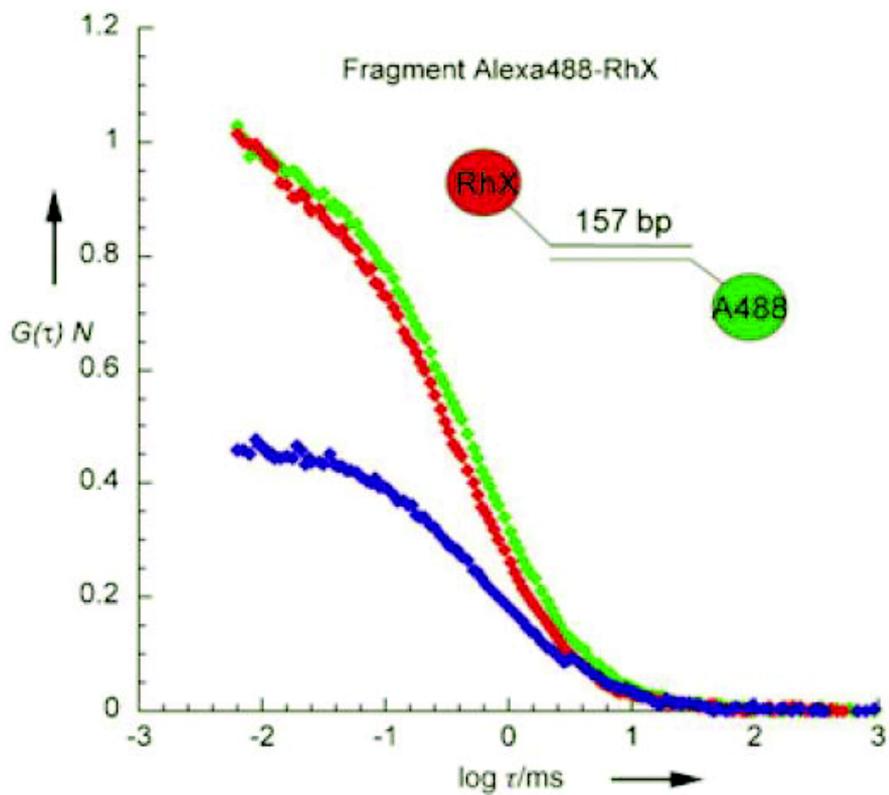
Le clignotement de l'état triplet peut être décrit par :

$$(5) \quad G_{trip} = 1 + \frac{T}{1-T} e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}$$

T est la fraction de molécule à l'état triplet et  $\tau_T$ , la durée des fluctuations de fluorescence de l'état triplet (Ferrand et al., 2011; Haustein and Schwille, 2007).

#### 2.4.2.4. Modèle de diffusion effective

Dans certains cas les données peuvent s'ajuster avec un modèle à une composante diffusant librement, mais avec des valeurs de D qui peuvent paraître très faibles. C'est le cas quand la molécule d'intérêt subit de multiples événements de liaison/décrochage avant de sortir du



**Figure 7** Courbe d'autocorrélation et de corrélation croisée de fluorescence

En rouge et en vert, courbes d'autocorrélation normalisées ( $G(t) N$ ) des molécules fluorescentes rouges et vertes. En Bleu courbe de corrélation croisée des molécules rouges et vertes. Comme les deux oligonucléotides s'hybrident, un signal de corrélation croisée est observé. (D'après Baudendistel, et al., 2005).

volume de mesure, ou quand le temps de diffusion est plus grand que le temps d'association ( $\tau_D \gg \frac{1}{k_{on}^*}$ ). Dans ce cas le temps de diffusion  $\tau_D$  devient un temps de diffusion effectif  $\tau_{Defeff}$  qui permet de déterminer la constante de diffusion effective  $D_{eff}$  et le rapport  $\frac{k_{on}^*}{k_{off}}$  par  $D_{eff} = \frac{D_{prot}}{1+(k_{on}^*/k_{off})}$  (Michelman-Ribeiro et al., 2009; Mazza et al., 2012).

#### 2.4.2.1. *Modèle de diffusion à deux composants*

Dans certains cas, l'ajustement avec un modèle à un composant ne peut être considéré comme satisfaisant. L'ACF peut alors être complexifiée par l'ajout d'un deuxième composant diffusant librement en 3D. La deuxième partie de l'équation (11) devient alors la somme de deux composants, avec  $\tau_{D,1}$ ,  $\tau_{D,2}$ ,  $\rho$  et  $(1-\rho)$ , respectivement les temps de diffusion et les fractions de chacun des composants (Mazza et al., 2012). Ce modèle produit généralement de meilleurs ajustements dus au nombre de paramètres plus importants, il faut cependant porter attention aux résultats obtenus pour attester du sens de l'ajustement.

#### 2.4.2.2. *Modèle de diffusion et interaction*

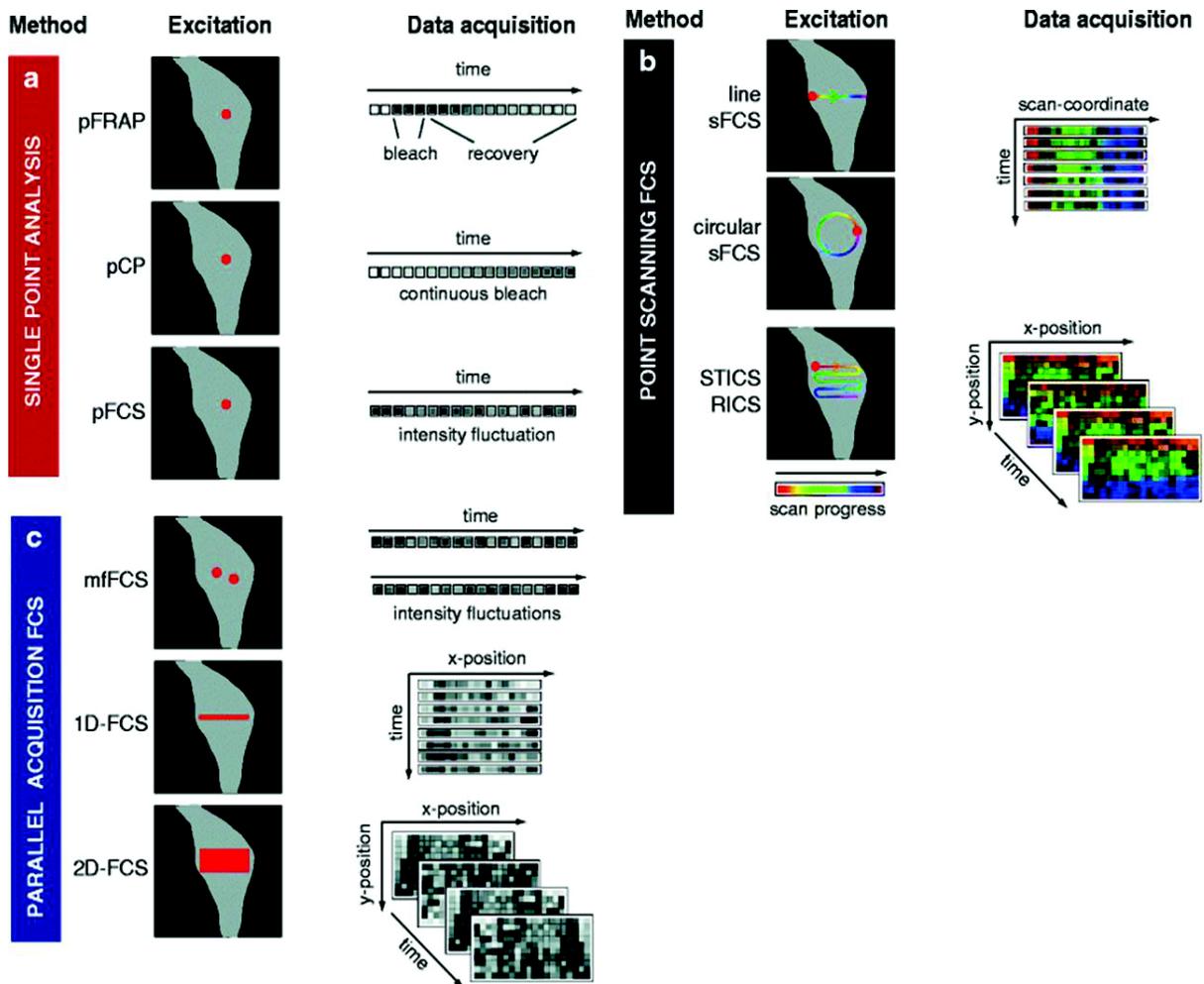
Comme en FRAP, il existe des modèles qui permettent de quantifier en FCS les phénomènes de diffusion et interaction. Un des modèles est celui de réaction dominante, qui peut être appliqué quand le temps de diffusion est plus court que le temps nécessaire à l'association ( $\tau_D \ll 1/k_{on}^*$ ), l'ACF peut s'écrire ainsi :

$$(6) \quad G(t) = 1 + \frac{1}{N} \left( F_{eq} \left( 1 + \frac{t}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{t}{\omega^2 \tau_D} \right)^{-1/2} + C_{eq} e^{-k_{off} t} \right)$$

Avec  $C_{eq} = \frac{k_{on}^*}{k_{on}^* + k_{off}}$  et  $F_{eq} = 1 - C_{eq} = \frac{k_{off}}{k_{on}^* + k_{off}}$  (Michelman-Ribeiro et al., 2009).

#### 2.4.3. *La spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence*

Une autre variante de la FCS, la spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence (FCCS), consiste à utiliser des protéines spectralement séparées pour visualiser des processus biologiques d'interactions entre ces protéines. Si les protéines sont liées, elles co-diffusent dans le volume confocal, on observe alors les mêmes fluctuations du signal fluorescent dans les deux canaux de détection (deux couleurs). Les résultats sont présentés sous la forme d'au moins trois courbes d'autocorrélation, l'ACF du premier canal (vert), l'ACF du deuxième canal (rouge) et la courbe de corrélation croisée d'un canal vers l'autre (vert -> rouge et/ou inversement) (Figure 7). C'est ce signal de corrélation croisée qui augmente lorsque les fluctuations simultanées des deux molécules sont détectées dans les deux canaux (Bacia et al., 2006).



**Figure 8 Variantes de la FCS**

Pour l'analyse de la dynamique de protéines, il existe de multiples techniques dérivées du FRAP ou de la FCS. Les analyses peuvent être réalisées en un point de l'échantillon (a), en plusieurs points par balayage laser (b) ou par acquisition simultanée (c). (a) En un point, la FRAP ou le photoblanchiment continu (pCP) nécessite une perturbation temporaire ou continue du système. La FCS analyse les fluctuations de fluorescence. (b) Des techniques permettent de réaliser des balayages selon des formes géométriques variées (sFCS, STICS, RICS), le temps de balayage est pris en compte dans l'analyse et permet d'obtenir des informations de dynamique dans l'espace et à différentes échelles temporelles. (c) Les acquisitions en parallèles reposent sur des profils d'illumination variés (mfFCS, 1D, 2D-FCS) et sur une détection simultanée. (Adaptée de Erdel et al., 2011).

L'amplitude relative du signal de corrélation croisée par rapport au signal d'une des autocorrélations est une mesure directe de la liaison :  $C_{RG}/C_{G,t} = G_{0,x}/G_{0,r}$  et  $C_{RG}/C_{R,t} = G_{0,x}/G_{0,g}$ . Avec  $C_{RG}$ , la concentration de l'espèce doublement marquée,  $C_{G,t}$  et  $C_{R,t}$ , la concentration de la totalité des espèces « vertes » et « rouges »,  $G_{0,x}$ ,  $G_{0,g}$  et  $G_{0,r}$ , l'amplitude, respectivement de la corrélation croisée, de l'autocorrélation du canal vert et de l'autocorrélation du canal rouge. Cette relation est uniquement vraie si les espèces sont marquées de façon uniforme, si la stœchiométrie de liaison est de l'ordre 1:1 et si les volumes de détection des deux canaux se recouvrent parfaitement (Bacia and Schwille, 2007). La technique de FCCS étant très sensible, il est important d'utiliser des fluorochromes ou protéines fluorescentes spectralement bien séparés, pour éviter que le signal de corrélation croisée ne soit dû au passage du signal d'un fluorochrome dans le canal de détection du second. La technique de FCCS a été notamment utilisée pour détecter des interactions moléculaires, mais aussi pour suivre des clivages enzymatiques, et des colocalisations dynamiques au cours de trafic intracellulaire (Bacia and Schwille, 2007; Bacia et al., 2006; Baudendistel et al., 2005).

#### ***2.4.4. Au-delà de la FCS traditionnelle***

De multiples variantes de la méthode classique ont été développées au cours des dernières années. Ces variantes permettent de dépasser certaines des limitations de la FCS conventionnelle. Ainsi l'excitation bi-photonique ou l'illumination STED (déplétion par émission stimulée) permet d'obtenir de fins volumes d'observation bien définis évitant ainsi le photoblanchiment hors champs. Ces fins volumes sont requis pour analyser des interactions faibles entre molécules nécessitant une forte concentration. Pour les études sur membrane, l'illumination TIRF (fluorescence par réflexion totale interne) permet d'exciter uniquement les molécules situées à une profondeur maximale de 200nm, éliminant ainsi la fluorescence provenant de l'intérieur de la cellule.

D'un point de vue matériel, le détecteur conventionnel qu'est la photodiode à avalanche (APD) peut être remplacé par des détecteurs GaAsP ou des caméras ultra-sensibles EMCCD (Electron Multiplied Charge Coupled Device) ou CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor). Ces détecteurs sont capables de détecter des photons uniques avec un bon rendement quantique comparable à celui des APDs, sur plusieurs pixels simultanément, permettant un multiplexage important. Ils possèdent actuellement une résolution temporelle plus limitée que les APDs, de l'ordre de 14µs maximale quand l'acquisition est réduite à une ligne de 128 pixels (Haustein and Schwille, 2007; Ries and Schwille, 2012; Kloster-Landsberg et al., 2012).

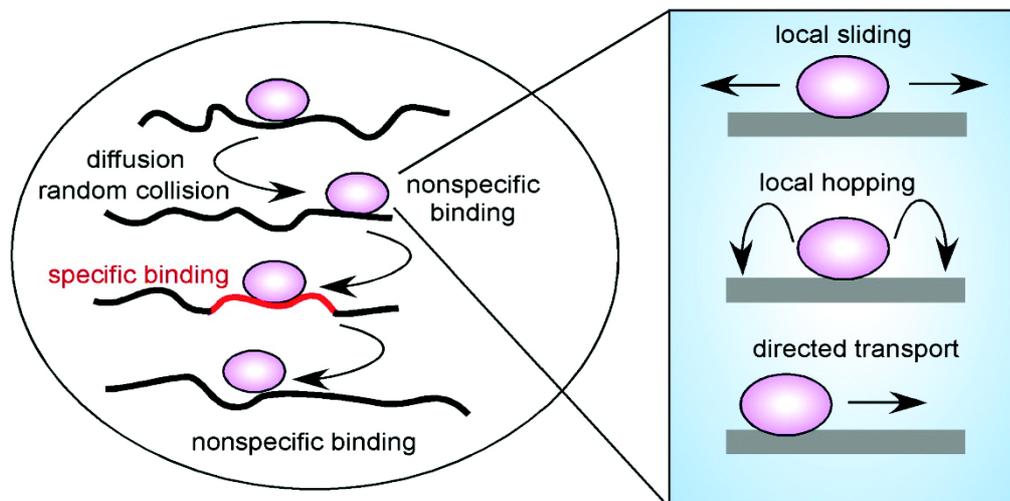
D'autres techniques permettent d'effectuer plusieurs mesures simultanément (Figure 8), ce qui permet de réduire le temps d'acquisition mais aussi d'obtenir des dynamiques spatialement résolues. La FCS à double focus, utilise deux volumes confocaux séparés par une distance bien définie de quelques centaines de nanomètres. En plus d'obtenir deux ACFs, il est possible d'obtenir une courbe de corrélation croisée spatiale qui compare les fluctuations aux deux positions, et permet une quantification précise des flux de molécules, notamment dans le cas de mobilité dirigée. D'autres techniques utilisent les capacités d'un microscope confocal à disque rotatif « disque de Nipkov » ou « spinning disk » qui permet de réaliser des mesures dans des objets 3D, mais dont la couverture de l'échantillon est incomplète dans l'espace et le temps (placement et rotation du disque) (Ries and Schwille, 2012; Erdel et al., 2011).

D'autres techniques dérivées de la FCS permettent d'obtenir des informations de concentration et de dynamique, sur des surfaces plus grandes. Ces techniques appelées spectroscopie à corrélation d'image (ICS, RICS « Raster Image Correlation Spectroscopy »), utilisent les propriétés de l'imagerie confocale à balayage laser pour extraire les informations contenues dans chaque pixel (Figure 8). Il est alors possible de calculer des courbes d'autocorrélation spatiale, mais aussi temporelle à différentes échelles plus ou moins longues (différences entre points d'une ligne, entre points de lignes différentes, entre points d'images successives). La résolution de la RICS dépend de trois paramètres expérimentaux, la taille du pixel (0,005 à 0,2  $\mu\text{m}$ ), le temps de résidence du pixel (2 à 100  $\mu\text{s}$ ) et le temps de répétition de la ligne (3 à 100 ms). Ces différents paramètres peuvent être adaptés en fonction de la mobilité de la protéine étudiée (Digman et al., 2005). La RICS nécessite un balayage laser précis et homogène sur l'ensemble de la région d'analyse. Avec ces techniques il devient possible de déterminer des constantes de diffusion et des flux, permettant la construction de carte de flux (Erdel et al., 2011).

### **3. La dynamique du processus de transcription en cellules vivantes**

#### **3.1. La recherche des sites d'interaction**

La base de l'activité de transcription repose sur le recrutement de complexes de transcription sur les gènes cibles. Cependant les sites de liaison spécifiques pour la machinerie transcriptionnelle de base et les facteurs spécifiques de transcription sont peu abondants dans le génome comparé aux sites non spécifiques. En assumant une taille moyenne de 150 nucléotides pour un promoteur de mammifère, les régions promotrices ne représenteraient que 0,1% du génome humain, et beaucoup de facteurs de transcription ont peu de sites spécifiques de liaison (Hager et al., 2009).



**Figure 9 Différentes possibilités d'interactions et de déplacement d'un facteur de transcription**

Un facteur de transcription (rose) diffuse dans l'espace du noyau et peut s'associer à la chromatine via des collisions aléatoires. La majorité de ces interactions est sur des sites non spécifiques résultant en des interactions très transitoires, jusqu'à ce que le facteur de transcription rencontre un site de liaison spécifique. A chaque interaction, le facteur de transcription peut subir des mouvements locaux, tels qu'un glissement local, un saut local ou un mouvement dirigé (cadre bleu). (D'après Hager, et al., 2009).

La clé pour un recrutement efficace de la machinerie de transcription sur son gène cible réside dans deux propriétés fondamentales des facteurs de transcription, 1) leur habileté à diffuser rapidement dans le noyau, 2) leur propension à lier de façon très transitoire la chromatine (Phair et al., 2004).

Les facteurs de transcription, diffusent en trois dimensions à l'intérieur du noyau, rencontrent et interagissent fréquemment avec la chromatine, mais vu la rareté des sites spécifiques, la plupart de ces interactions se font sur des sites hors cibles et ne résultent pas en une interaction fonctionnelle. Après une courte immobilisation, le facteur de transcription se dissocie et continue sa marche aléatoire jusqu'à ce qu'il rencontre une nouvelle cible. La rencontre du facteur de transcription et de sa séquence cible correspondrait à un phénomène stochastique (Phair and Misteli, 2000; Misteli, 2001; Phair et al., 2004).

D'autres mécanismes pourraient entrer en jeu pour faciliter la recherche de sites spécifiques. Ainsi une fois en interaction avec la chromatine, les facteurs de transcription pourraient glisser le long de l'ADN. En effet, au vu des temps de résidence obtenus en FRAP, les facteurs de transcription seraient capables de balayer plusieurs centaines de nucléotides avant de se décrocher (Figure 9). Cependant le nucléosome et l'organisation en structure supérieure de la chromatine représentent une barrière majeure à ce mode de déplacement. Ainsi le balayage pourrait se faire par un glissement en 2D le long de la fibre de chromatine et par des petits sauts locaux à proximité du site primaire d'interaction, par rapprochement de segments chromatiniens, par restriction du balayage sur des régions pauvres en protéines (euchromatine), ou en couplant le balayage à des protéines capables de nettoyer l'ADN. Les processus de diffusion, d'interaction aspécifique avec l'ADN, de glissement le long de l'ADN, de sauts locaux, continuent jusqu'à ce que le facteur trouve son site spécifique et s'y lie pour une durée plus longue, conduisant à une réponse fonctionnelle (Figure 9) (Gorman and Greene, 2008; Halford and Marko, 2004; van Royen et al., 2011).

## **3.2. Les ARN Polymérases**

### ***3.2.1. L'ARN polymérase I***

L'ARN polymérase I s'accumule dans les nucléoles sur des usines de transcription. Sur ces sites, l'ARN pol I montre une récupération biphasique : la première phase, rapide, correspond à l'interaction transitoire de l'ARN pol I avec les nucléoles et les promoteurs des ADN ribosomaux, la deuxième phase, plus lente, représente l'ARN pol I qui est activement engagée dans l'élongation. La comparaison entre un état de faible activité de transcription (phase G1 du cycle cellulaire) et un état de forte activité (phase S), montre que dans les nucléoles, les constantes de

vitesse d'association ne varient que très peu entre les deux états ( $0,026-0,061s^{-1}$  pour G1 et  $0,011-0,025s^{-1}$  pour S), de même pour les constantes de vitesse de dissociations ( $0,047-0,093s^{-1}$  pour G1 et  $0,016-0,026s^{-1}$  pour S). La constante de vitesse de dissociation de l'ARN pol I avec son promoteur est réduite dans le cas d'une forte activité de transcription, ce qui signifie que l'ARN pol I est maintenue sur des périodes plus longues sur le promoteur (de 2 à 2,6 fois en fonction de la sous-unité étudiée) (Gorski et al., 2008).

D'autres facteurs impliqués dans la transcription par l'ARN pol I tels que l'UBF « Upstream Binding Factor », le facteur PAF53 et le régulateur de l'initiation de la transcription TIF-1A présentent des dynamiques distinctes. En FRAP, UBF et PAF53 ont un  $t_{1/2}$  significativement plus rapide que toutes les sous-unités de la ARN pol I (~4s contre 10-19s), alors que celui de TIF-1A est à peu près similaire à celui de l'ARN pol I (16s). La dynamique d'UBF n'est pas modifiée entre un état de faible et de forte activité de transcription, UBF n'est donc pas un modulateur de l'assemblage du complexe pol I. Au contraire PAF53 et TIF-1A montrent des cinétiques de récupérations significativement réduites entre la phase S et la phase G1. D'après ces données, l'ARN pol I ne semble pas recrutée sous forme d'une holoenzyme, mais l'assemblage de la polymérase aurait plutôt lieu de façon séquentielle (Gorski et al., 2008).

### **3.2.2. L'ARN polymérase II**

#### **3.2.2.1. Sur chromosomes polyténiques**

Chez la drosophile l'ARN pol II, marquée en fluorescence sur la sous-unité RPB3 se relocalise en moins de 15 minutes sur les sites des gènes hsp70 aux loci 87A et 87C, après choc thermique. Lors de cette phase précoce de réponse au choc thermique, en FRAP, la sous-unité RPB3 récupère totalement en 100 s. Ce temps correspond au temps nécessaire à la synthèse complète du gène hsp70 (2,5 kb) à un taux d'environ 1,5kb/min. La plupart des ARN pol II sont en cours d'élongation, ou entrent rapidement en élongation, ainsi lors de la réponse précoce au choc thermique, l'ARN pol II est en mode d'« entrée efficace ». Après 40 min de choc thermique, la récupération en FRAP, de l'ARN pol II est ralentie, les molécules sont localement recyclées et ne sont pas renouvelées. Les puffs des gènes de choc thermique formeraient un compartiment dans lequel les molécules nécessaires à la transcription s'accumuleraient, permettant le recyclage local des molécules (Yao et al., 2007).

Plusieurs facteurs sont recrutés sur les gènes hsp70 selon un mode séquentiel : le facteur de transcription HSF1 est recruté dès 20 secondes, l'ARN pol II et le facteur d'élongation PTEFb à 102 secondes, suivi de la chaperonne des nucléosomes Spt6 avec un temps de 114 secondes et la topoisomérase I avec un temps de 124 secondes. Ces données supportent le fait que chaque

facteur posséderait son propre mécanisme et signal de recrutement en fonction de son activité. En FRAP, les temps de demi-récupération sont de 30, 40 et 10s pour respectivement PTEFb, Spt6 et Topo I. Un choc prolongé ralentit la dynamique des trois facteurs, comme pour l'ARN pol II, indiquant un recyclage partiel au promoteur hsp70 (Zobeck et al., 2010).

### *3.2.2.2. Sur site d'amplification*

Sur le site MMTV, la plus grande sous-unité RPB1 de l'ARN pol II présente, en FRAP, un  $t_{1/2}$  de récupération de 100 s et une récupération complète en 15 minutes. Les temps courts pourraient être associés à des événements d'initiation abortive et les temps longs à des ARN polymérase en cours d'élongation (Becker et al., 2002). Ce comportement biphasique, avec une fraction lente dont le  $t_{1/2}$  est d'environ 20 min a aussi été observé dans le nucléoplasme des cellules (Kimura et al., 2002; Darzacq et al., 2005).

Le site d'amplification lactose a permis de caractériser chaque phase de la dynamique de l'ARN pol II. Sur le site, les trois états de phosphorylation de la queue C terminale de l'ARN pol II sont présents: l'état non phosphorylé correspond à la phase de liaison au promoteur, la phosphorylation de la sérine 2 à l'état de sortie du promoteur et la phosphorylation de la sérine 5 à la phase d'élongation. Pour ajuster les courbes de FRAP, au moins trois populations avec des propriétés cinétiques différentes sont nécessaires. La population la plus lente avec un temps de résidence de  $520 \pm 100$  s représente les polymérase engagées avec un gène et en phase d'élongation. La population la plus rapide, avec un temps de résidence de six secondes correspond aux interactions primaires entre l'ARN pol II et le promoteur avec une légère contribution de la diffusion. La fraction intermédiaire représente les événements d'initiation, avec un temps de résidence de 54 s. Chaque fraction représente 1/3 de l'ensemble des ARN pol II présentes sur le site. Le processus de transcription est plutôt inefficace avec seulement une interaction sur 90 conduisant à la formation d'un ARNm.

En prenant en compte le temps de résidence, la taille du gène et la possibilité pour l'ARN pol II de passer d'un état d'élongation à un état de pause, la vitesse de polymérisation a été mesurée à 4,3kb/min, avec un temps cumulatif de pause de 4 min, observé pour 26 % des polymérase présentes sur le site. Ce résultat est en accord avec celui obtenu pour l'ARN pol I (5,6 kb/min), mais dans ce cas la mesure ne prend pas en compte l'état de pause. Cet état semble donc être spécifique à l'ARN pol II (Darzacq et al., 2007).

### **3.3. La dynamique des facteurs généraux**

En combinant les différents modèles d'études et les différentes techniques d'analyse, de multiples études ont été menées pour mieux comprendre la dynamique de différents éléments impliqués

dans la transcription (Darzacq et al., 2009; Hemmerich et al., 2011). En voici les principaux exemples :

### 3.3.1. TFIID (*TATA Binding Protein et TBP-associated factor*)

Le complexe TFIID est composé des protéines TBP et de différentes TAFs.

Chez la levure, la protéine YFP-TBP est très dynamique, en effet 90% de la récupération en FRAP est obtenue en 7s, la récupération est complète en 15s. Les courbes montrent une récupération biphasique, avec une phase initiale de récupération rapide, suivi d'une phase plus lente. La protéine TBP présente une dynamique plus lente que la protéine TAF1 qui a pourtant une masse moléculaire plus importante, ce qui indiquerait que la majorité des protéines TBP ne serait pas incorporée de façon stable dans le complexe TFIID *in-vivo*. De plus, un mutant de TBP incapable de se lier à l'ADN (V71R) a une mobilité plus importante, suggérant que la majorité de la protéine TBP est en interaction avec la chromatine mais que cette interaction serait très transitoire (Sprouse et al., 2008).

Dans des cellules humaines (HeLa et U2OS), La protéine GFP-TBP présente aussi des courbes de FRAP biphasiques. Les données expérimentales ont été ajustées avec un modèle de diffusion et d'interaction. Ainsi la protéine GFP-TBP diffuse avec un coefficient de diffusion de  $6,8 \pm 1,0$  à  $2,2 \pm 0,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour les cellules U2OS et HeLa respectivement, alors que dans les mêmes conditions, la protéine GFP diffuse avec  $D = 12 \pm 4$  à  $14 \pm 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . La constante de vitesse d'association est de  $0,004$  à  $0,002 \text{ s}^{-1}$  et la constante de vitesse de dissociation est de  $0,009$  à  $0,006 \text{ s}^{-1}$  pour les cellules U2OS et HeLa respectivement. Une surexpression du facteur NC2, un cofacteur négatif qui interagit avec la protéine TBP lié à l'ADN, entraîne une baisse de la fraction mobile, une augmentation de la partie liée et du temps de résidence, confirmant la liaison de TBP à la chromatine (de Graaf et al., 2010).

Comme pour la levure, d'autres composants du complexe TFIID, ont une dynamique plus rapide que TBP, avec  $D = 8,4 \pm 2,3$  et  $7,5 \pm 0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $k_{on}^*$   $0,133$  et  $0,058 \text{ s}^{-1}$  et  $k_{off}$   $0,625$  et  $0,667 \text{ s}^{-1}$ , pour TAF1 et TAF5 respectivement. Ces données sont en accord avec un modèle où la machinerie de transcription s'assemble et se désassemble très rapidement, permettant une réponse rapide de la cellule en fonction des besoins en ARNm (de Graaf et al., 2010).

### 3.3.2. TFIIF

La dynamique d'un autre facteur général de transcription, TFIIF, a été étudiée en cellules vivantes, en marquant une de ses sous-unités, la protéine XPB (xeroderma pigmentosum du groupe B). Une fraction de TFIIF diffuse librement à l'intérieur du noyau, et rencontre de façon aléatoire des sites de liaison, où il se lie plus ou moins transitoirement en fonction de son activité.

**Tableau 2 Données de dynamique des récepteurs nucléaires**

Prot	Méthode	t <sub>1/2</sub> (s)	Full rec (s)	D (μm <sup>2</sup> /s)	D2 (μm <sup>2</sup> /s)	k <sub>on</sub> * (s <sup>-1</sup> )	k <sub>off</sub> (s <sup>-1</sup> )	F <sub>free</sub> (%)	F <sub>im</sub> (%)	Ref
Sans ligand										
GR	FRAP	1								Schaaf 2003
GR	FRAP	1,6								Schaaf 2003
GR	FCS			14,3	1,6			61		Mikuni 2007
ER	FRAP	1,6	12						14	Maruvada 2003
ER	FRAP	0,9								Sharp 2006
ER	FRAP	0,8								Stenoien 2001
AR	FRAP			8						Farla 2004
PR	FRAP	0,6								Rayasam 2005
RAR	FRAP	1,9							18	Maruvada 2003
Avec ligand										
GR	FRAP	1,9								Schaaf 2003
GR	FRAP	1,1								Kino 2004
GR	FCS			8,7	0,3			64		Mikuni 2007
GR	FRAP			2,5		0,1	0,3			Stasevich 2010
GR	FRAP			3,4		0,1	0,3			Mueller 2008
GR	TICS			1,7		0,3	0,8			Stasevich 2010b
GR	FCS			2,2		2,4	5,3	69		Stasevich 2010b
GR	FCS			5,9	0,4					Stasevich 2010b
ER	FRAP	5,8							44	Maruvada 2003
ER	FRAP	5,3								Sharp 2006
ER	FRAP	5,9								Stenoien 2001
AR	FRAP			6			0,01		20	Farla 2004
PR	FRAP	4								Rayasam 2005
RAR	FRAP	2,3							18	Maruvada 2003
Sur site d'amplification (sans ligand)										
ER	FRAP	12,2								Sharp 2006
ER	iFRAP						0,2			Sharp 2006
AR	FRAP	0,2								Klokk 2007
Sur site d'amplification (+ ligand)										
GR	FRAP	5								Stavreva, 2003
ER	FRAP	11,6								Sharp 2006
ER	iFRAP						0,2			Sharp 2006
AR	FRAP	3,6					0,3 et 0,01	62		Klokk 2007
AR	FRAP	5,3					0,2 et 0,01	55		Klokk 2007
PR	FRAP	3,7								Rayasam 2005
Mutant du domaine de liaison à l'ADN (+ ligand)										
GR	FCS			15,1	1,5			68		Mikuni 2007
GR	FCS			13,7	0,9			60		Mikuni 2007
GR	FRAP	0,6								Kino 2004
AR	FRAP			8						Farla 2004
Mutant du domaine de transactivation (+ ligand)										
GR	FRAP	0,8								Kino 2004
AR	FRAP	4,6					0,2 et 0,02	68		Klokk 2007
AR	FRAP	3,7					0,2 et 0,02	69		Klokk 2007

TFIIH diffuse avec une constante de diffusion  $D = 6,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , proche de celle de TBP. Le temps de résidence diffère en fonction du site d'activité avec des temps allant de 2 à 10 secondes sur les sites d'activité de l'ARN pol II, d'environ 25 secondes sur le site d'activité de l'ARN pol I et de 3 à 4 minutes sur les sites de réparation des dommages à l'ADN. Le facteur TFIIH existerait sous forme de petits complexes capables de s'associer de façon séquentielle aux sites d'actions, il peut ainsi s'échanger rapidement entre les multiples processus, permettant une réponse rapide aux changements de conditions (Hoogstraten et al., 2002).

### 3.4. La dynamique des facteurs spécifiques de transcription et cofacteurs

En dehors des facteurs généraux et des ARN polymérase, de nombreux facteurs spécifiques de transcription ont aussi été étudiés.

#### 3.4.1. Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires représentent la famille de facteur de transcription la plus étudiée jusqu'à présent. Ce sont des facteurs de transcription activés par la liaison de ligands. Une fois activés, les récepteurs stéroïdiens sont capables de lier des éléments de réponse aux hormones (HRE) présents dans les régions promotrices. Les récepteurs nucléaires sont constitués de trois domaines, un domaine N-terminal (NTD), un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal de liaison aux ligands (LBD). Cette famille est composée de deux types. Les récepteurs de type I forment des homodimères comme les récepteurs au glucocorticoïde, à l'œstrogène, à l'androgène, à la progestérone. Les récepteurs de type II forment des hétérodimères avec le récepteur au rétinoloïde X (RXR), parmi ces récepteurs on retrouve les récepteurs aux thyroïdes, à l'acide rétinoloïque et à la vitamine D (Maruvada et al., 2003).

##### 3.4.1.1. Le récepteur au glucocorticoïde

Le cortisol, ligand naturel du récepteur au glucocorticoïde (GR), est une hormone hyperglycémisante qui a une action anti-inflammatoire et immunosuppressive. En l'absence de ligand, le facteur de transcription GR est localisé dans le cytoplasme où il interagit avec les protéines de choc thermique et les immunophilines. Après activation, il est dissocié de son complexe et se transloque dans le noyau, où il est capable d'interagir dans les promoteurs sur des séquences spécifiques : les éléments de réponse au glucocorticoïde (GRE) (Htun et al., 1996).

Dans le nucléoplasme, le facteur GR diffuse avec une constante de diffusion de  $3,4$  à  $5,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , une constante de vitesse d'association  $k_{on}^*$  de  $0,13 \text{ s}^{-1}$  et une constante de vitesse de dissociation  $k_{off}$  de  $0,32 \text{ s}^{-1}$  (Mueller et al., 2008). L'ajout de ligand, dans des cellules COS-1, induit un ralentissement de la dynamique du facteur GR dépendant de la concentration et de l'affinité du ligand. Le  $t_{1/2}$  augmente d'une seconde à deux secondes entre  $0,1 \text{ nM}$  et  $100 \text{ nM}$  de

dexaméthasone, ligand de forte affinité avec un  $K_d < 5$  nM (Schaaf and Cidlowski, 2003). Des données de FCS obtenues avec un modèle à deux composants, confirment le ralentissement de la dynamique induite par l'ajout de ligand avec respectivement  $D1 = 14,30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 61% ;  $D2 = 1,60 \mu\text{m}^2/\text{s}$  en absence de ligand et  $D1 = 8,70 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 64% et  $D2 = 0,25 \mu\text{m}^2/\text{s}$  en présence de ligand (Mikuni et al., 2007) (Tableau 2).

La dynamique de GR est dépendante de la présence du domaine de liaison à l'ADN et des domaines de transactivation. En effet des mutations à l'intérieur de ces domaines procurent à GR une mobilité plus importante que pour la protéine sauvage, avec des  $t_{1/2}$  en FRAP de  $0,64 \pm 0,17$ ,  $0,83 \pm 0,12$  et  $1,12 \pm 0,21$  s respectivement pour le mutant de liaison à l'ADN, le mutant du domaine de transactivation et la protéine sauvage. De façon intéressante, les  $t_{1/2}$  en FRAP corrélaient avec l'activité transcriptionnelle de chacun des mutants testés (Kino et al., 2004). La dépendance du domaine de liaison à l'ADN a aussi été confirmée par les analyses FCS. Des mutations dans le domaine de liaison entraînent un ralentissement uniquement du deuxième composant avec un  $D2$  après activation de  $0,25$  à  $0,92 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , pour respectivement la protéine sauvage et le mutant de liaison à l'ADN (Mikuni et al., 2007).

Pour pouvoir étudier la dynamique de GR sur son site de transcription, l'équipe d'Hager, en 2000, a exprimé dans une lignée cellulaire possédant le site MMTV, le récepteur au glucocorticoïde fusionné à la protéine autofluorescente eGFP. Le contrôle de l'expression de la protéine GR-GFP est assuré par le système inductible à la tétracycline, pour pallier aux contraintes associées à la surexpression du GR, notamment l'arrêt de la croissance (Walker et al., 1999; McNally et al., 2000). Sur le site MMTV, en FRAP, GR présente une dynamique ralentie par rapport à celle observée dans le nucléoplasme avec un  $t_{1/2}$  de 5s (Tableau 2). La différence observée entre le nucléoplasme et le site MMTV est expliquée par une liaison plus importante au site MMTV, comme attendu due à la forte concentration en sites spécifiques (Stavreva et al., 2004). L'échange rapide de GR-GFP est contrôlé par une balance entre les fonctions des protéines chaperonnes et du protéasome. Après arrêt de l'activité du protéasome par un traitement au MG132, GR-GFP récupère plus lentement et présente une fraction immobile de 5%, qui reste liée de façon stable. Un traitement par la geldanamycine ou le radicicol, qui sont des inhibiteurs de l'activité des chaperonnes, entraîne une accélération de l'échange de GR-GFP sur les promoteurs du site MMTV. Ainsi les HSP stabiliseraient la liaison de GR, alors que le protéasome participerait au retrait de GR sur ses sites de transcription (Stavreva et al., 2004).

Le site MMTV n'étant pas au centre de la cellule, et souvent à proximité d'un nucléole, il pourrait impacter la récupération du facteur de transcription sur le site MMTV. En effet, soit le nucléole

possède très peu de sites de liaison à GR, ainsi la récupération serait plus rapide due à une diffusion rapide sans interaction des molécules à l'intérieur du nucléole, soit le nucléole serait moins perméable, ralentissant ainsi les molécules le traversant. La comparaison de deux lots de mesures : l'une avec le site MMTV accolé au nucléole (0,5-1  $\mu\text{m}$ , sachant que le site MMTV fait 1  $\mu\text{m}$  de diamètre), l'autre avec le site MMTV éloigné du nucléole (1,7-3  $\mu\text{m}$ ). On observe que peu d'effet sur les courbes de FRAP, peut-être parce que les deux hypothèses proposées se neutralisent entre elles ou parce que la variabilité intercellulaire masque les petites différences dues au nucléole (Sprague et al., 2006).

Au site MMTV, le ratio  $k_{on}^*/k_{off}$  de GR est de 1,7. Une étude comparative de la fluorescence de GFP-GR avec un standard de particules virales contenant 120 molécules de GFP, a permis à Dundr et co, en 2002, de déterminer le nombre de sites occupés par GR sur le site MMTV. GR n'occupe que  $870 \pm 500$  sites sur les 1200 présents au site MMTV (Dundr et al., 2002). En utilisant cette donnée d'occupation des sites disponibles et en déterminant le volume d'analyse, la concentration à l'équilibre du nombre de sites libres a pu être estimée à  $S_{eq} \sim 200\text{nM}$ , ce qui permet d'estimer la constante de vitesse de dissociation de GR au site MMTV à environ  $K_d \sim 10^7\text{M}$ , en utilisant la formule suivante :  $\frac{k_{on}^*}{k_{off}} = \left(\frac{k_{on}}{k_{off}}\right) S_{eq} = \left(\frac{1}{K_d}\right) S_{eq}$  (Sprague et al., 2006).

Les protéines du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF colocalisent sur le site MMTV. Brahman (BRM) et Brahma-related-gene 1 (BRG1) sont recrutés sur le site MMTV après activation de la transcription par ajout d'hormone, et participe à la transcription, en décondensant le locus du site MMTV, avec un rôle plus prononcé pour BRG1. BRG1 et BRM présentent une dynamique qui est ralentie par l'ajout d'hormone. Le  $t_{1/2}$  de BRG1 varie de  $0,9 \pm 0,25$  s dans le nucléoplasme à  $3,9 \pm 0,49$  s sur le site MMTV, le  $t_{1/2}$  de BRM sur le site MMTV est de  $1,95 \pm 0,46$  s, ce qui suggère une interaction plus forte de BRG1 sur la chromatine par rapport à BRM (Johnson et al., 2008). De même le co-activateur GRIP-1 « Glucocorticoid Receptor Interacting Protein » qui colocalise avec le site MMTV en présence d'agoniste présente une dynamique similaire à celle observée pour GR, avec un  $t_{1/2}$  en FRAP de 5 s. Ainsi la dynamique rapide au site MMTV n'est pas limitée aux protéines d'initiation mais aussi à de multiples co-activateurs et co-régulateurs de la transcription (Becker et al., 2002).

### 3.4.1.2. Le récepteur à l'œstrogène

L'œstrogène est une hormone stéroïdienne féminine qui est responsable du développement des caractères sexuels féminins et qui régule les fonctions reproductrices chez la femme. Le récepteur à l'œstrogène- $\alpha$  est majoritairement nucléaire et se relocalise dans des petits foyers après l'ajout

soit d'agoniste, soit d'antagoniste. Seuls les agonistes mènent au recrutement du co-activateur des récepteurs stéroïdiens-1 (SRC-1).

En l'absence de ligand, le récepteur ER fusionné à la protéine CFP est très mobile avec un  $t_{1/2}$  de  $0,80 \pm 0,2$  s, comparable à ce qui a été observé pour GR. Sous forme activé, le temps de demi-récupération d'ER est de  $5,9 \pm 1,5$  s (Tableau 2), et celui de son co-activateur SRC-1, un peu plus lent avec un  $t_{1/2}$  de  $9,8 \pm 2,9$  s. Le ralentissement est dépendant du type de ligand utilisé, un antagoniste partiel induit un ralentissement similaire à celui de l'agoniste, alors qu'un antagoniste pur, comme un traitement à l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, induit une immobilisation du récepteur ER (Stenoien et al., 2001; Maruvada et al., 2003). Le ralentissement de la dynamique d'ER en présence d'agoniste n'est pas dû uniquement à des changements de complexes moléculaires mais aussi à l'augmentation des interactions avec l'ADN (Stenoien et al., 2001).

Sur le site de prolactine, où le récepteur à l'œstrogène a une activité de transcription fonctionnelle, la dynamique du récepteur est ralentie par rapport à celle observée dans le nucléoplasme. Le récepteur présente un  $t_{1/2}$  de récupération de l'ordre de 12 s en présence ou en absence de ligand. Cependant les constantes de vitesse de dissociation diffèrent en fonction de la présence ou non du ligand, avec des  $k_{off}$  respectifs de 0,15 et  $0,22 \text{ s}^{-1}$ . Ceci allant dans le sens d'interactions productives plus nombreuses au promoteur (Sharp et al., 2006).

#### *3.4.1.3. Le récepteur à l'androgène*

L'androgène a un rôle important dans le développement et la maintenance du système reproductif masculin. Comme pour ER et GR, le récepteur AR subit un changement conformationnel après activation par le ligand, qui permet la liaison du récepteur aux éléments de réponse aux hormones (HRE).

La dynamique du récepteur AR dans le nucléoplasme est dépendante de la présence de ligand. La dynamique du récepteur AR est ralentie par l'ajout du ligand avec une constante de diffusion passant de  $8,0 \pm 0,5$  à  $6,0 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , respectivement en présence et absence de ligand. L'ajout de ligand entraîne aussi la formation d'une fraction immobile de 20% avec un temps de résidence maximal de 75 s. Le changement de dynamique induit après activation est dépendant du domaine de liaison à l'ADN, en effet le mutant de délétion du domaine de liaison à l'ADN diffuse avec une constante de diffusion  $D = 8,0 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , similaire à celle obtenue pour la protéine sauvage en absence de ligand (Farla et al., 2004) (Tableau 2).

Sur le site MMTV, la dynamique du récepteur AR est ralentie par l'ajout d'un agoniste avec un temps de demi-récupération passant de 0,2 à  $4,5 \pm 0,8$  s, respectivement en absence et en présence de ligands. La dynamique du récepteur AR en présence d'un antagoniste est similaire à celle observée en absence de ligand avec un  $t_{1/2}$  de 0,5 s. En l'absence de domaine de transactivation (AR-E897A), la dynamique du mutant est un peu plus rapide après activation par rapport à la protéine sauvage avec des  $t_{1/2}$  passant de 0,3 à 2,8 – 4,6 s, respectivement en absence et en présence de ligands. Ainsi la mobilité du récepteur AR est affectée à la fois par la nature du ligand, mais aussi par sa capacité de transactivation (Klokk et al., 2007).

Le modèle de réaction dominante à deux composants a donné les ajustements des courbes de FRAP les plus précis. Pour le récepteur AR lié à différents agonistes, le  $k_{off}$  est de 0,20 à  $0,26 \text{ s}^{-1}$  pour la fraction rapide (55 - 62%), et de 0,014 à  $0,013 \text{ s}^{-1}$  pour la fraction lente (Klokk et al., 2007).

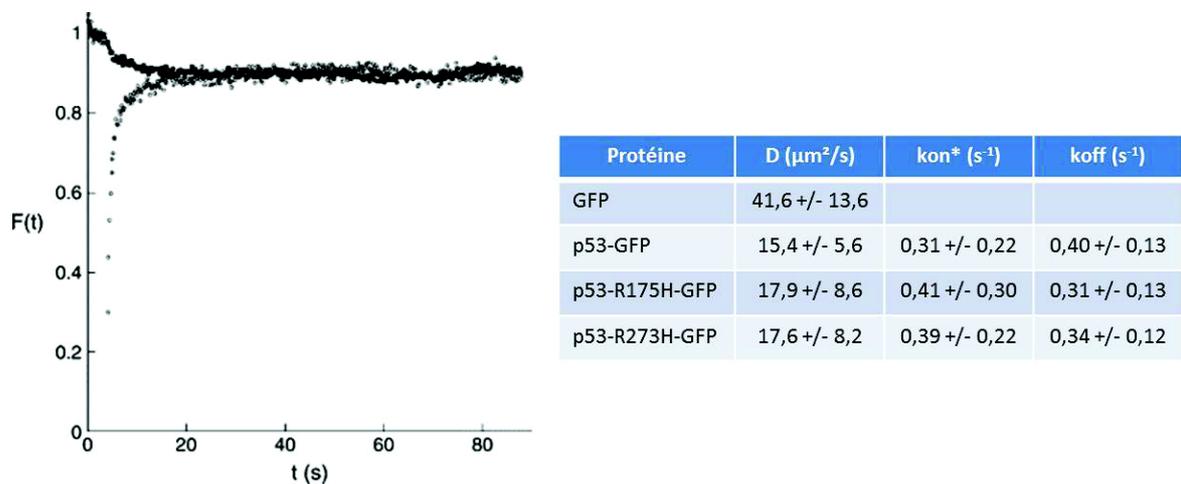
#### *3.4.1.4. Le récepteur à la progestérone*

La progestérone est une hormone impliquée dans le cycle menstruel féminin, la grossesse et l'embryogenèse. Chez les humains, il existe deux isoformes du récepteur à la progestérone, PRA et PRB, PRB est un meilleur activateur transcriptionnel que PRA.

En absence de ligand, PR diffuse rapidement dans le nucléoplasme avec un  $t_{1/2}$  en FRAP, de 0,6 s. Après activation par un agoniste, PR s'échange aussi rapidement au site MMTV que dans le noyau des cellules, avec des  $t_{1/2}$  de 4 et 3,7 s respectivement (Tableau 2). Les antagonistes en plus de leurs différentes capacités de liaison au site MMTV présentent aussi des dynamiques variées, PR lié à RU486 (antagoniste de type II) a une dynamique plus lente, que ce soit sur le site MMTV ou dans le noyau avec des  $t_{1/2}$  de 11 et 13 s respectivement. Au contraire, PR lié à ZK98299 (antagoniste de type I) a une dynamique très rapide dans le nucléoplasme, plus proche de celle observée en l'absence de ligand avec un  $t_{1/2}$  de 1,8 s (Rayasam et al., 2005; Grøntved and Hager, 2012).

#### *3.4.1.5. Les récepteurs nucléaires de type II*

Les récepteurs nucléaires de type II forment des hétérodimères avec le récepteur à la rétinoïde X. L'ajout de ligand agoniste, entraîne l'activation du récepteur, qui se transloque dans le noyau et forme des foyers ponctuels. Parmi ces récepteurs, on retrouve le récepteur à la thyroïde, le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR) et le récepteur à la vitamine D. En absence de ligand, le récepteur à l'acide rétinoïque est très mobile, et récupère totalement en FRAP en 10 s. Après ajout du ligand, la dynamique du récepteur n'est que peu modifiée, avec un  $t_{1/2}$  en FRAP de 2,3 s contre 2,0 s en absence de ligand. Le récepteur à la thyroïde, présente une dynamique similaire à celle observée pour RAR en absence de ligand avec un  $t_{1/2}$  de 1,8 s.



**Figure 10** Dynamique de la protéine p53 sauvage et des mutants de liaison à l'ADN analysés par FRAP

Les expériences de FRAP sont réalisées sur des cellules H1299 exprimant soit la protéine sauvage p53, soit deux mutants de liaison à l'ADN. Le mutant R175H entraîne une perturbation majeure de la structure du domaine DBD, alors que le mutant R273H perturbe uniquement la surface de liaison à l'ADN. La courbe de FRAP présentée est celle obtenue pour la protéine sauvage. La partie haute de la courbe correspond à la courbe de référence obtenue dans une autre région du même noyau. (Adaptée de Hinow, et al., 2006).

L'ajout de ligand n'entraîne aucune modification de la mobilité du récepteur ( $t_{1/2} = 1,8$  s) (Maruvada et al., 2003).

#### 3.4.1.6. Conclusion sur la dynamique des récepteurs nucléaires

L'ensemble des études menées sur les récepteurs nucléaires (Tableau 2), nous permet de tirer plusieurs conclusions sur leurs dynamiques : i) Tous les récepteurs de type I diffusent rapidement avant activation avec des temps de demi-récupération allant de 0,2 à 1 seconde. ii) Après activation, ces récepteurs présentent une dynamique ralentie avec des  $t_{1/2}$  allant de 1 à 6 secondes, et des constantes de diffusion comprises entre 3 et 6  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ . iii) Sur les sites d'activités (MMTV, PRL), les récepteurs nucléaires présentent une dynamique encore plus ralentie avec des  $t_{1/2}$  allant de 4 à 12 secondes. iv) Le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de transactivation de ces récepteurs jouent un rôle majeur dans les changements de dynamique observés après activation. v) Les co-activateurs présentent, eux aussi, des dynamiques rapides. vi) Par contre la dynamique des récepteurs nucléaires de type II n'est pas modifiée par l'ajout de ligand.

De multiples paramètres influencent la liaison rapide et transitoire des récepteurs stéroïdiens dans le noyau. La diffusion passive indépendante de l'énergie, le processus de recherche de la cible, les associations et dissociations intrinsèques des protéines avec la chromatine et d'autres composants nucléaires peuvent influencer les mouvements des protéines à l'intérieur des noyaux.

#### 3.4.2. p53

Le gène suppresseur de tumeur p53, est le gène le plus muté dans les cancers humains. En réponse à un stress cellulaire, tel que l'activation d'un oncogène ou des dommages à l'ADN, p53 peut agir comme un facteur de transcription séquence spécifique. p53 active la transcription de gènes impliqués dans des processus d'arrêt du cycle cellulaire, de réparation de l'ADN et d'apoptose, protégeant le génome de mutations, et empêchant l'ensemble de l'organisme de former des tumeurs.

Les courbes de FRAP, obtenues pour p53 sauvage dans des cellules H1299 (Figure 10), ajustées avec un modèle à un composant donne une diffusion effective  $D_{\text{eff}}=6,2\mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ . Cependant dans la majorité des cas, ce modèle ne permet pas d'expliquer les données expérimentales de façon satisfaisante. Le modèle à deux composants diffusant librement donne une fraction lente de 66 % avec  $D_1=3,78 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , et une fraction rapide avec un  $D_2=84,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Ce modèle donne des ajustements bien meilleurs que le modèle à un composant, mais la fraction rapide diffuse deux fois plus vite que la protéine GFP seule ( $D=41,6 \pm 13,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ), ce qui est impossible et conduit au rejet de ce modèle. Un modèle de diffusion et d'interaction à trois paramètres ( $D, k_{\text{on}}^*, k_{\text{off}}$ ) améliore de façon significative les ajustements et permet d'obtenir les valeurs suivantes pour les

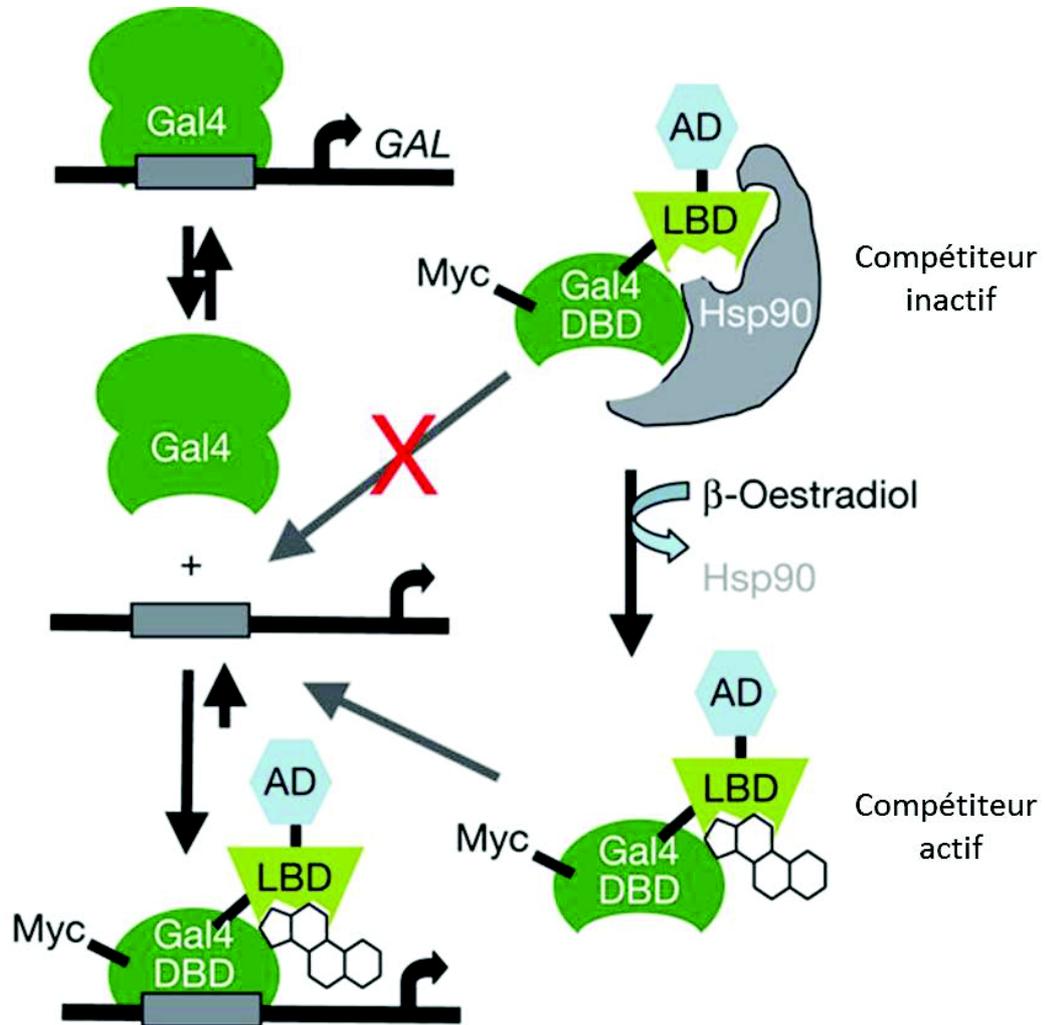
paramètres  $D=15,4 \pm 5,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $k_{on}^*=0,31 \pm 0,22 \text{ s}^{-1}$  et  $k_{off}=0,40 \pm 0,13 \text{ s}^{-1}$  (Figure 10). Les valeurs de  $k_{on}^*$  et  $k_{off}$  pour p53-GFP suggèrent une liaison faible (Hinow et al., 2006). L'équipe de McNally, en 2008, a réalisé une nouvelle analyse quantitative en essayant de normaliser la méthode d'analyse pour différents facteurs, en utilisant un modèle complet, les nouvelles valeurs sont  $D=4,3 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $k_{on}^*=0,12 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$  et  $k_{off}=0,39 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$ . Ces valeurs sont très proches de celle obtenues pour GR dans les mêmes conditions, indiquant un mode commun d'interaction à la chromatine pour certains facteurs de transcription (Mueller et al., 2008).

L'ajustement des courbes obtenues pour des mutants de p53 incapables de se lier à l'ADN donne des paramètres similaires à ceux obtenus pour la protéine sauvage (Figure 10), confirmant que les événements de liaison correspondent à des interactions non spécifiques (Hinow et al., 2006). Trois hypothèses pourraient expliquer la signification physiologique des interactions non spécifiques avec l'ADN : 1) les interactions non spécifiques permettraient de garder p53 associée à l'ADN et minimiseraient le temps de liaison. 2) cela permettrait de conserver une certaine quantité de p53 dans le génome pour une activation rapide. 3) cela assisterait p53 dans son rôle de remodelage de la chromatine.

### **3.4.3. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B**

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est un homo- ou hétéro-dimère formé à partir de cinq protéines (p65/RelA, c-Rel, RelB, p50 et p52). Après dégradation de l'inhibiteur cytoplasmique I $\kappa$ B, le facteur de transcription se transloque dans le noyau et se lie à des milliers de sites de liaison  $\kappa$ B de 9 à 10 nt, dispersés dans le génome. NF- $\kappa$ B est ainsi capable d'induire la transcription de 200 à 300 gènes impliqués dans l'inflammation, la réponse immunitaire et les processus anti-apoptotiques.

Après induction par le TNF- $\alpha$ , les courbes de FRAP montrent pour p65-GFP, une sous-unité de NF- $\kappa$ B, des cinétiques de récupération rapide dans le nucléoplasme, plus rapide que pour le facteur GR, mais plus lente que pour la GFP seule. Cependant le nucléoplasme est composé de multiples sites de liaison avec des affinités très variées. Pour obtenir des informations sur la dynamique de NF- $\kappa$ B sur son site spécifique, des mesures ont été faites sur un site d'amplification contenant de multiples répétitions du site  $\kappa$ B, cible de la protéine p65. Ce site forme un foyer d'environ 1,5  $\mu\text{m}$  de diamètre, visible dans le noyau après induction par le TNF- $\alpha$ . La récupération sur ce site est plus lente que celle observée dans le nucléoplasme, avec un  $t_{1/2}$  inférieur à 1 seconde et une récupération incomplète même après 15 s. Cependant, des expériences de perte de fluorescence induite par photoblanchiment (FLIP), mettent en évidence l'absence d'une fraction immobile avec moins de 1 % de la fluorescence encore présente sur le site  $\kappa$ B après 20 s, indiquant que le temps de résidence maximum sur les sites de hautes affinités est de moins de 20 secondes.



**Figure 11 Analyse de la dynamique de Gal4 par ChIP compétitive.**

La méthode repose sur le fait que le domaine de liaison au ligand des récepteurs nucléaires (LBD) possède une forte affinité pour la protéine HSP90 qui maintient le compétiteur dans un état inactif. L'ajout du ligand (ici œstradiol) provoque une soudaine libération d'un large excès du compétiteur. La dissociation de la protéine native du promoteur devrait entraîner une perte irréversible du complexe protéine native / ADN due à la compétition avec un large excès de la protéine fusionnée au LBD. En utilisant une technique de ChIP temporellement résolue, il est possible de suivre l'échange du facteur sur son promoteur après ajout du ligand. (Adaptée de Nalley, et al., 2006).

Le site pHIV-LTR-CFP-SKL est transcriptionnellement actif et induit par NF- $\kappa$ B. En FRAP, 80% de récupération est obtenue en moins de trois secondes pour p65-mRFP sur le site, et la récupération complète est obtenue en 30 secondes, suggérant une immobilisation transitoire de NF- $\kappa$ B sur son promoteur. Le temps de résidence de p65 sur le site  $\kappa$ B est dépendant de sa dégradation par le protéasome. D'un point de vue biologique, l'interaction transitoire de NF- $\kappa$ B sur sa cible d'ADN pourrait permettre de maximiser les chances d'une rencontre productive avec la machinerie de transcription, mais aussi d'empêcher la séquestration du facteur sur quelques-uns des milliers de sites  $\kappa$ B présents dans le génome (Bosisio et al., 2006).

#### ***3.4.4. Le facteur de transcription dépendant du cuivre : Ace1***

Chez la levure, Ace1 est le facteur de transcription qui se lie sur les foyers Cup1. En FRAP, la récupération complète d'Ace1 sur le site Cup1 est obtenue en deux minutes, ce qui indique une liaison plus stable et plus spécifique d'Ace1 sur le locus CUP1, par rapport à ce qui avait été décrit pour Ace1 dans le noyau de la levure, où la récupération était obtenue en environ 1s. A partir des courbes de FRAP, et d'expériences de ChIP, l'équipe de McNally a pu mettre en évidence la coexistence de deux états dynamiques. En effet en plus d'un échange rapide d'Ace1 sur le locus CUP1, il existe un cycle lent de 40 min, au cours duquel la quantité de protéines sur le site augmente lentement puis redescend. La quantité d'ARNm produit suit la quantité de protéines, alors que la quantité d'histones suit un cycle inverse. Le comportement d'Ace1 est compatible avec un modèle dans lequel le cycle lent permet de réguler le nombre de sites accessibles sur le promoteur et ainsi le niveau de transcription, chacun des sites libres peut ensuite être lié avec une dynamique rapide par les protéines Ace1, qui vont induire l'initiation de la transcription (Karpova et al., 2008).

#### ***3.4.5. Analyse de Gal 4 et Hif-1-par ChIP compétitive en temps réel***

La technique de ChIP compétitive en temps réel consiste à analyser par ChIP la liaison d'un compétiteur d'un facteur de transcription sur un promoteur naturel à l'intérieur d'une cellule. En exprimant en large excès le compétiteur par rapport à la protéine sauvage, il est possible de suivre par ChIP au cours du temps, la dissociation de la protéine native et l'association du compétiteur sur le promoteur (Figure 11). La résolution de cette technique est dépendante du temps de saturation des sites de liaison par le compétiteur. Par rapport au FRAP, cette technique est moins coûteuse et permet de cibler des promoteurs naturels, elle ne permet cependant d'étudier que des événements de l'ordre de la dizaine de minute (Nalley et al., 2006; Yu and Kodadek, 2007).

#### 3.4.5.1. GAL 4 (Chip levure)

La dynamique du facteur de transcription GAL4 sur le promoteur GAL1/10 et GAL3 a été étudiée par la technique de CHIP compétitive en temps réel. Cette technique consiste à mettre en compétition la protéine native GAL4 avec un compétiteur Myc-GAL4(DBD)-ER(LBD)-VP16(AD) (Figure 11). Dans une souche de levure dépourvue de GAL4, après ajout d'œstradiol, le compétiteur est capable de se lier au promoteur GAL1/10 rapidement (1 à 5min) et d'atteindre un maximum en 15 min.

Dans une souche normale de levure, en condition inductrice, c'est-à-dire en présence de galactose dans le milieu de culture, le facteur de transcription GAL4 reste associé avec le promoteur GAL1/10 et ce même en large excès du compétiteur. Au cours des 60 minutes d'analyse, seule une faible quantité du compétiteur a été échangée sur le promoteur, suggérant que la liaison GAL4-GAL1/10 est plutôt stable. En condition non inductrice, dans un milieu contenant du glycérol ou de l'acide lactique, le facteur GAL4 est rapidement échangé par le compétiteur, après ajout d'œstradiol, avec un  $t_{1/2}$  de 5 minutes ou moins. Le facteur GAL4 est plus labile en condition non inductrice (Nalley et al., 2006).

#### 3.4.5.2. Le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$ )

Le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1) est un acteur important du système de perception de l'oxygène. HIF-1 est un facteur de transcription hétérodimérique composé des sous-unités : HIF-1 $\beta$  exprimée de façon constitutive et HIF-1 $\alpha$  exprimé en condition d'hypoxie. L'hétérodimère peut se lier à des séquences de réponse à l'hypoxie (HRE) présentes dans certains promoteurs. La dynamique du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  a été étudiée par CHIP compétitive. Le compétiteur HLG est composé du domaine de liaison de l'ADN de HIF-1 $\alpha$ , du domaine d'interaction avec HIF-1 $\beta$  fusionné au domaine de liaison du ligand du récepteur au glucocorticoïde (GR-LBD), permettant de contrôler l'activation du compétiteur, et de la protéine eGFP. Après induction de l'hypoxie et ajout de l'agoniste, le compétiteur s'échange avec une demi-vie d'environ 1 heure, formant ainsi un complexe stable, s'échangeant très peu au cours du temps. La stabilité du facteur de transcription est dépendante de la présence du domaine de transactivation et est aussi régulée par l'activité du protéasome (Yu and Kodadek, 2007).

### 3.5. Généralités sur la dynamique des facteurs de transcription

Les expériences réalisées au cours de la dernière décennie s'accordent sur une dynamique rapide des facteurs de transcription en cellules vivantes, que ce soit sur site d'activité spécifique et dans des positions aléatoires dans le noyau. Ces expériences s'accordent aussi sur le fait que ces facteurs de transcription se lient de façon transitoire sur les promoteurs, et sur la chromatine

(Rafalska-Metcalf and Janicki, 2007; Darzacq et al., 2009). Cependant les temps de résidence varient de quelques millisecondes à une centaine de secondes. Il est nécessaire de porter attention aux différents biais qui pourraient résulter i) de la phase d'acquisition : prise en compte difficile de la mobilité cellulaire, du photoblanchiment, des processus de diffusion lors de la durée du photoblanchiment, ou ii) de la phase d'analyse : choix du modèle de simplification par rapport au processus réel (Mueller et al., 2008; Beaudouin et al., 2006). Une étude récente en FCS et FRAP a montré que les données pouvaient, si on ne prenait pas en compte un certain nombre de corrections, entraîner des variations sur le temps de résidence d'au moins un ordre de magnitude (Stasevich et al., 2010b). Pour les analyses réalisées de façon aléatoire dans le noyau, la majorité des interactions observées correspondent à des interactions non spécifiques avec la matrice nucléaire. L'interprétation de ces données dépend principalement du nombre d'interactions spécifiques. Ainsi si les interactions spécifiques ne comptent que pour un faible pourcentage, il n'est pas surprenant que les cinétiques de récupération soient rapides, vu que la majorité des interactions détectées correspondent à des interactions non spécifiques (Hager et al., 2009; van Royen et al., 2011; Beaudouin et al., 2006).

La combinaison de plusieurs techniques d'analyse permet de mieux comprendre les mécanismes et la dynamique de certaines protéines. Un bel exemple de ce type d'analyse a été réalisé pour la protéine hétérochromatique 1 (HP1). Les expériences de FRAP ont permis de mettre en évidence l'existence de trois classes de site de liaison. La première classe correspond aux sites non spécifiques présents le long de la chromatine, avec un  $k_{1,off}$  de  $5 \text{ s}^{-1}$ , la seconde classe d'importance plus forte sur l'hétérochromatine que sur l'euchromatine a un  $k_{2,off}$  de  $0,15 \text{ s}^{-1}$ . Enfin la troisième classe présente uniquement sur l'hétérochromatine, a un  $k_{3,off}$  de  $0,008 \text{ s}^{-1}$ . HP1 diffuse avec une constante apparente de  $0,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$  sur l'hétérochromatine et  $0,13 \mu\text{m}^2/\text{s}$  sur l'euchromatine, données obtenues en FRAP et confirmée en FCS. La FCS a aussi permis de déterminer que la concentration de HP1 sur l'eu- ou l'hétérochromatine est de l'ordre du micromolaire (Müller et al., 2009).

Il existe tout de même quelques exceptions à la dynamique rapide des facteurs de transcription. Hormis les résultats obtenus en ChIP compétitive, qui nécessiteraient confirmation avec une technique différente telle que la FRAP ou la FCS, deux facteurs de transcription présentent des dynamiques ralenties sur leurs promoteurs : Ace1 et HSF1. D'autres facteurs tels que pRB, E2F mais aussi le facteur TFIID dans les cellules primaires dérivées de tissus, présentent aussi une dynamique ralentie. Ces facteurs pourraient répondre à un modèle d'assemblage différent, de stabilité induite. Les facteurs pourraient s'associer et se dissocier de l'ADN de façon rapide,

rencontrer et se lier à d'autres facteurs, formant des complexes qui pourraient entraîner une augmentation du temps de résidence sur l'ADN (Hemmerich et al., 2011). Un effet similaire est obtenu pour des liaisons coopératives de plusieurs domaines de liaison à l'ADN, comme démontré pour l'histone de liaison H1 (Stasevich et al., 2010a). Certains facteurs pourraient être régulés de façon dépendante du type cellulaire ou du tissu, exploitant des temps de résidence différents pour un réglage fin de la réponse transcriptionnelle (Stavreva et al., 2012; Hemmerich et al., 2011).

## **4. HSF1 et la réponse au stress thermique**

La découverte de la réponse au choc thermique fut fortuite et accréditée à Ritossa au début des années 1960 (Ritossa, 1996). Il découvrit après une élévation de température un changement dans le profil des « puffs » des chromosomes polyténiques de drosophile, associé à une expression rapide d'ARN (Ritossa, 1996; Ritossa and Von Borstel, 1964). La réponse au choc thermique est universelle et conduit à l'expression des protéines de choc thermique (HSPs) en réponse à différents stimuli environnementaux, comme des modifications du milieu extérieur (choc thermique, stress oxydant, hypoxie) ou des agents chimiques (métaux lourds, solvants, drogues) ou physiopathologiques (réponse immunitaire et inflammatoire (Amici et al., 1992), différenciation). L'effet de cette réponse est transitoire et dépendante du type de cellules étudiées et de la sévérité du stress. En plus d'induire l'expression des protéines HSP, la réponse au choc thermique induit un arrêt global de la production de la majorité des protéines exprimées constitutivement et empêche l'accumulation des protéines mal repliées limitant la formation d'agrégats toxiques à l'intérieur de la cellule (Lindquist, 1986; Anckar and Sistonen, 2011; Morimoto, 1993).

### **4.1. Les effecteurs de la réponse au choc thermique**

Chez la bactérie *Escherichia coli*, les gènes de choc thermique sont sous le contrôle d'un facteur de transcription spécifique  $\sigma_{32}$ , qui dirige l'ARN polymérase aux promoteurs (Arsène et al., 2000). Chez les eucaryotes, la réponse au choc thermique est régulée par des facteurs de transcription spécifiques : les facteurs de choc thermique (HSFs).

#### **4.1.1. La famille des facteurs de transcription HSF**

Chez la levure, la drosophile et le nématode, il existe un gène unique codant pour HSF, alors que chez les vertébrés il existe plusieurs gènes codant pour des membres de la famille HSF (HSF1 à 4). Parmi tous ces HSFs, le domaine le plus conservé est le domaine de liaison à l'ADN, qui permet la reconnaissance des sites de réponse au choc thermique (HSE). Bien que tous les membres de la

famille HSF soient capables de protéger la cellule contre les effets du stress, ils possèdent des modes d'actions différents (Fujimoto and Nakai, 2010).

#### *4.1.1.1. HSF1*

HSF1 est le régulateur majeur de la réponse au choc thermique chez les mammifères. Il correspond au gène unique de la levure, de la drosophile et du nématode. HSF1 est responsable de l'expression de protéines de choc thermique en réponse au stress. Il joue aussi un rôle majeur dans la maintenance de l'intégrité cellulaire, notamment via le processus de thermotolérance (McMillan et al., 1998; Lindquist, 1986). Au-delà de la réponse au choc thermique, HSF1 est impliqué dans de multiples processus biologiques tels que la réponse immunitaire et inflammatoire, le développement, la gamétogénèse, la mise en place des organes sensoriels, ... (Akerfelt et al., 2007; Abane and Mezger, 2010; Nakai et al., 2000). Via son interaction avec des histones déacétylases (HDAC 1 et 2), HSF1 est capable d'induire une répression globale de la transcription en modulant les marques épigénétiques (Fritah et al., 2009). Récemment, HSF1 a été décrit comme pouvant induire un redémarrage du rythme circadien des cellules de souris soumises à une élévation de température, via la capacité d'HSF1 à réguler l'expression du facteur de transcription mPer2 (Tamaru et al., 2011).

HSF1 est un facteur de transcription exprimé de façon constitutive dans la plupart des tissus et types cellulaires. Il est régulé majoritairement par des modifications post-traductionnelles et des interactions intra- et intermoléculaires (Björk and Sistonen, 2010; Fujimoto and Nakai, 2010).

#### *4.1.1.2. HSF2*

HSF2 a longtemps été associé uniquement aux processus de développement et de différenciation, notamment dans la gamétogénèse et le développement du cerveau (Abane and Mezger, 2010). L'activité de HSF2 serait régulée par son niveau d'expression. En condition normale, HSF2 existe majoritairement sous forme de dimères, dans le cytoplasme des cellules, mais acquiert son activité de transcription sous forme trimérique (Björk and Sistonen, 2010; Sheldon and Kingston, 1993). En condition de choc thermique, HSF2 est capable, via une interaction avec HSF1, de réguler l'expression des protéines de choc thermique. Il est capable d'induire l'expression de gènes hsp70 et hsp25. De façon intéressante, HSF2 est capable de réprimer l'expression des gènes hsp40 et hsp110. La régulation par HSF2 est dépendante de l'intégrité de la protéine HSF1 et notamment de son domaine de liaison à l'ADN (Ostling et al., 2007). HSF2 en formant des hétérotrimères avec HSF1 est aussi capable d'induire la transcription de séquences répétées satellite III à l'intérieur de structures appelées corps nucléaires de stress (nSBs). De plus la surexpression d'HSF2 entraîne son activation de façon dépendante de sa concentration. Il est

alors capable de s'hétérotrimériser avec HSF1 même en absence de choc thermique et d'induire la transcription des gènes hsp et des séquences sat III (Ostling et al., 2007; Sandqvist et al., 2009).

#### *4.1.1.3. HSF3*

Il a longtemps été pensé que le facteur HSF3 était un facteur spécifique des aviaires et notamment du poulet. Cependant un homologue d'HSF3 a été retrouvé chez la souris, mais ces deux HSF présentent des propriétés très différentes. Alors que HSF3 de poulet est le régulateur majeur de la réponse au choc thermique et est capable d'induire la transcription des protéines de choc thermique (HSP), le HSF3 de souris est lui incapable d'induire la transcription des HSPs, ni même de remplacer HSF1 chez les vertébrés ou HSF3 chez le poulet. Les protéines HSF1 de poulet et HSF3 de souris, sont cependant impliquées dans la réponse au choc thermique par l'expression de protéines de choc thermique non classiques (Fujimoto and Nakai, 2010). Chez l'homme il existe un pseudogène correspondant à HSF3, mais aucune trace de l'existence de la protéine n'a encore été rapportée.

#### *4.1.1.4. HSF4*

L'expression de HSF4 est restreinte à quelques tissus (cerveau, poumon, cristallin)(Tanabe et al., 1999). Comparé à HSF1 et HSF2, HSF4 ne possède pas de domaine répresseur de la trimérisation. Il est présent, en condition normale, sous la forme d'un trimère constitutivement lié à l'ADN. Il existe deux isoformes d'HSF4 issues d'un épissage alternatif, HSF4 $\alpha$  et HSF4 $\beta$  (Tanabe et al., 1999). Le premier est transcriptionnellement inopérant et fonctionne comme un répresseur de la transcription. Le deuxième, transcriptionnellement actif, est capable de réguler l'expression de gènes impliqués dans le développement (Björk and Sistonen, 2010; Pirkkala et al., 2001). Comme pour HSF2, l'activité d'HSF4 est dépendante de sa concentration. HSF4 intervient comme HSF1, dans le développement d'organes sensoriels notamment dans la formation du cristallin (Sakurai and Enoki, 2010; Akerfelt et al., 2007). Dans les cellules épithéliales, les deux facteurs auraient un effet opposé sur l'expression de facteurs de croissance FGFs. Alors que dans les cellules de la fibre cristalline, les deux facteurs coopéreraient pour la régulation de l'expression des protéines  $\gamma$ -cristallin (Abane and Mezger, 2010). HSF4 faciliterait dans certains cas la liaison d'HSF1 sur les promoteurs, en induisant la déméthylation de H3K9 (Fujimoto et al., 2008).

### *4.1.2. Les cibles d'HSFs : les éléments de réponse au stress (HSE)*

Le site de liaison des protéines HSFs, aussi appelé élément de réponse au choc thermique (HSE), consiste en un groupe de répétitions inversées du motif nGAAn (Pirkkala et al., 2001). Chaque domaine de liaison à l'ADN d'HSF est capable de reconnaître une séquence pentamérique.

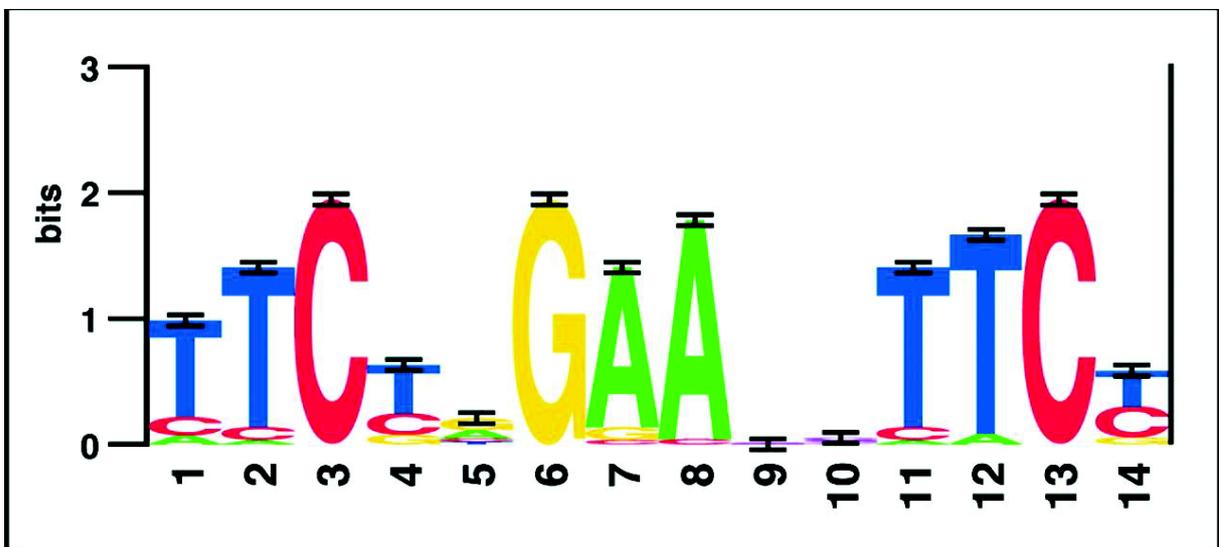


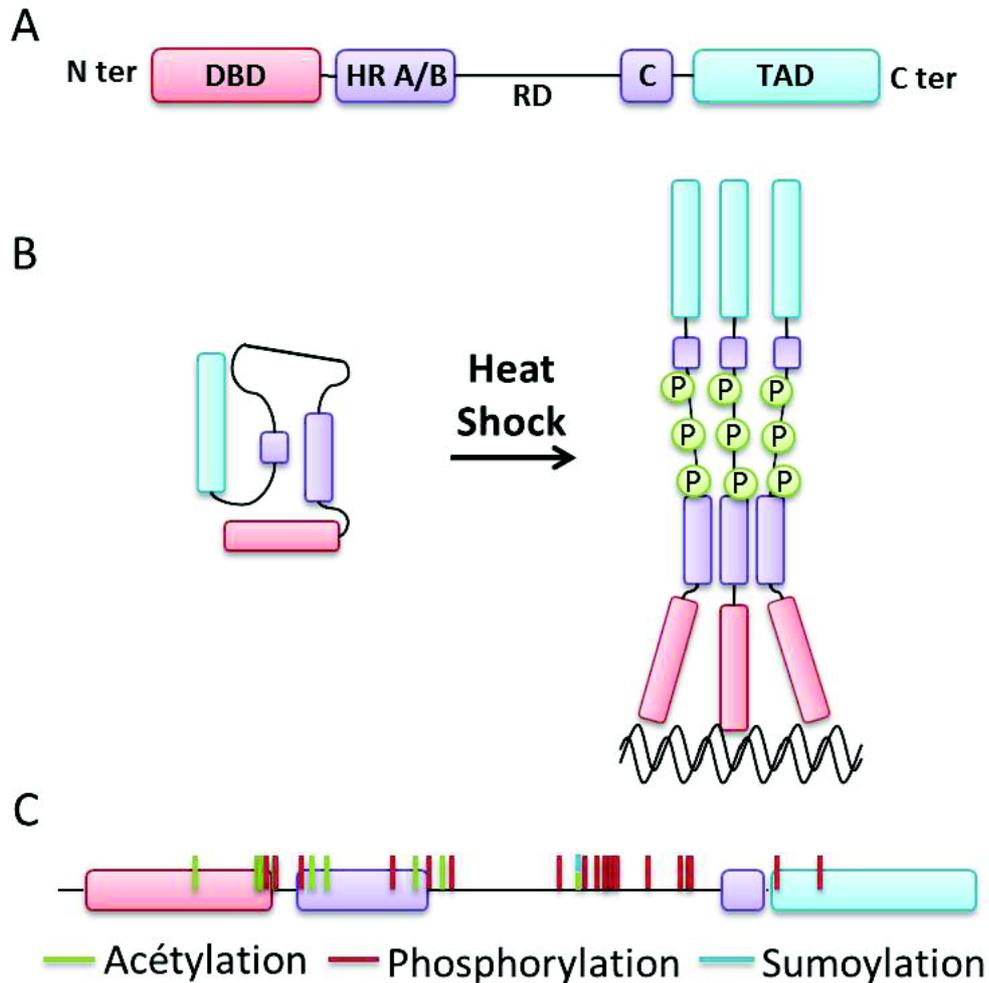
Figure 12 Représentation du consensus du motif HSE

La séquence de base est constituée du motif nGAAn répété de façon inverse pour former le consensus HSE reconnu par HSF1. (D'après Trinklein, et al., 2004).

Ainsi une séquence HSE parfaite est constituée d'au moins trois répétitions du motif (Figure 12). Il existe d'autres types d'HSE qui divergent par le nombre de répétitions, mais aussi l'espacement de ces répétitions. Chaque HSF présente des affinités particulières pour ces HSE, ainsi HSF1 lie préférentiellement les longues répétitions d'HSE parfaites, HSF2 les répétitions courtes et HSF4 les répétitions espacées (Yamamoto et al., 2009). La grande diversité des HSE, les affinités particulières des différents HSFs et le fait que les protéines HSFs soient impliquées dans différents processus tels que le développement, la croissance, la réponse inflammatoire, la gamétogénèse ... ont conduit à l'hypothèse que les cibles d'HSF1 devaient sûrement dépasser les simples gènes de choc thermique.

Différentes analyses à l'échelle du génome ont permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs centaines de cibles pour HSF1 en réponse au choc thermique. Chez la levure, HSF1 est capable de se lier sur environ 165 gènes représentant environ 3% du génome de la levure. Parmi ces gènes, les gènes classiques de réponse au choc thermique sont présents, mais aussi des gènes impliqués dans des processus biologiques variés, tels que le transport vésiculaire, la maintenance de la membrane cellulaire et du cytosquelette, le métabolisme glucidique, la génération d'énergie, la transduction du signal et les mécanismes de défense du stress oxydatif (Hahn, 2008). De façon intéressante, 7% des gènes identifiés ne sont pas surexprimés ou sont même réprimés en réponse au choc thermique, confortant le rôle d'HSF1 dans la répression de la transcription de certains gènes. Le même type d'analyse chez l'homme a permis d'identifier 176 gènes cibles d'HSF1 en réponse au choc thermique. Comme chez la levure, un grand nombre de ces gènes ne correspondent pas aux protéines classiques de choc thermique, de même certains gènes semblent réprimés par HSF1. Parmi les gènes répondant au choc thermique, certains ne sont pas liés par HSF1, impliquant l'existence d'un mécanisme de réponse au choc thermique indépendant d'HSF1 ou en coordination avec d'autres facteurs (Trinklein et al., 2004).

Récemment, la découverte d'une interaction entre HSF1 et des séquences Alu a permis d'étendre et de comprendre un peu plus le mode d'action d'HSF1 en réponse au choc thermique. Les séquences Alu sont des petits fragments d'ADN d'environ 280 pb, spécifiques des humains et des primates. Ces éléments représentent environ 10% du génome (Jasinska and Krzyzosiak, 2004). Ils possèdent de multiples sites de liaison pour des facteurs de transcription, dont HSF1. Le site consensus de liaison d'HSF1 dans les séquences Alu est différent de celui défini précédemment, il est formé de 13 pb formant le site suivant : nCAGAAGCTCCG. Une analyse à l'échelle du génome a permis de déterminer qu'en réponse au choc thermique 1284 gènes sont régulés positivement alors que 2995 sont régulés négativement. Environ 50% des gènes dont l'expression est modifiée en réponse au choc thermique lie HSF1 à la fois dans les séquences Alu et non-Alu.



**Figure 13 Structure d'HSF1 et son activation en réponse au choc thermique**

A. Structure de la protéine HSF1. En N-terminal se trouve le domaine de liaison à l'ADN suivi du domaine de trimérisation. Au centre de la protéine se trouve le domaine de régulation. En position C-terminale se trouve le domaine HR-C et le domaine de transactivation. B. l'activation d'HSF1 est un processus multi-étape qui entraîne le passage d'HSF1 d'un état monomérique à 37°C, à un état trimérique à 43°C. Le trimère d'HSF1 acquiert une activité de liaison à l'ADN, puis il est hyperphosphorylé. C. Position des différents sites de modifications post-traductionnelles d'HSF1. La majorité des sites de phosphorylation est localisée dans le domaine de régulation.

De façon remarquable, un grand nombre de sites de liaison d'HSF1 à l'intérieur des séquences Alu est orienté de manière antisens dans les gènes régulés négativement. La synthèse d'ARN antisens par HSF1 sur les séquences Alu, permettrait de séquestrer les ARN des gènes régulés négativement (Pandey et al., 2011).

## **4.2. La structure de la protéine HSF1**

La protéine HSF1 est à l'état monomérique dans les cellules non stressées, en conditions de stress, HSF1 est rapidement converti en une forme transcriptionnellement active à travers un processus multi-étapes. Ainsi HSF1 passe de l'état monomérique à un état trimérique capable de se lier à l'ADN et il subit de multiples modifications post-traductionnelles (Figure 13) (Sarge et al., 1993). Toutes ces étapes vont entraîner l'activation d'HSF1 qui implique différents domaines et différents acteurs détaillés ci-dessous.

La protéine HSF1 est composée de quatre sous-parties : un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de trimérisation (TRIM), une région régulatrice (RD), et un domaine de transactivation (TAD). Chacun de ces domaines joue un rôle important dans la régulation et l'activité d'HSF1 au cours de la réponse au stress thermique.

### **4.2.1. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)**

Le domaine de liaison à l'ADN est le domaine le mieux conservé à travers tous les HSFs et c'est aussi le seul domaine d'HSF1 pour lequel la structure cristallographique soit disponible. Le domaine de liaison à l'ADN d'HSF1 est de type Hélice Tour Hélice « ailé » (wHTH), contrairement aux autres facteurs de transcription HTH. La boucle du domaine DBD d'HSF1 n'interagit pas avec l'ADN, mais stabilise le trimère d'HSF1 lié à l'ADN par des interactions protéine-protéine (Lu et al., 2009). Le domaine est composé de trois hélices  $\alpha$  et de quatre feuillets  $\beta$ , la reconnaissance des séquences HSE sur les promoteurs ayant lieu par l'intermédiaire de l'hélice 3, alors que l'hélice 1 joue un rôle dans le repliement du domaine DBD et d'HSF1 après choc thermique (Lu et al., 2009; Vuister et al., 1994). La forme monomérique d'HSF1 a peu d'affinité pour les HSE *in vitro*, cette affinité augmentant considérablement après trimérisation. De plus, de multiples promoteurs cibles d'HSF1 possèdent de larges répétitions de nGAAn ou plusieurs HSE, ce qui favorise la liaison du trimère et la coopérativité des domaines de liaison à l'ADN (Trinklein et al., 2004; Anckar and Sistonen, 2011). C'est le cas par exemple du promoteur du gène *hsp70*, qui possède dans sa région proximale un HSE composé de 5 répétitions inversées du consensus nGAAn, ayant la capacité de lier deux trimères d'HSF1 (Abravaya et al., 1991). La boucle du domaine de liaison à l'ADN a deux rôles majeurs. Cette boucle est variable en fonction des HSFs et confère à chaque HSF une spécificité de liaison envers différents HSE. Le deuxième rôle de la boucle est de stabiliser

les trimères d'HSF1, en formant des interactions avec les trois domaines DBD, favorisant ainsi la coopérativité de liaison (Ahn et al., 2001).

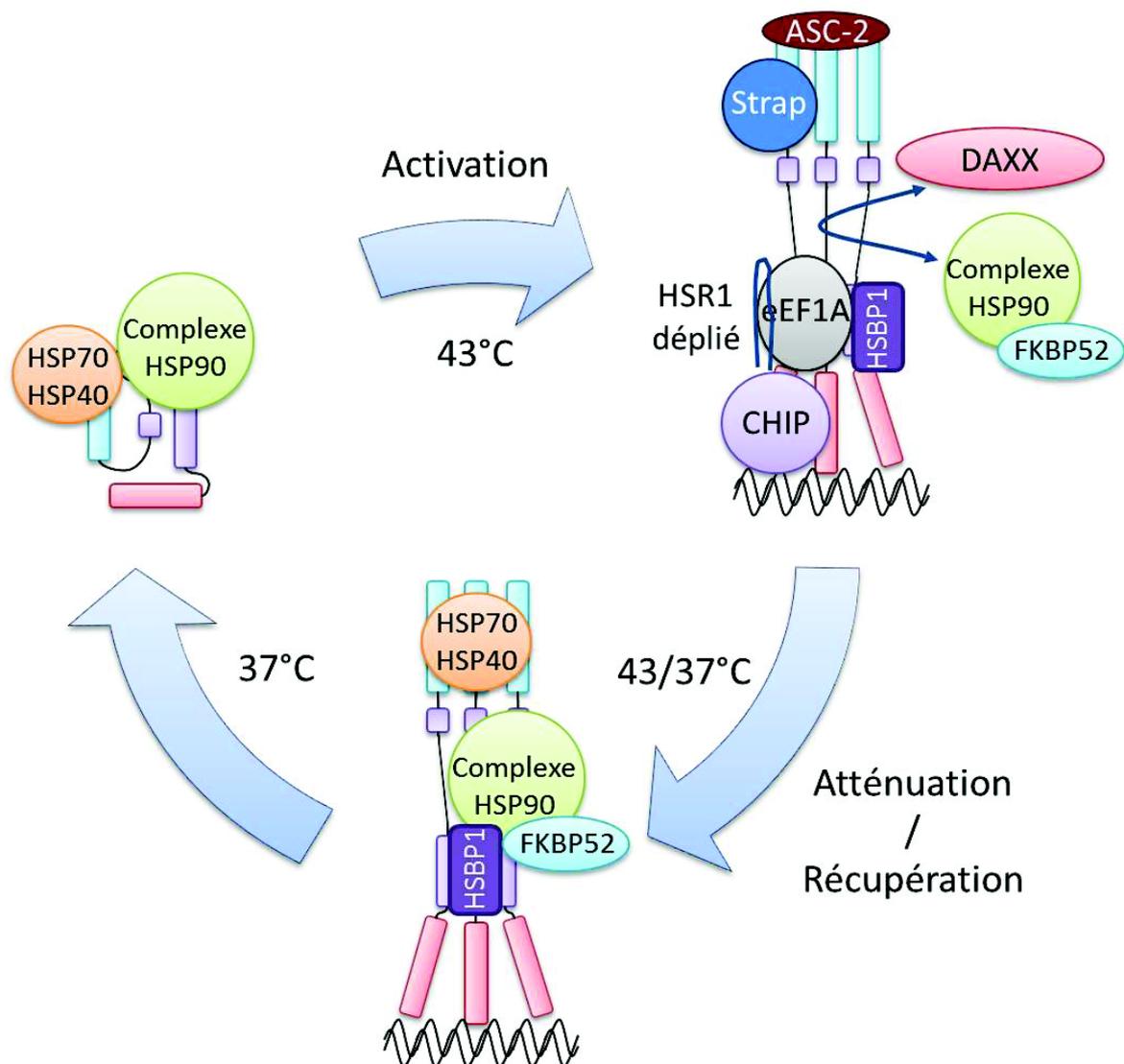
La région située entre le domaine DBD et le domaine de trimérisation, aussi appelée région de liaison (« linker domain ») joue le rôle d'une plateforme capable de réguler différents processus. Ce domaine est capable de fermer le domaine de liaison à l'ADN par des interactions hydrophobes, par la même occasion il est aussi capable de moduler la trimérisation d'HSF1 en réponse au choc thermique (Liu and Thiele, 1999).

#### ***4.2.2. Le domaine de trimérisation (TRIM)***

Le domaine de trimérisation est situé juste après le domaine de liaison à l'ADN. Ce domaine riche en hélices- $\alpha$ , comprend deux sous-domaines (HR-A et HR-B) qui sont des « Heptad Repeat » hydrophobes, caractéristiques des structures en faisceau d'hélice de type « leucine zipper » (Zuo et al., 1995; Zuo et al., 1994; Baler et al., 1993). La formation du trimère HSF1 à partir de ces domaines est inhabituelle, vu que ces domaines sont plus souvent impliqués dans la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères (Zuo et al., 1994). La trimérisation spontanée est supprimée par un troisième sous-domaine HR-C contenu entre les régions régulatrices et de transactivation. HR-C serait capable de se replier sur les sous-domaines HR-A et B et d'interagir avec eux en formant une structure de faisceau d'hélice intramoléculaire (Rabindran et al., 1993; Zuo et al., 1994). Le changement d'interaction et les modifications post-traductionnelles induites par le choc thermique provoqueraient un changement conformationnel qui libérerait les sous-domaines HR-A et B du domaine HR-C permettant ainsi la trimérisation d'HSF1 (Zuo et al., 1994). Le domaine HR-C est manquant dans HSF4 et dans l'HSF de levure, ce qui rend ces facteurs constitutivement trimériques. Il existe aux deux extrémités du domaine HR-A/B, deux signaux de localisation nucléaires (NLS) qui permettent la localisation nucléaire d'HSF1 (Zuo et al., 1995).

#### ***4.2.3. Le domaine de régulation (RD)***

Le domaine de régulation exerce un contrôle négatif sur le domaine de transactivation en condition normale. Il est aussi capable de détecter les conditions de stress, pour permettre l'activation du domaine TAD (Newton et al., 1996). Ce domaine est aussi la cible de différentes formes de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation et la sumoylation suggérant que la détection du stress et le rétrocontrôle du domaine TAD peuvent être modulés par les signatures de modifications post-traductionnelles du domaine RD (Anckar and Sistonen, 2011).



**Figure 14 Régulation de l'activation d'HSF1 en réponse au choc thermique**

La régulation de l'activité d'HSF1 implique de multiples partenaires au cours du temps. A 37°C, HSF1 est maintenu sous forme monomérique via un complexe de chaperonnes HSP90 ainsi que HSP70 et sa co-chaperonne HSP40. L'activation d'HSF1 entraîne la dissociation des complexes de chaperonnes, et l'association de nouveaux facteurs tels que DAXX, la protéine CHIP, la protéine HSBP1 et la protéine eEF1A. La protéine DAXX est en compétition avec le complexe de chaperonnes HSP90. Sous forme active la protéine HSF1 lie de multiples facteurs qui favorisent son activité de transcription. Lors de la phase de récupération le complexe HSP70/HSP40 se lie au niveau du domaine TAD et entraîne l'arrêt de l'activité de transcription. Le retour à l'état normal s'accompagne de la liaison du complexe de chaperonnes HSP90 et de la dissociation de la protéine HSBP1.

#### 4.2.1. *Le domaine de transactivation (TAD)*

A l'opposé de la partie N terminale qui entraîne la trimérisation et la liaison à l'ADN, la partie C terminale facilite l'activité de transcription des gènes cibles et régule le niveau d'activation d'HSF1. Peu d'informations sont disponibles sur la structure du domaine, il semble cependant qu'il soit majoritairement non replié. Le domaine TAD contient deux domaines d'activation, AD1 et AD2. Le premier domaine, AD1 a été le plus étudié. Il peut être restreint à 20 acides aminés, riches en acides aminés hydrophobes formant une petite hélice- $\alpha$ , qui constitue un motif permettant l'interaction avec la protéine TAF9 (Choi et al., 2000). Les acides aminés hydrophobes ainsi que deux acides aminés acides sont critiques pour la capacité de transactivation et cette capacité ne semble pas modulée par des modifications post-traductionnelles à l'intérieur de ce domaine (Newton et al., 1996). Le domaine AD2 est moins bien défini, et aucune structure particulière n'a pu être identifiée. *In-vitro* les deux domaines stimulent à la fois l'initiation et l'élongation de la transcription, via des interactions avec des protéines telles que TBP, TFIIB, TFIIA et des TAFs (Yuan and Gurley, 2000). Le domaine TAD interagit aussi avec des protéines du complexe médiateur MED17 (TRAP80) et MED23, facilitant l'activité de transactivation d'HSF1 (Park et al., 2001; Kim et al., 2004). Le processus d'initiation de la transcription, après choc thermique, est facilité par la capacité d'HSF1 à interagir via son domaine TAD, avec la protéine BRG1, membre du complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant SWI/SNF (Sullivan et al., 2001).

### 4.3. La régulation de l'activité d'HSF1

#### 4.3.1. *Les mécanismes senseurs du stress*

Vu la grande diversité d'inducteurs de choc thermique, et les différents facteurs de la famille HSF, il a longtemps été postulé qu'il devait exister plusieurs modes d'activation d'HSF1. Les premières hypothèses ont porté sur un mécanisme d'autorégulation. En effet, HSF1 est capable de se trimériser *in-vitro* en réponse à une élévation de température ou un traitement au peroxyde d'hydrogène. Cependant la trimérisation d'HSF1 dans des cellules de drosophile ou du xénope a lieu à une température inférieure, caractéristique des cellules considérées, démontrant que ce n'est pas uniquement la température qui entraîne l'activation d'HSF1 (Baler et al., 1993). La surexpression d'HSF1 en cellule, entraîne sa trimérisation et son activation spontanée même en absence de choc thermique, indiquant qu'il existe une entité titrable, capable de réprimer HSF1 en condition normale (Zuo et al., 1995) (Figure 14). Cette entité est un complexe multi-chaperonnes contenant la protéine HSP90, ce complexe composé en partie des protéines HSP90, p23 et immunophiline, interagit avec HSF1 en condition normale et empêche sa trimérisation. (Voellmy and Boellmann, 2007).

L'activation d'HSF1 est un processus multi-étape, la trimérisation ne suffisant pas à induire l'activation de la transcription, d'autres éléments activateurs ou répresseurs entrent en jeu. Il existe un mécanisme activateur de l'activité d'HSF1 conduit par un complexe ribonucléoprotéique. L'activation d'HSF1 serait facilitée par la protéine eEF1A (« Translation elongation factor 1A »), et un ARN non codant HSR1. C'est un ARN de 604 nucléotides dont l'expression est constitutive et n'est pas modifiée par le choc thermique (Shamovsky et al., 2006). Il est possible que l'ARN HSR1 serve de thermosenseur via des changements conformationnels induits par l'élévation de la température. D'autres facteurs interviennent au cours de la réponse au choc thermique pour activer HSF1. C'est le cas de la protéine DAXX (« Death domain-associated protein ») qui interagit avec HSF1 sous forme trimérique et entre en compétition avec un complexe répresseur composé de plusieurs chaperonnes (Boellmann et al., 2004). D'autres protéines interagissent avec HSF1 en réponse au choc thermique et facilitent son activité de transcription, c'est le cas par exemple de la protéine CHIP (Carboxy terminus of the Hsc-70-Interaction Protein, (Kim et al., 2005b)), mais aussi les protéines co-activatrices ASC-2 (Activating Signal Co-integrator 2, (Hong et al., 2004) et Strap (Stress-responsive activator of p300, (Xu et al., 2008)) (Figure 14). Une fois activé, le facteur de transcription HSF1 est aussi capable d'interagir via son domaine TAD avec de multiples protéines impliquées dans la régulation de la transcription (Yuan and Gurley, 2000). Ces différents mécanismes ne sont pas exclusifs les uns des autres et pourraient agir de concert pour permettre une réponse rapide et adaptée en fonction du type de stress appliqué (Anckar and Sistonen, 2011; Shamovsky and Nudler, 2008; Björk and Sistonen, 2010).

Après activation, plusieurs mécanismes permettent de réprimer l'activité d'HSF1 et entraînent un retour à l'état normal. Le complexe multi-chaperonnes contenant HSP90 interagit avec HSF1 lorsque ce dernier est sous forme trimérique (Bharadwaj et al., 1999). L'immunophiline FKBP52, inclus dans ce complexe n'est présente que sur la forme trimérique (Guo et al., 2001). La liaison de ce complexe permet d'inhiber l'activité de transactivation d'HSF1. Lors de la phase d'atténuation, la répression d'HSF1 s'effectue par l'intervention de chaperonnes telles que HSP70, sa co-chaperonne HSP40, ou encore Hdj1. La répression se fait par une interaction chaperonne substrat, à travers les domaines de liaison au substrat d'HSP70 et le domaine de transactivation d'HSF1 (Figure 14). Cette répression qui agit directement sur l'activité de transactivation n'est pas couplée à un retour immédiat à l'état monomérique d'HSF1 (Shi et al., 1998). Tous ces phénomènes vont dans le sens d'une boucle d'auto-régulation de l'activation d'HSF1 par les protéines de choc thermique. Ces dernières sont capables de détecter la présence de protéines mal-repliées qui s'accumulent rapidement après l'activation d'un choc thermique.

**Tableau 3 Liste des modifications post-traductionnelles d'HSF1**

Modification	Domaine	Effet	Action	Période	Enzyme	Référence
K80ac	DBD	inhibiteur	Inhibe liaison ADN	Récupération	p300	(Westerheide et al., 2009)
K116ac	DBD	?			p300	(Westerheide et al., 2009)
K118ac	DBD	?			p300	(Westerheide et al., 2009)
S121ph	DBD	inhibiteur	Favorise association avec HSP90	NHS	MAPK	(Wang et al., 2006)
K126ac	Linker	?			p300	(Westerheide et al., 2009)
S127ph	Linker	?				(Xu et al., 2012)
T142ph	HR-A/B	Activateur	Effet sur l'activation de la transcription	HS	CK2	(Soncin et al., 2003)
K148ac	HR-A/B	?			p300	(Westerheide et al., 2009)
K157ac	HR-A/B	?			p300	(Westerheide et al., 2009)
S195ph	HR-A/B	Activateur	Rupture interaction HRA/B et HRC			(Calderwood et al., 2010)
K208ac	HR-A/B	?			P300	(Westerheide et al., 2009)
S216ph	RD		Contrôle du cycle cellulaire, dégradation d'HSF1	Mitose	Plk1	(Lee et al., 2008)
K224ac	RD	?			P300	(Westerheide et al., 2009)
S230ph	RD	Activateur	Activation transcription	NHS, augmente en HS	CaMKII	(Holmberg et al., 2001)
s292ph	RD	?		HS		(Guettouche et al., 2005)
K298su	RD	Inhibiteur	Conserve HSF1 dans état inactif via RD	HS	Ubc9	(Hietakangas et al., 2006)
K298ac	RD	?			P300	(Westerheide et al., 2009)
S303ph	RD	Inhibiteur	En NHS, nécessite s307ph, favorise Sumo K298, interaction 14-3-3, impact localisation, répression transcription	NHS, HS et récupération	GSK3 $\beta$	(Kline and Morimoto, 1997; Chu et al., 1998)
s307ph	RD	Inhibiteur	Interaction 14-3-3, impact localisation, répression transcription	NHS, HS et récupération	ERK1	(Kline and Morimoto, 1997; Calderwood et al., 2010; Chu et al., 1998)
S314ph	RD	?		HS		(Guettouche et al., 2005)
S319ph	RD	?		HS		(Guettouche et al., 2005)
S320ph	RD	Activateur	Favorise localisation nucléaire, impact sur activité de transcription, favorise l'interaction avec p300	HS	PKA $\alpha$	(Murshid et al., 2010; Zhang et al., 2011)
T323ph	RD	?				(Xu et al., 2012)
S326ph	RD	Activateur	Activation transcription, interaction avec DAXX, compétition avec le complexe multichaperones	HS, corrèle avec trimérisation et début récupération	mTOR	(Boellmann et al., 2004; Chou et al., 2012)
S344ph	RD	?		HS		(Guettouche et al., 2005)
S363ph	RD	Inhibiteur		HS et récupération	PKC, JNK	(Chu et al., 1998)
T367ph	RD	?				(Xu et al., 2012)
S368ph	RD	?				(Xu et al., 2012)
T369ph	RD	?				(Xu et al., 2012)
S419ph	TAD	Activateur	Rôle dans la translocation nucléaire	HS	PLK1	(Kim et al., 2005a)
S444ph	TAD	?		HS		(Guettouche et al., 2005)

ph = phosphorylation, ac = acétylation, su = sumoylation

En réponse au choc thermique, les chaperonnes libéreraient HSF1 qui s'activerait, entraînant la production de nouvelles HSPs. Quand la quantité de protéines mal-repliées retourne à un niveau normal, les protéines HSPs en excès seraient capable de recapturer et réprimer HSF1, exerçant ainsi une boucle de rétrocontrôle. (Voellmy and Boellmann, 2007; Anckar and Sistonen, 2011).

Un autre régulateur négatif de l'activité d'HSF1 est la protéine HSBP1. HSBP1 est une petite protéine de 76 acides aminés, dont la structure ressemble fortement aux domaines HR de HSF1. Elle est capable d'interagir avec la forme trimérique d'HSF1 et possède un effet négatif sur la capacité de transactivation d'HSF1 (Satyal et al., 1998).

#### *4.3.2. Les modifications post-traductionnelles*

L'activation d'HSF1 est un processus qui peut être séparé en deux étapes : i) la trimérisation et l'acquisition d'une activité de liaison à l'ADN et ii) une activation de l'activité de transactivation. La deuxième étape est découplée des deux premières. En effet certains activateurs d'HSF1, tels que l'acide salicylique ou le stress oxydant, sont capables de former des trimères d'HSF1 possédant une activité de liaison à l'ADN, mais ne sont pas capables d'induire la transcription des ARNm hsp70 (Bruce et al., 1993; Jurivich et al., 1992). Ainsi les activateurs d'HSF1 n'utilisent pas tous la même voie d'activation. Une des différences principales dans l'activation d'HSF1 pourrait résulter de différences au niveau des modifications post-traductionnelles d'HSF1. De multiples études ont montré que la régulation de l'activité d'HSF1 se fait majoritairement à l'aide de modifications post-traductionnelles, que ce soit lors de la phase d'activation ou de récupération (Tableau 3).

##### *4.3.2.1. Phosphorylation*

HSF1 est phosphorylé sur au moins 21 résidus sérine et quatre résidus thréonine (Xu et al., 2012; Anckar and Sistonen, 2011)(Tableau 3 et Figure 13-C). Une partie de ces phosphorylations est constitutive, c'est-à-dire qu'elles sont présentes à la fois en condition normale et en condition de stress, c'est le cas de la S303 et S307 (Pirkkala et al., 2001; Kline and Morimoto, 1997) . D'autres phosphorylations ont lieu lors de l'activation d'HSF1. La majorité des sites de phosphorylation sont situés dans le domaine de régulation. Beaucoup de ces sites ne semblent cependant pas liés à l'activité de transactivation d'HSF1 (Guettouche et al., 2005). Certaines phosphorylations sur les résidus T142, S195, S230 et S326 sont capables de stimuler la réponse au choc thermique (Anckar and Sistonen, 2011; Guettouche et al., 2005; Xu et al., 2012; Murshid et al., 2010). Ainsi la phosphorylation sur le résidu S195, situé au centre du domaine HR-B, permettrait la rupture de la liaison entre HR-B et HR-C, favorisant la libération d'HSF1 et la formation de trimères (Calderwood et al., 2010). La phosphorylation de S320 favoriserait l'import nucléaire (Murshid et al., 2010), et l'activité de transcription d'HSF1 via une interaction avec l'histone acétyl-transférase p300 (Zhang

et al., 2011). D'autres phosphorylations sont impliquées dans la répression d'HSF1 telles que la phosphorylation des résidus S121, S303, S307 et S363. La phosphorylation du résidu S121 inhibe la transactivation d'HSF1 et favorise sa liaison à HSP90. L'effet répresseur de la phosphorylation sur S303 est notamment médié par son implication dans la sumoylation d'HSF1 (Kline and Morimoto, 1997), et par son implication, avec la phosphorylation sur S307, dans la liaison de la protéine 14-3-3, menant à l'export nucléaire d'HSF1 (Xu et al., 2012).

#### *4.3.2.2. Sumoylation*

La phosphorylation de la sérine S303 sert de signal pour la sumoylation de la lysine K298. Les protéines SUMO ressemblent structurellement à l'ubiquitine mais n'ont pas la même fonction. Elles sont liées de façon transitoire et covalente sur les résidus lysine d'un grand nombre de protéines en suivant un motif consensus particulier  $\psi$ KxE ( $\psi$  correspond à un large acide aminé hydrophobe). Sur HSF1, ce motif est étendu et nécessite la phosphorylation d'une sérine adjacente, le nouveau motif  $\psi$ KxExxSP, est ainsi appelé motif de sumoylation dépendant de la phosphorylation (PDSM), et fut initialement découvert sur HSF1 puis retrouvé dans de multiples protéines dont plusieurs facteurs de transcription, dont HSF4 $\beta$ . La sumoylation d'HSF1 qui apparaît en réponse au choc thermique, a un effet inhibiteur sur l'activité de transcription, et permettrait au domaine RD de conserver HSF1 dans un état inactif en condition normale (Hietakangas et al., 2006). Une hypothèse pour expliquer l'effet répresseur de la sumoylation serait l'existence d'un co-répresseur capable d'interagir avec le motif SUMO (Anckar and Sistonen, 2011).

#### *4.3.2.3. Acétylation*

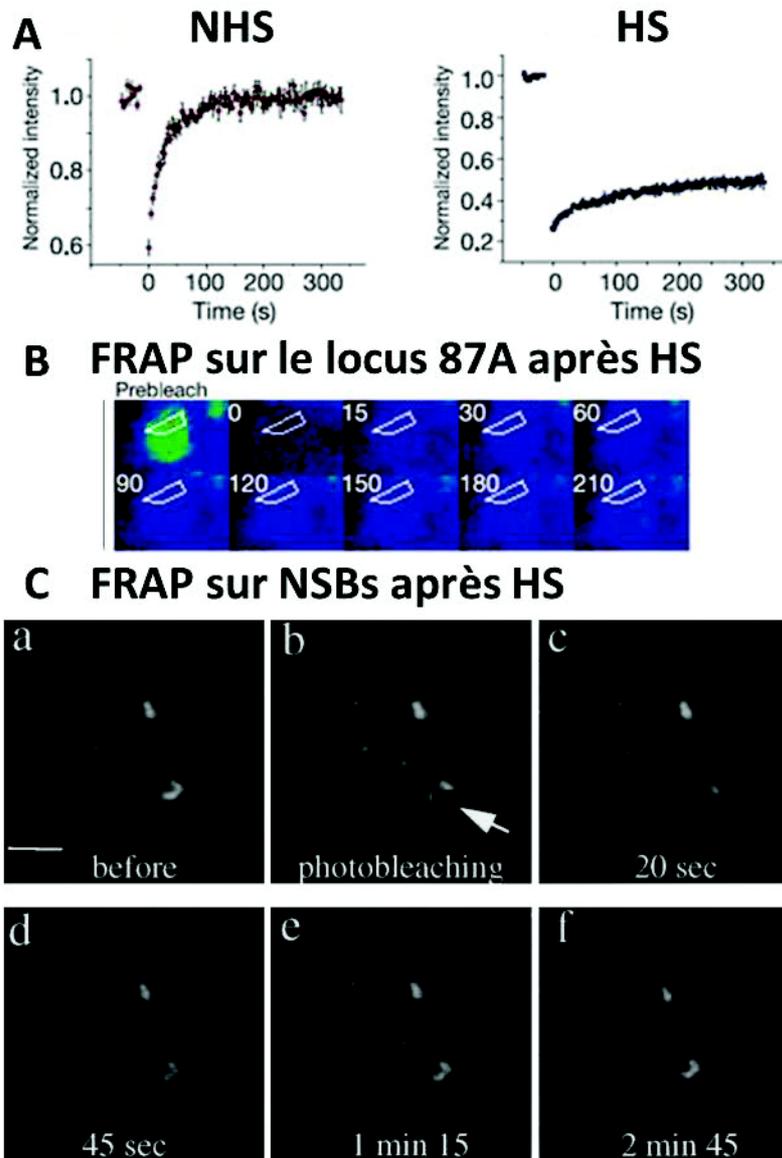
L'acétylation d'HSF1 en réponse au choc thermique complexifie encore un peu plus le processus de régulation d'HSF1 en réponse à différents stress. HSF1 est acétylé par l'acétylase p300/CBP (cAMP response element Binding Protein), la déacétylation est induite par la déacétylase SIRT1, de la famille sirtuine des déacétylases de classe III, NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) dépendante. L'acétylation a lieu sur au moins neuf lysines, qui contrairement à la phosphorylation sont réparties dans des domaines clés de l'activation d'HSF1 (DBD, HRA/B, le domaine linker entre le DBD et les HR, et le RD). En condition normale, HSF1 n'est pas acétylé. L'apparition des lysines acétylées ne suit pas et n'est pas dépendante de la phosphorylation d'HSF1, elle apparaît plus tardivement dans la réponse au choc thermique et notamment lors de la phase de récupération. L'acétylation d'HSF1 inhibe la liaison d'HSF1 sur le promoteur d'HSP70, et empêche la surexpression des principales HSPs. Ceci s'explique par l'acétylation d'HSF1 sur la lysine K80, située dans le domaine de liaison à l'ADN, cette lysine est en contact direct avec les groupements phosphates de l'ADN, ainsi la neutralisation de la charge positive de la lysine par l'ajout d'un

groupement acétyle inhibe l'interaction entre l'ADN et HSF1. Ce processus joue un rôle important dans la phase d'atténuation, permettant la libération d'HSF1 des promoteurs et l'arrêt de la synthèse des gènes hsp (Westerheide et al., 2009).

#### 4.4. Les corps nucléaires de stress

Un aspect plutôt surprenant et intéressant d'HSF1 est sa capacité à former des foyers à l'intérieur des noyaux des cellules en réponse au choc thermique (Sarge et al., 1993). La formation de ces foyers, appelés corps nucléaires de stress (nSBs, (Biamonti, 2004; Biamonti and Vourc'h, 2010)), est un processus rapide et réversible qui a lieu en réponse à différents stimuli entraînant une réponse au choc thermique (Jolly et al., 1997). Ces nSBs sont différents de tous les foyers déjà décrits dans le noyau des cellules (corps de Cajal, speckles nucléaires, kinetochores, nucléoles, ...), ils correspondent à l'accumulation d'HSF1 sur des foyers de taille entre 0,3 et 3  $\mu\text{m}$  et dont le nombre dépend de la ploïdie de la cellule considérée. Les nSBs se forment dès 30 secondes après choc thermique, et perdurent pendant plusieurs heures lors de la phase de récupération, en fonction de l'intensité et de la durée du choc initiale. De façon remarquable, lors de chocs répétitifs, les foyers se reforment à la même position, indiquant la présence d'une cible chromatinienne spécifique (Jolly et al., 1999). Cette cible correspond à la région péricentrique du chromosome 9 : la région 9q12. C'est une région constituée d'un large bloc d'hétérochromatine, formé de répétitions de séquences Satellite III (Jolly et al., 2002). Lors d'un choc thermique, cette région est associée avec une hyperacétylation des histones, alors que le reste du noyau est globalement déacétylé. De plus, une multitude de facteurs, telle que l'ARN polymérase II, l'histone acétyl transférase CBP (CREB Binding Protein), les facteurs d'épissage SF2/ASF et SRp30, sont aussi retrouvés sur les corps nucléaires de stress en condition de stress. Tout ceci corrèle avec l'apparition de transcrits sat III en réponse au choc thermique, indiquant l'existence d'une activité de transcription des corps nucléaires de stress induite par le facteur HSF1. L'ARN sat III persiste plusieurs heures lors de la phase de récupération, même après la disparition d'HSF1 et de l'ARN pol II des nSBs (Jolly et al., 2004; Metz et al., 2004).

Une étude récente a mis en évidence que la formation de foyers n'est pas restreinte à la seule région 9q12, mais à plusieurs régions péricentromériques. Dans les cellules cancéreuses, il apparaît un grand nombre de foyers, entre 6 et 10, qui diffèrent en taille. Majoritairement, il existe 2 à 4 foyers de grande taille correspondant à des foyers primaires et aussi plusieurs petits foyers, correspondant aux foyers secondaires. Les foyers primaires sont associés à la région 9q12, alors que les foyers secondaires sont associés à d'autres régions péricentromériques, notamment celles des chromosomes 1, 4, 5, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 21, 22 et Y.



**Figure 15** Dynamique d'HSF1 chez la drosophile et en cellules humaines

A. Courbe de récupération en FRAP chez la drosophile. En NHS sur le locus 63B (site de liaison principal d'HSF1 en NHS) et sur le locus 87A en HS. En NHS le  $t_{1/2}$  de récupération est de 15 secondes, après choc thermique le  $t_{1/2}$  est supérieur à six minutes. (Adaptée de Yao, et al., 2006).

B. Séquence d'images de FRAP sur le locus 87A après choc thermique. (Adaptée de Yao, et al., 2006).

C. Séquence d'images de FRAP sur les corps nucléaires de stress en cellules HeLa. (D'après Jolly, et al., 2002).

Toutes ces régions contiennent des blocs répétés de séquences Satellite II et III, et sont transcrites en réponse au choc thermique. La formation des foyers secondaires est dose dépendante de la concentration d'HSF1, qui est plus importante dans les cellules cancéreuses (Eymery et al., 2010).

Malgré toutes ces découvertes, le rôle des corps nucléaires de stress et des transcrits sat III est encore inconnu. Il existe cependant deux hypothèses : les nSBs pourraient servir de centre de stockage pour les éléments de la machinerie de transcription et de la maturation des ARNs, et/ou ils pourraient servir à protéger les régions péri-centromériques et participer au processus d'hétérochromatinisation (Biamonti and Vourc'h, 2010).

#### 4.5. La dynamique du facteur HSF1

Sur les chromosomes polyténiques, après choc thermique à 36,5°C, comme pour l'ARN pol II, le facteur de transcription HSF1 se relocalise sur les « puffs » de choc thermique, incluant l'important doublet aux loci 87A et 87C, qui contient les gènes *hsp70*. Le facteur HSF1 est activé en réponse à une élévation de température. Dans ces conditions, le facteur HSF1 se lie sur les promoteurs des gènes de protéines de choc thermique, dont *HSP70*, et induit leur transcription. En condition normale, HSF1 est localisé dans le noyau des cellules polyténiques, majoritairement dans le nucléoplasme, mais aussi à quelques loci, le plus important étant au locus 63B. Après choc thermique, HSF1 est rapidement recruté sur plusieurs loci, incluant les gènes de choc thermique.

En NHS, sur le locus 63B, où HSF1 s'accumule, le  $t_{1/2}$  de récupération en FRAP est de 15s, indiquant un échange rapide de HSF1 (Figure 15A, NHS). En HS, la récupération d'HSF1 est plus lente, avec un  $t_{1/2}$  supérieur à 6 min, que ce soit sur les loci 87 A & C, mais aussi sur d'autres sites de liaison d'HSF1, ne correspondant pas à des « puffs », où l'activité de transcription est moins active ou inexistante (Figure 15A, HS et B). Les courbes obtenues en spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) sont similaires en NHS et en HS, indiquant que la diffusion est peu altérée par le choc thermique. La récupération observée en FRAP indiquerait donc une liaison stable à l'ADN après choc thermique (Yao et al., 2006).

En cellules humaines HeLa, des expériences de FRAP ont montré une récupération rapide d'HSF1 sur les corps nucléaires de stress (Jolly et al., 1999), en environ trois minutes (Figure 15C). Cependant ces expériences ont été réalisées avec un temps de photoblanchiment d'une minute, suivi de l'acquisition de quatre images à 20, 45, 75, et 165 secondes. Même si ces données ne sont pas quantitatives, elles permettent de dire que la dynamique d'HSF1 est rapide sur ce site et diffèrent des données obtenues sur les puffs de drosophile. Les corps nucléaires de stress et les puffs de drosophile sont des sites actifs de transcription et présentent une accumulation locale d'éléments participant à la transcription.

#### 4.6. Implication d'HSF1 dans différentes maladies

La réponse au stress thermique est impliquée dans différentes maladies, notamment les pathologies associées à un mauvais repliement des protéines et le cancer. HSF1 présente des fonctions différentes dans ces deux types de pathologies, avec un effet bénéfique pour les maladies associées à un mauvais repliement des protéines et un effet promoteur de tumeurs dans le cancer.

HSF1 est impliqué dans la longévité et la durée de vie des cellules. Chez *Caenorhabditis elegans*, HSF1 agit avec le facteur de transcription DAF16 impliqué dans la voie Insuline/IGF-1, pour augmenter la durée de vie de l'animal, via la synthèse des petites protéines de choc thermique (sHSP) qui sont capables de replier les protéines des cellules. En jouant sur l'homéostasie des protéines, les sHSPs empêchent l'accumulation d'agrégats toxiques pour la cellule (Morley and Morimoto, 2004; Hsu et al., 2003). L'agrégation de protéines est la cause de plusieurs troubles neurodégénératifs tels que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington. La maladie de Huntington résulte de l'expansion de polyglutamine (polyQ) sur la protéine huntingtin. Cette expansion augmente avec l'âge. Chez *C.elegans*, cette expansion est accélérée en absence des petites HSPs, mais aussi des deux facteurs de transcription DAF16 et HSF1. Ainsi la protéine HSF1, aurait un rôle dans le contrôle de l'homéostasie des protéines et pourrait être impliquée dans ces différentes maladies (Hsu et al., 2003). L'apparition de ces maladies avec l'âge est à corrélérer au fait que la réponse au choc thermique est aussi atténuée avec l'âge (Jolly et al., 2002). L'atténuation pourrait être médiée par HSF1 et la déacétylase SIRT1 qui favorise et prolonge la liaison d'HSF1 sur l'ADN. La quantité de protéine SIRT1 diminue avec l'âge, pouvant expliquer l'atténuation de la réponse au choc thermique (Westerheide et al., 2009). Ainsi, une stratégie thérapeutique pour les maladies associées au mauvais repliement des protéines, serait d'augmenter l'expression des petites protéines de choc thermique via l'activation ou la surexpression d'HSF1 (Anckar and Sistonen, 2011). HSF1 a aussi un effet bénéfique dans les pathologies associées aux hypertrophies cardiaques. Dans ces pathologies, l'hypertrophie induit la formation d'agrégats et l'augmentation de la synthèse protéique. HSF1 via la synthèse des protéines HSP est capable de réguler et de limiter la formation de ces agrégats protéiques (Toko et al., 2008).

Cependant les effets bénéfiques d'HSF1 dans ces maladies est à mettre en parallèle aux risques que représente HSF1 dans le cancer. HSF1 est impliqué dans l'initiation et la progression tumorale (Gabai et al., 2012), et sa surexpression est un mauvais pronostic dans plusieurs types de cancer (Santagata et al., 2011). La suppression d'HSF1 dans les cellules cancéreuses induit un ralentissement de la croissance tumorale et une survie plus importante. HSF1 agit comme un

puissant modificateur de la tumorigénèse, mais n'agit pas comme oncogène. HSF1 permet aux cellules de s'adapter aux conditions difficiles de la tumeur (hypoxie, acidose, privation de nutriment, inflammation). Pour cela il orchestre un large réseau de processus biologiques incluant la prolifération, la survie, la synthèse de protéines et le métabolisme du glucose. Ainsi il est important de prendre en compte ces effets contraires d'HSF1 pour le développement de thérapies anticancéreuses dans la prévention des maladies neurodégénératives (Dai et al., 2007).

## Chapitre II Résultats

L'activation du facteur de transcription HSF1 en réponse à une élévation de température et sa relocalisation sur les corps nucléaires de stress, sites actifs de transcription visibles en microscopie, font d'HSF1 un très bon modèle pour l'étude de la dynamique d'un facteur de transcription en cellules vivantes. Deux études ont été réalisées sur la dynamique des facteurs HSF. La première par notre équipe en 1999 par FRAP sur les corps nucléaires de stress, qui a montré une récupération après photoblanchiment sur les nSBs en environ trois minutes (Jolly et al., 1999). Une autre étude en 2006, chez la drosophile, conclut que le facteur HSF présente une dynamique très lente sur des puffs de chromosomes polyténiques, avec une récupération incomplète en six minutes (Yao et al., 2006). De plus, aucune de ces études n'a réalisé d'analyse quantitative des paramètres dynamiques, ni même étudié le rôle des différents domaines d'HSF1 dans la dynamique de la protéine.

Par la présente étude, nous avons voulu répondre à plusieurs questions. La première concerne la dynamique de la protéine HSF1 en cellules humaines. Pour cela nous avons utilisé le système inductible de la réponse au choc thermique pour pouvoir étudier la dynamique de la protéine HSF1 dans différentes conditions : i) à l'état inactif en condition normale, ii) à l'état actif après choc thermique dans le nucléoplasme, iii) à l'état actif sur un site spécifique d'activité d'HSF1, les corps nucléaires de stress. La deuxième question concerne le rôle des différents domaines d'HSF1 dans la dynamique du facteur, notamment le domaine de trimérisation et le domaine de liaison à l'ADN qui sont deux domaines importants pour l'activité et l'activation d'HSF1.

Les résultats sont détaillés en trois parties. La première partie présente les différentes constructions utilisées pour analyser la dynamique d'HSF1, ainsi que la caractérisation des différentes lignées cellulaires utilisées. La deuxième partie détaille le système de FCS multi-confocale utilisé pour analyser la dynamique d'HSF1 en cellules vivantes. Ce système a été développé et validé en collaboration avec l'équipe d'Antoine Delon (Laboratoire Interdisciplinaire de Physique LIPhy, Grenoble). Ce système permet de réaliser des acquisitions FCS en plusieurs points simultanément. Il comporte un système d'induction du choc thermique sur le microscope. Enfin la dernière partie présente les résultats de l'analyse de la dynamique d'HSF1 en mFCS et en FRAP. La dynamique de la protéine eGFP a été étudiée en premier, comme référence pour l'analyse de la dynamique et l'interprétation des résultats de la protéine HSF1. La dynamique de la protéine HSF1-eGFP sauvage a ensuite été étudiée par mFCS sur deux lignées cellulaires différentes (U87 et HeLa) et en FRAP sur les cellules HeLa. Enfin, l'impact sur la dynamique d'HSF1

de la délétion des principaux domaines trimérisation, liaison à l'ADN et transactivation, a été étudiée en mFCS et en FRAP sur les cellules HeLa.

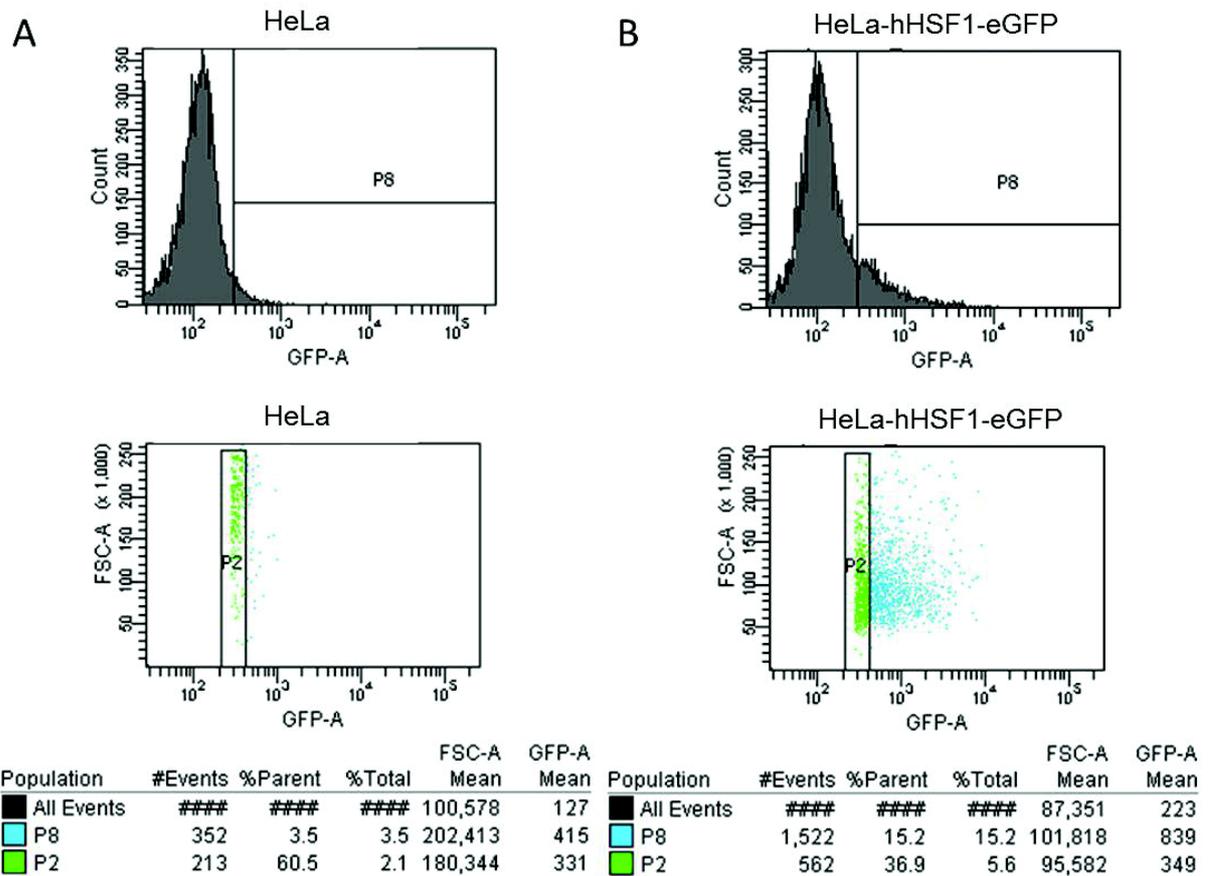
## **1. Caractérisation de lignées cellulaires exprimant la protéine humaine HSF1 sauvage ou mutée fusionnée à la protéine eGFP**

Afin d'étudier la dynamique d'HSF1 par microscopie de fluorescence, la première étape a été de fusionner la protéine humaine HSF1 sauvage ou mutée à la protéine fluorescence eGFP (« enhanced Green Fluorescent Protein ») et de générer des lignées stables.

### **1.1. Description des constructions**

La première construction a été la fusion de la protéine humaine complète HSF1 à la protéine eGFP. Pour cela, la séquence codante de la protéine hHSF1 a été insérée dans un plasmide peGFP-N3 (cf. « matériel et méthode »). La séquence codante de la protéine hHSF1 est constituée de 1590 nucléotides, formant une protéine de 529 acides aminés. La protéine eGFP est constituée de 239 acides aminés.

Afin de mieux caractériser la dynamique d'HSF1 en cellules vivantes, et de déterminer le rôle et l'importance de chaque domaine dans cette dynamique, plusieurs mutants de la protéine hHSF1 ont été réalisés. La première mutation est une délétion complète du domaine de trimérisation, consistant à retirer les acides aminés 137 à 213 et résultant en une délétion des sous-domaines HR-A/B. Cette construction conduit à la formation d'une protéine de 453 acides aminés, appelée par la suite HSF1- $\Delta$ TRIM (Figure 17). Le deuxième type de mutation a porté sur le domaine de liaison à l'ADN. Pour cela, deux stratégies ont été envisagées : la première consiste en une délétion totale du domaine DBD contenu entre les acides aminés 16 et 124. Cette construction conduit à la formation d'une protéine de 421 acides aminés et sera appelée par la suite HSF1- $\Delta$ DBD. La deuxième stratégie a consisté à réaliser une mutation ponctuelle par mutagenèse dirigée. Pour cela la lysine en position 80 a été changée en une glutamine (Figure 17). Le mutant sera appelée par la suite HSF1-K80Q. Comme décrit précédemment, lors de la phase de récupération, la lysine en position 80 (à l'intérieur du domaine DBD) est acétylée par l'HAT p300, ce qui entraîne son décrochage de l'ADN. Comme cette lysine est en contact direct avec les groupements phosphates de l'ADN, la neutralisation de la charge de la lysine (+) par une glutamine mime l'effet de l'acétylation (Westerheide et al., 2009).



**Figure 16 Tri des cellules HSF1-eGFP par cytométrie en flux**

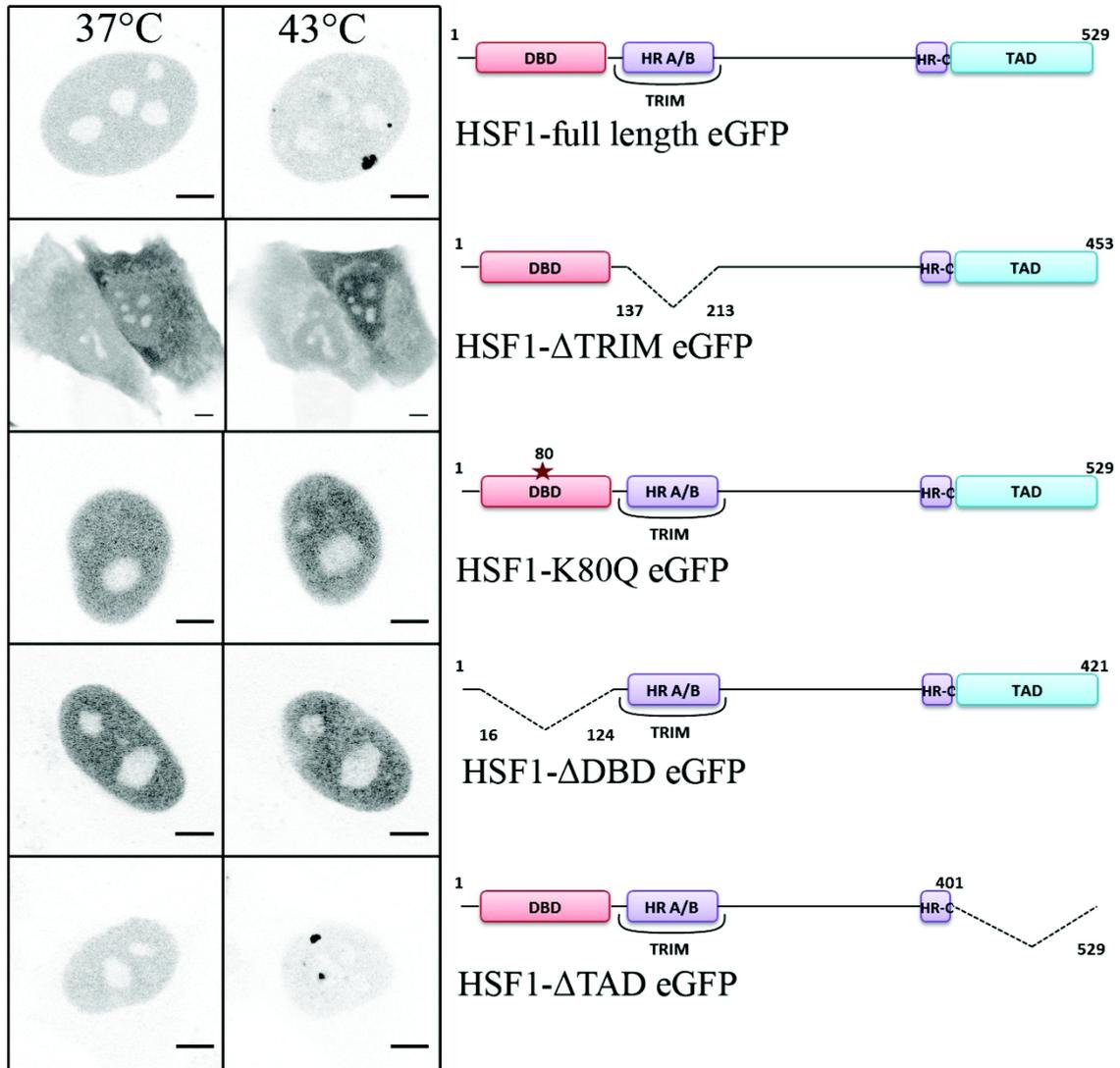
A. Les cellules contrôles sont analysées par cytométrie en flux afin de déterminer le seuil de détection des cellules fluorescentes (fenêtre P8). B. Les cellules transfectées avec les protéines HSF1-eGFP sauvage ou mutées, sont ensuite triées par cytométrie en flux. Les cellules à la limite de l'autofluorescence (fenêtre P2) sont isolées afin de récupérer les cellules avec le plus faible taux d'expression de la protéine.

Ainsi le mutant HSF1-K80Q possède la même taille et la même structure que la protéine sauvage, mais ne peut plus lier l'ADN. Le dernier mutant est un mutant délété pour le domaine de transactivation (HSF1- $\Delta$ TAD). Etant donné la position du domaine TAD par rapport au domaine HR-C, deux mutants ont été construits. Le premier consiste en une délétion des acides aminés compris entre les positions 410 et 529, n'incluant pas la partie C-terminale du domaine HR-C. La deuxième consiste à retirer totalement le domaine TAD, à partir des acides aminés en position 401. Ainsi ces deux constructions forment des protéines de 410 et 401 acides aminés, et seront appelées par la suite, HSF1- $\Delta$ TAD410 et HSF1- $\Delta$ TAD401 (ou HSF1- $\Delta$ TAD, Figure 17) respectivement.

La protéine eGFP a été fusionnée sur toutes les constructions en position C-terminale d'HSF1. Pour contrôler l'effet de la position du tag eGFP sur la fonction et la dynamique des protéines, la protéine eGFP a été aussi fusionnée en position N-terminale de la protéine HSF1 sauvage et du mutant HSF1-K80Q. Des constructions résistantes au siARN ont été réalisées afin de permettre l'expression de protéines exogènes, en l'absence de la protéine endogène. Pour cela, la séquence codante d'HSF1 a été modifiée sur deux bases au niveau de la séquence cible du siARN (G573A et C576T). D'autres constructions ont aussi été réalisées afin d'effectuer des expériences en plusieurs couleurs. La protéine HSF1 sauvage a été fusionnée à la protéine fluorescente Tag-RFP-T et à la protéine fluorescente IFP 1.4, permettant de couvrir d'autres régions du spectre (rouge et rouge lointain).

## 1.2.Sélection de lignées cellulaires stables

La technique de spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) est une technique sensible à la concentration en molécules. Il est donc nécessaire d'exprimer les protéines d'intérêt à un niveau suffisamment faible pour les analyser en FCS. Plusieurs lignées stables exprimant la protéine sauvage et les différents mutants d'hHSF1 ont été générées. La protéine sauvage fusionnée à la protéine eGFP a été insérée dans plusieurs lignées cellulaires : HeLa (cancer du col de l'utérus), U87 (glioblastome de cerveau) et H1299 (cancer de poumon). L'avantage de ces trois lignées est qu'elles sont adhérentes et qu'elles se transfectent facilement. Elles diffèrent cependant par leur ploïdie et leur genre, deux critères qui influencent notamment le nombre de corps nucléaires de stress après choc thermique. Les cellules HeLa et U87 sont des lignées femelles, elles sont respectivement tétraploïdes (n=82) et hypodiploïdes (n=44). La lignée H1299 est une lignée mâle, avec un chromosome Y possédant une large région de répétition satellite III qui pourrait être une cible importante d'HSF1 (Eymery et al., 2010). L'un des inconvénients de la lignée H1299 est la perte progressive de l'expression du transgène HSF1-eGFP au fil des passages des cellules. Les deux autres lignées ne nous ont pas posé ce problème.



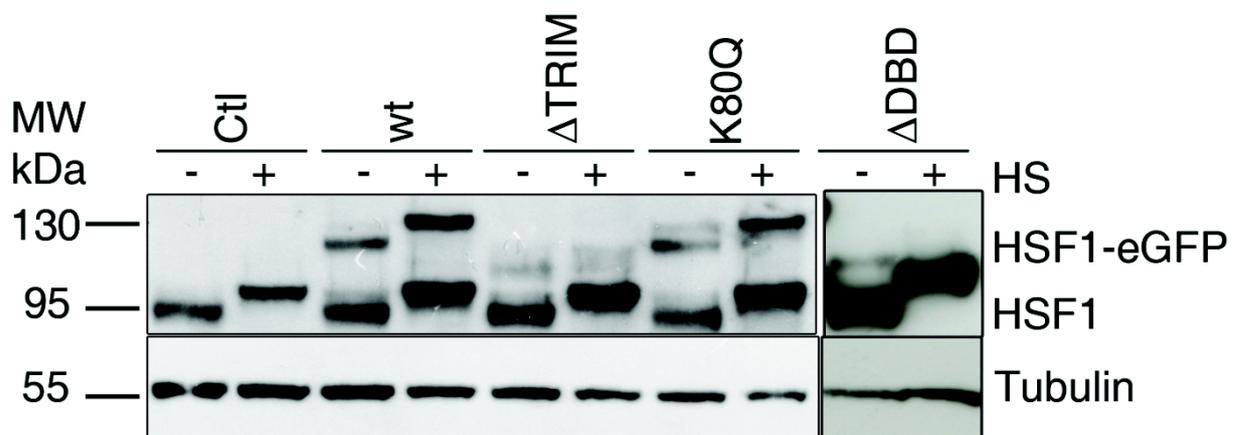
**Figure 17 Localisation des constructions d'hHSF1-eGFP sauvage ou mutées en cellules HeLa**

A gauche, localisation des différentes constructions dans les cellules HeLa à 37°C ou suite un stress thermique à 43°C. A droite, schéma et nom des constructions correspondantes. Les chiffres sous les lignes constituées de pointillés correspondent aux acides aminés délévés. Barre = 5 μm.

La FCS étant une technique sensible à la concentration en protéine fluorescente, les lignées stables ont été triées par cytométrie en flux, afin de sélectionner les cellules avec un faible niveau d'expression de la protéine d'intérêt. Après transfection des plasmides d'intérêt, une pression de sélection est appliquée sur les cellules par ajout de généticine. La pression de sélection est appliquée durant une douzaine de jours, afin de permettre la sélection des cellules qui ont intégré le plasmide. A la fin de la sélection, les cellules sont triées par cytométrie en flux, en utilisant comme contrôle négatif les cellules non transfectées, permettant de définir le seuil négatif (Figure 16-A). Les cellules transfectées sont ensuite analysées en conservant les conditions des cellules témoins (Figure 16-B). Seules les cellules avec le plus faible niveau d'expression de la protéine fluorescente sont sélectionnées. Pour cela la fenêtre de tri est placée de sorte à chevaucher le seuil négatif et les premiers niveaux de fluorescence (fenêtre P2 sur Figure 16). Plusieurs stratégies de tri cellulaire ont été employées : pour les expériences d'analyse de dynamique, un tri clonal a été réalisé : chaque cellule triée est isolée dans un puits d'une plaque 96 puits. Les lignées clonales sont ensuite testées pour leur niveau d'expression et seules celles possédant un faible niveau d'expression sont conservées pour la suite des expériences. Pour d'autres expériences, des populations cellulaires sont isolées sur la base de leur niveau de fluorescence (faible, moyen, fort). L'ensemble des cellules est regroupé dans un puits de plaque six puits. Généralement ce mode de tri produit une population cellulaire avec des niveaux de fluorescence très hétérogènes. Les mutants ont été insérés uniquement dans la lignée cellulaire HeLa. Plusieurs lignées stables ont été générées à partir des plasmides HSF1- $\Delta$ TRIM, HSF1- $\Delta$ DBD et HSF1-K80Q. Pour chacun de ces plasmides, la lignée ayant la plus faible expression du transgène a été sélectionnée pour la suite des expériences. Les constructions HSF1- $\Delta$ TAD 401 et 410 ont été étudiées via des transfections transitoires.

### **1.3. Localisation et expression des différentes constructions**

Dans un premier temps, la localisation des différentes constructions a été étudiée afin de caractériser les différentes lignées (Figure 17). La construction hHSF1-eGFP est majoritairement nucléaire, que ce soit dans les cellules H1299, U87 et HeLa. Après choc thermique, la protéine hHSF1-eGFP se relocalise dans les corps nucléaires de stress. Les mutants présentent des localisations différentes en fonction de la délétion étudiée. Le mutant HSF1- $\Delta$ TRIM est localisé à la fois dans le noyau et le cytoplasme, que ce soit avant ou après choc thermique (Figure 17). Ce mutant est incapable de former des corps nucléaires de stress, coïncidant avec son incapacité à se lier à l'ADN (Sarge et al., 1993). La localisation particulière de ce mutant peut s'expliquer en partie par la perte partielle d'un signal de localisation nucléaire (NLS).



**Figure 18** Caractérisation de l'expression des protéines hHSF1-eGFP sauvage ou mutées en cellules HeLa

Les différentes lignées cellulaires sont incubées (+) ou non (-) pendant une heure à 43°C. Après extraction, les protéines sont séparées et analysées par Western Blot en utilisant un anticorps anti-HSF1. Les bandes du bas correspondent à la protéine endogène, alors que les bandes du haut correspondent aux protéines fusionnées à la protéine eGFP. La tubuline sert de contrôle de charge. La piste Contrôle (Ctl) correspond aux cellules HeLa non transfectées.

En effet, la région TRIM est bordée par deux NLS, un en position 113 et l'autre en position 201, qui est en partie perdu lors de la délétion du domaine TRIM. Les mutants de liaison à l'ADN (HSF1- $\Delta$ DBD et HSF1-K80Q) sont localisés dans le noyau des cellules avant et après choc thermique. Ces deux protéines sont incapables de se relocaliser dans les corps de stress nucléaires, en accord avec leur incapacité à lier l'ADN (Figure 17 et (Sarge et al., 1993; Westerheide et al., 2009)). La localisation de la protéine humaine HSF1 sauvage et mutée est en accord avec la localisation de la protéine HSF1 de souris exprimée de façon transitoire, comme observé précédemment dans l'équipe (Jolly et al., 2002). Les mutants du domaine de transactivation (HSF1- $\Delta$ TAD 401 et 410) sont localisés dans le noyau des cellules et sont capables de se relocaliser dans les corps nucléaires de stress après choc thermique (Figure 17). Malgré l'absence d'une partie du sous-domaine HR-C, le mutant HSF1- $\Delta$ TAD 401 est aussi capable de répondre au choc thermique, comme l'indique l'apparition de corps nucléaires de stress uniquement après choc thermique.

Le niveau d'expression des protéines dans chaque lignée a ensuite été analysé par Western Blot (Figure 18). Chaque construction est activée par le choc thermique ; ceci est visible par l'hyperphosphorylation d'HSF1 qui provoque un retard dans la migration de la protéine après choc thermique. Ce retard est observé pour la protéine endogène (ligne du bas) ainsi que pour toutes les protéines exogènes (HSF1-eGFP, ligne du haut). La seule construction pour laquelle ce retard n'est pas observé, est la protéine HSF1- $\Delta$ DBD. Cependant, le niveau d'expression de cette protéine étant très faible comparé à l'expression de la protéine endogène, il est possible que la bande correspondante après choc thermique soit masquée par la bande de la protéine endogène. Pour chaque lignée, le niveau d'expression de la protéine exogène est au plus égal, voire inférieur, à celui de la protéine endogène. Ceci nous indique, qu'au maximum, la quantité de protéine HSF1 dans les lignées n'est que deux fois celle des cellules non transfectées (Figure 18).

#### **1.4. Analyse de la capacité de liaison à l'ADN des différentes constructions**

La capacité des différentes constructions (sauvage et mutées) à lier l'ADN a été analysée par deux techniques différentes : i) la RT-QPCR, qui permet d'étudier la liaison spécifique d'HSF1 sur deux cibles connues, en suivant l'expression de l'ARNm hsp70 et l'ARN sat III. ii) la technique par extraction de protéines sur cellules vivantes, permettant de visualiser l'interaction directe ou indirecte d'HSF1 avec l'ADN et la chromatine.

Pour pouvoir quantifier l'augmentation de la transcription de l'ARNm hsp70 et sat III induite par la protéine HSF1 sauvage ou mutée, il est nécessaire d'éteindre l'expression de la protéine HSF1 endogène, par deux cycles de petits ARNs interférants dirigés contre HSF1 (siARN anti-HSF1), puis de réexprimer soit la protéine sauvage résistante au siARN soit les protéines mutées.

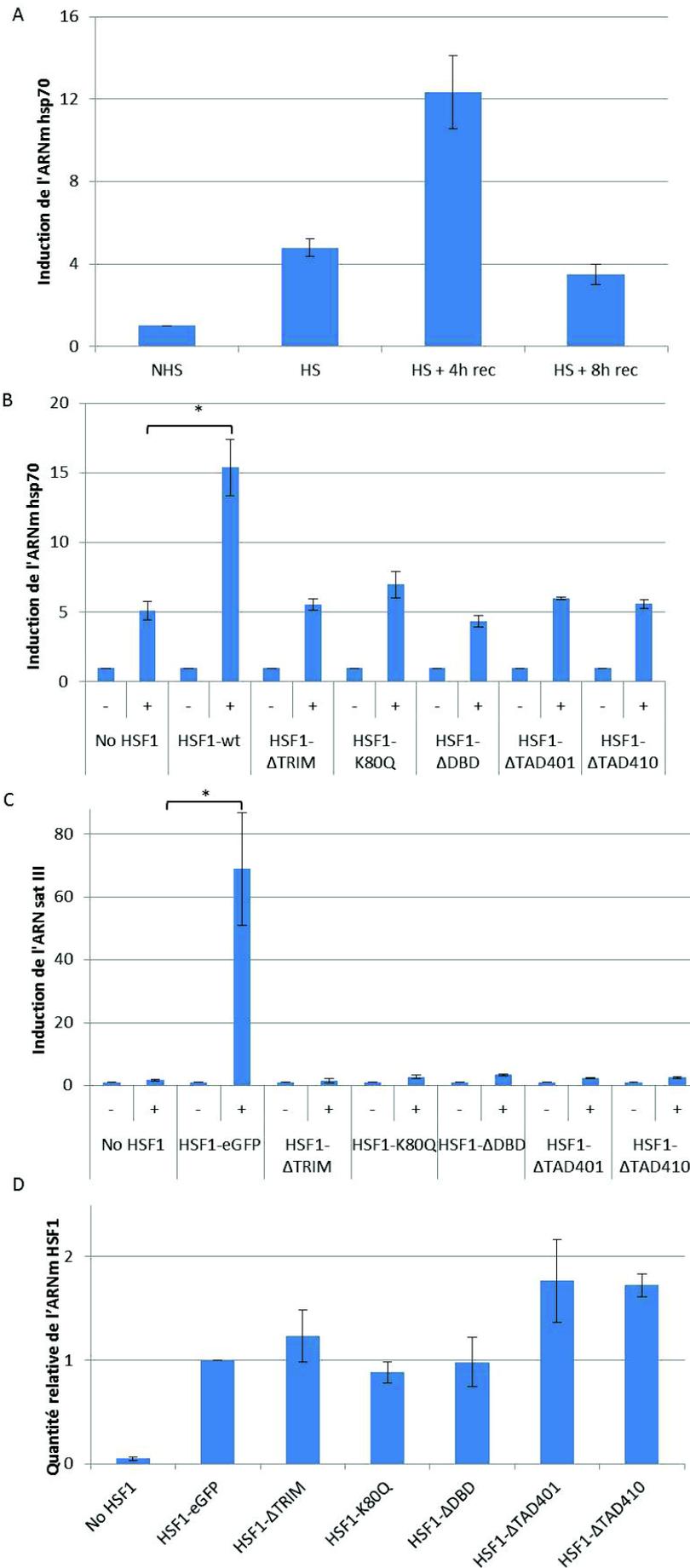


Figure 19 Analyse de l'expression des ARNm hsp70 et sat III par les différentes constructions d'HSF1.

### Légende Figure 19:

A. Cinétique de l'expression de l'ARNm hsp70 en réponse au choc thermique. Les cellules sont traitées avec un siARN dirigé contre la protéine endogène, puis transfectées avec la construction HSF1-eGFP résistante au siARN. Pour chaque condition, la quantité d'ARNm hsp 70 est normalisée par la quantité d'ARNm GAPDH, puis l'induction de l'expression de l'ARNm hsp70 est normalisée par rapport à la quantité d'ARNm avant choc thermique (NHS = 1). L'induction de l'ARNm hsp70 est ensuite analysée après une heure de choc thermique (HS), une heure de choc thermique et quatre heures de récupération à 37°C (HS + 4h rec) et une heure de choc thermique et huit heures de récupération à 37°C (HS + 8h rec). n=2.

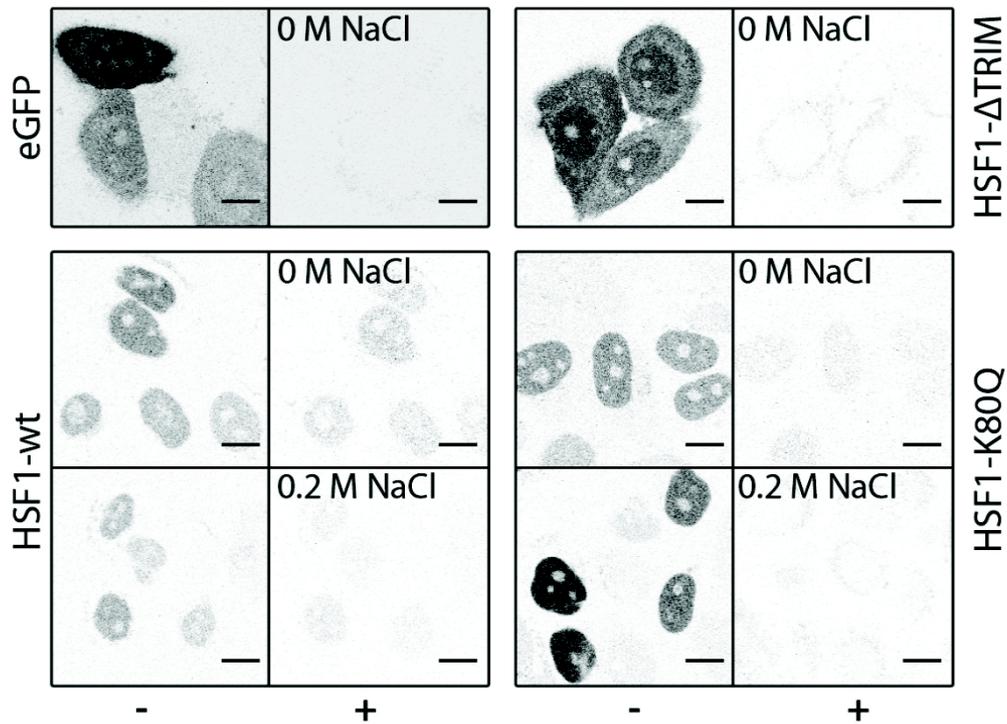
B et C. Induction de l'ARNm hsp70 (B) ou de l'ARN sat III (C) par les différentes constructions d'HSF1. Les cellules sont traitées avec un siARN dirigé contre HSF1 puis transfectées avec les différentes constructions ou non transfectées (No HSF1). La quantité des ARN hsp 70 et sat III est normalisée par rapport à la quantité d'ARNm GAPDH. Le niveau des ARN est normalisé par rapport à la quantité avant choc thermique (-), l'induction est quantifiée après une heure de choc thermique et quatre heures de récupération (+). n= 6 pour No HSF1 et HSF1-eGFP, n=5 pour HSF1-K80Q et n=3 pour les autres constructions. \* p<0,05.

D. Niveau d'expression des différentes constructions d'HSF1. La quantité d'ARNm HSF1 a été analysée pour chaque expérience. La quantité d'ARNm avant choc thermique est normalisée par rapport à la protéine sauvage fusionnée à la protéine eGFP (HSF1-eGFP = 1).

---

Dans un premier temps, une cinétique a été réalisée afin de déterminer les meilleures conditions pour observer une augmentation significative de l'ARNm hsp70 en présence de la protéine sauvage (Figure 19-A). L'ARNm hsp70 est exprimé dès une heure de choc thermique avec une induction maximale après quatre heures de récupération à 37°C, puis une diminution après huit heures de récupération. Pour la suite des analyses, nous avons choisi de comparer l'expression des ARNm avant choc thermique et après une heure de choc thermique suivi de quatre heures de récupération.

La capacité de la protéine sauvage et des mutants à induire l'expression de l'ARNm hsp70 et de l'ARN sat III, a ensuite été analysée par RT-QPCR en absence de la protéine endogène (Figure 19-B et Figure 19-C). Le traitement au siARN n'entraîne pas une perte totale de l'expression d'HSF1, confirmée par la présence d'ARNm HSF1 dans le puits « No HSF1 », qui correspond aux cellules traitées au siARN sans transfection supplémentaire (Figure 19-D). La quantité restante d'HSF1 pourrait expliquer l'induction de la transcription de l'ARNm hsp70 observée en absence de plasmide (puits « No HSF1 »). La seule construction capable d'induire une expression d'ARNm hsp70 et d'ARN sat III, significativement plus importante qu'en absence de la protéine endogène est la protéine HSF1 sauvage. Tous les mutants sont incapables d'induire une expression des deux ARNs. Pour le mutant K80Q ces données sont en accord avec celles obtenues dans la littérature pour l'ARNm hsp70 (Westerheide et al., 2009).



**Figure 20** Extraction de protéines sur cellules vivantes avant choc thermique.

Les cellules HeLa exprimant soit la protéine eGFP, soit la protéine HSF1 sauvage ou mutée fusionnée à la GFP, sont observées par microscopie confocale en condition normale (-), puis perméabilisées (0,5% Triton X-100) pendant dix minutes, avant d'être traitées avec une solution à concentration croissante en sels (0 et 0,2 M NaCl) pendant dix minutes. Les cellules sont ensuite fixées et observées de nouveau au microscope (+). Pour les cellules HeLa-eGFP et HeLa-HSF1-ΔTRIM uniquement la condition sans sels est représentée, puisque la totalité de la fluorescence est perdue en l'absence de sel. Barre = 10 μm.

Pour l'induction de l'ARN sat III (Figure 19-C), les données sont en accord avec l'absence de corps nucléaires de stress pour les mutants HSF1- $\Delta$ TRIM, HSF1- $\Delta$ DBD et HSF1-K80Q (Figure 17). Pour les mutants HSF1- $\Delta$ TAD 401 et 410, malgré la présence de corps nucléaires de stress après choc thermique, nous n'observons pas d'induction de l'ARN sat III. Ceci est en accord avec l'incapacité de ce mutant à recruter les éléments de la machinerie de transcription (TBP, TAF, médiateur) (Yuan and Gurley, 2000; Kim et al., 2004; Choi et al., 2000).

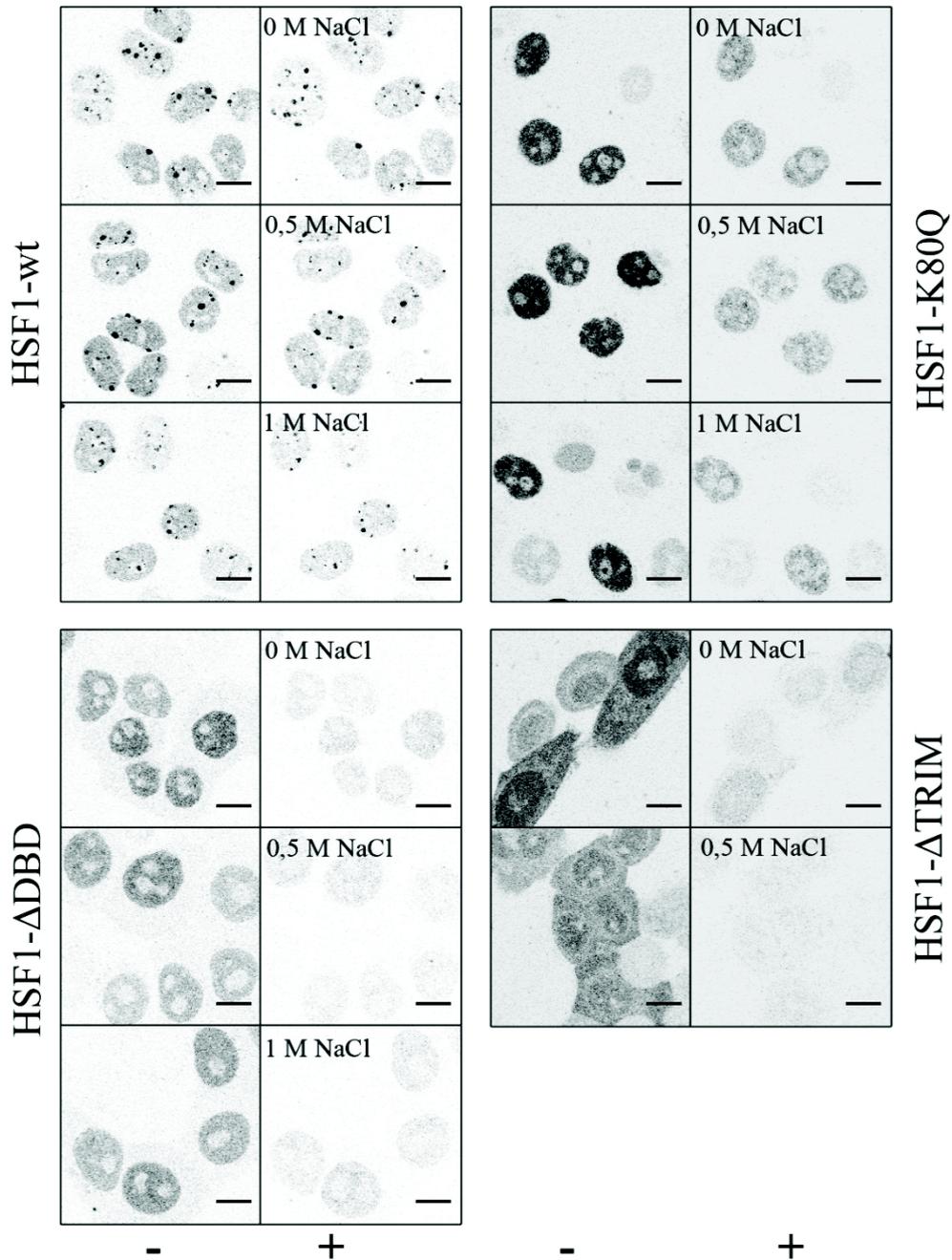
Parmi toutes les constructions testées, seule la protéine HSF1 sauvage est capable d'induire spécifiquement l'expression des gènes hsp70 et des séquences satellite III. Le mutant HSF1- $\Delta$ TRIM n'étant pas capable de se trimériser ne peut pas lier les séquences HSE (Zuo et al., 1994). Ces expériences confirment que les mutants de liaison à l'ADN, HSF1- $\Delta$ DBD et HSF1-K80Q ne sont pas capables d'induire l'expression des ARN cibles. Concernant les mutants HSF1- $\Delta$ TAD 401 et 410, ces expériences montrent que ces protéines sont capables de se lier à l'ADN et de former des corps nucléaires de stress après choc thermique, mais ne sont pas capables d'induire l'expression des ARN cibles.

Afin de confirmer que les résultats obtenus pour la protéine HSF1 sauvage ne sont pas dus à un niveau d'expression d'HSF1 très supérieur à celui des mutants, le niveau de l'ARNm HSF1 a été quantifié pour chaque construction. Le niveau d'expression est similaire pour les protéines HSF1 sauvage, HSF1- $\Delta$ TRIM, HSF1- $\Delta$ DBD et HSF1-K80Q (Figure 19-D). Seuls les mutants HSF1- $\Delta$ TAD 401 et 410 présentent un niveau d'expression légèrement supérieur (1,7x). Cette différence d'expression n'a cependant aucun impact sur l'induction de l'ARNm hsp70 ou de l'ARN sat III.

Pour aller plus loin sur la capacité d'interaction de ces constructions avec l'ADN et la chromatine, des expériences d'extraction de protéines sur cellules vivantes ont été réalisées. Cette technique consiste à étudier l'interaction de la protéine d'intérêt avec la chromatine après perméabilisation des cellules et traitement ou non avec une quantité croissante de sels (NaCl). Les mêmes cellules sont observées avant et après traitement et il devient ainsi possible de visualiser la diminution de la fluorescence induite par le traitement.

La protéine eGFP a été utilisée comme contrôle négatif, en effet la protéine eGFP n'est pas capable de lier l'ADN, ce qui est reflété par la perte totale de fluorescence après perméabilisation et en absence de sels (Figure 20). La protéine ne se liant ni à l'ADN, ni à la chromatine, elle est simplement éliminée par les lavages après perméabilisation.

Avant choc thermique, la protéine HSF1- $\Delta$ TRIM se comporte un peu comme la protéine eGFP (Figure 20), avec une perte totale de la fluorescence en absence de sels. Le mutant HSF1- $\Delta$ TRIM,



**Figure 21** Extraction de protéines sur cellules vivantes après choc thermique.

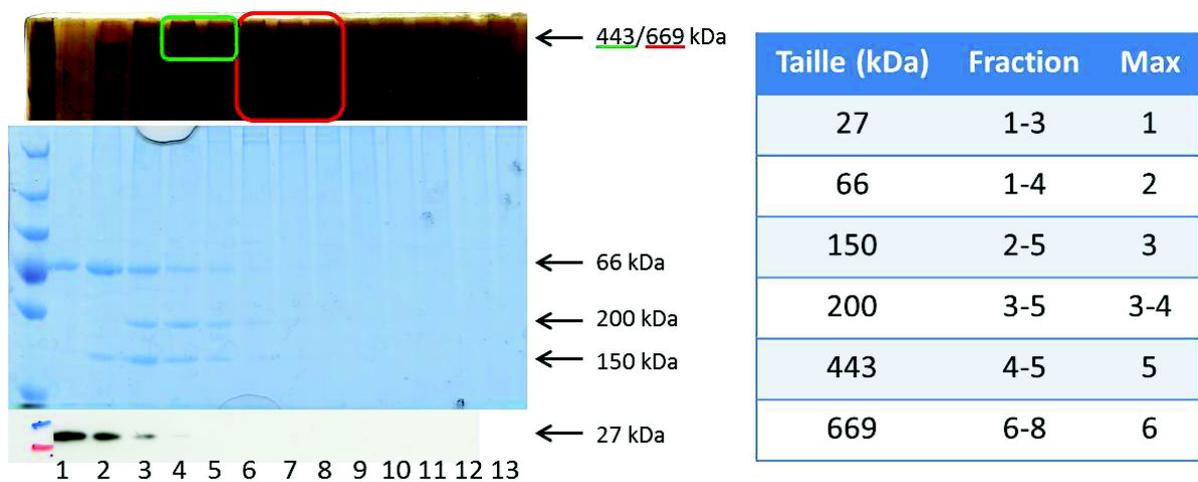
Les cellules HeLa exprimant la protéine HSF1 sauvage ou mutée fusionnée à la GFP, sont incubées pendant une heure à 43°C puis observées par microscopie confocale (-). Les cellules sont ensuite perméabilisées (0,5% Triton X-100) pendant dix minutes, avant d'être traitées avec une solution à concentration croissante en sels (0 à 1 M NaCl) pendant dix minutes. Après fixation, les cellules sont observées de nouveau au microscope (+). Pour les cellules HeLa-HSF1- $\Delta$ TRIM la condition à 1 M de sels n'est pas représentée, puisque la totalité de la fluorescence est perdue dès 0.2 M NaCl. Barre = 10  $\mu$ m.

en absence de choc thermique, n'est donc pas capable d'interagir avec l'ADN. Pour la protéine sauvage et le mutant HSF1-K80Q, après perméabilisation, nous observons une perte importante de fluorescence, due à la perte de la fraction diffusant librement dans le noyau. Cependant, en absence de sel, une fraction reste associée à l'ADN. Cette fraction est rapidement éliminée en augmentant la concentration de sels. Ainsi, dès 200 mM de sels, nous observons une perte totale de la fluorescence (Figure 20). En absence de choc thermique, une fraction de la protéine sauvage et du mutant HSF1-K80Q est donc faiblement associée à la chromatine, reflétant des interactions aspécifiques ou spécifiques avec l'ADN.

Après choc thermique, la protéine sauvage est fortement associée à la chromatine (Figure 21). En effet, en absence de sels, nous observons la perte d'une petite fraction de protéines, correspondant aux protéines HSF1 diffusant librement. Après ajout de sels et pour des concentrations en sels très importantes (jusqu'à 2 M NaCl, non montré), nous observons une persistance du signal fluorescent, à la fois dans le nucléoplasme et sur les corps nucléaires de stress (Figure 21). La persistance des corps nucléaires de stress après traitement au triton, est en accord avec des données de la littérature, indiquant que les nSBs sont des entités résistantes au triton X-100, à la TSA et au traitement à la DNase I (Jolly et al., 1999). La persistance de la fluorescence dans le nucléoplasme après perméabilisation et extraction aux sels, reflète l'existence d'une fraction de molécules capables d'interagir fortement avec la chromatine. De façon assez surprenante, la fraction de molécules résistantes à la perméabilisation et aux sels est aussi retrouvée pour les deux mutants de liaison à l'ADN, HSF1- $\Delta$ DBD et HSF1-K80Q et ce pour les mêmes concentrations en sels que la protéine sauvage (0 à 2 M NaCl, Figure 21). Les protéines HSF1- $\Delta$ DBD et HSF1-K80Q sont donc capables d'interagir avec la chromatine, malgré l'absence ou l'inhibition du domaine de liaison à l'ADN. Le mutant HSF1- $\Delta$ TRIM, contrairement à ce qui a été observé avant choc thermique, présente une fraction faiblement associée à la chromatine après choc thermique (Figure 21-partie inférieure droite). Cependant cette fraction est rapidement décrochée dès 200 mM en NaCl, reflétant l'existence d'interactions faibles avec l'ADN, induite par le choc thermique.

### **1.5. Analyse de la capacité de la protéine sauvage et des mutants à former des complexes moléculaires avant et après choc thermique.**

HSF1 est capable d'interagir avec de multiples partenaires protéiques, que ce soit en condition normale, ou en réponse au choc thermique. Ces interactions, via les différents domaines entraînent la formation de complexes moléculaires plus ou moins importants. Pour visualiser l'effet des différentes délétions sur la capacité d'HSF1 à former des complexes moléculaires, et pour essayer de déterminer la masse de ces complexes, des fractionnements sur gradients de



**Figure 22 Répartition des standards protéiques sur gradient de glycérol**

Les standards protéiques ont été séparés sur un gradient de glycérol dont la concentration varie entre 20 et 40%. Après ultracentrifugation à 53 000 rpm pendant cinq heures à 4°C, le gradient est fractionné en plusieurs volumes de quantité égale puis analysé par SDS-PAGE. Plusieurs révélations ont été effectuées pour visualiser tous les standards (nitrate d'argent pour les protéines de haut poids, bleue de coomassie pour les autres protéines). La protéine eGFP (27 kDa) a été détectée par Western Blot. Le tableau de droite récapitule la position des standards protéiques dans les différentes fractions du gradient.

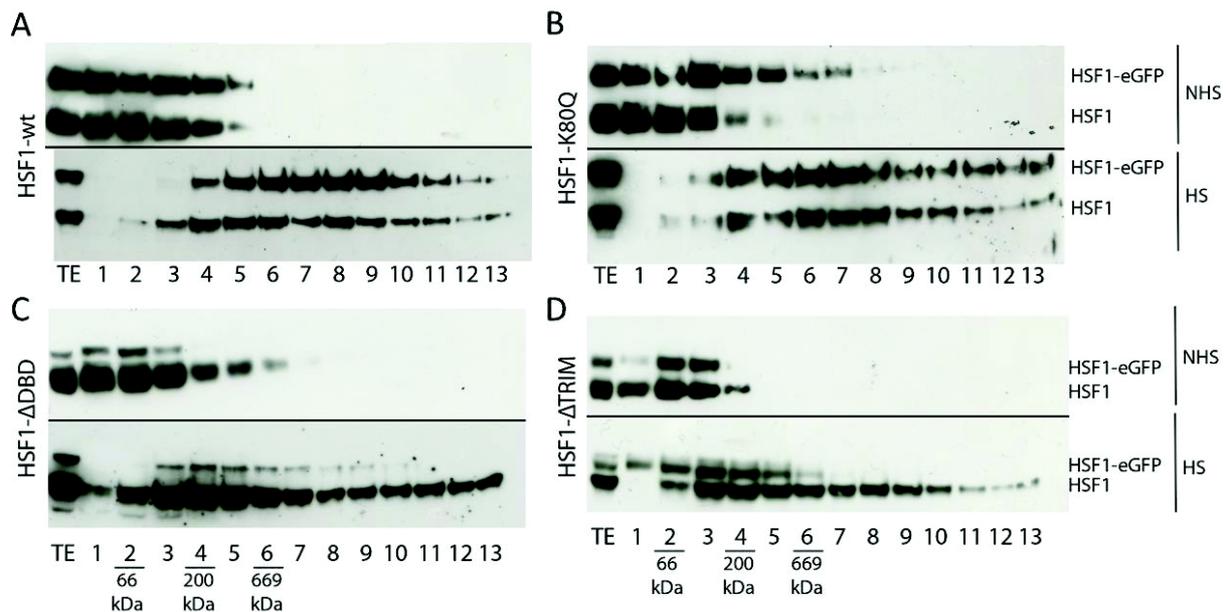
glycérol par ultracentrifugation ont été réalisés. Cette technique consiste à déposer, sur un gradient de concentration croissante en glycérol, les extraits protéiques. Les protéines sont ensuite séparées via leur densité (liée à la masse), lors d'une ultracentrifugation. Après centrifugation, les gradients sont fractionnés en plusieurs volumes de même quantité, et chaque fraction est ensuite analysée par Western Blot.

Les premières fractions, en haut du gradient, sont les fractions contenant les complexes de faible poids moléculaire. Inversement, les fractions du bas du gradient, sont les fractions contenant les complexes de haut poids moléculaire. Afin d'estimer la masse des complexes moléculaires, des standards protéiques de masse connue allant de 27 à 669 kDa ont été déposés sur un gradient de glycérol. Chacun des standards s'étale sur environ trois fractions, mais le maximum d'intensité de chacun d'entre eux a été choisi pour attribuer un poids à une fraction. Ainsi les fractions 1 à 6 correspondent à des masses respectivement de 27, 66, 150, 200, 449 et 669 kDa (Figure 22).

Les fractionnements sur gradients de glycérol ont été effectués sur les lignées cellulaires exprimant à la fois la protéine endogène et la protéine HSF1 sauvage ou mutée fusionnée à la protéine GFP. Ainsi, sur l'ensemble des gradients, les bandes hautes correspondent à la protéine exogène (appelée HSF1-eGFP) et les bandes basses correspondent à la protéine endogène (appelée HSF1). La protéine sauvage, en condition normale, est sous la forme de complexes d'une taille d'environ 200 kDa, ce qui est en accord avec les données de gel filtration de la littérature (220, 360 kDa). Après choc thermique, la protéine HSF1 trimérique se trouve dans des complexes de haut poids moléculaire, largement supérieurs à 600 kDa (Figure 23-A).

HSF1 se trouverait dans des complexes de poids moléculaire encore plus importants que ce que la littérature laissait présager (700-800 kDa, (Sarge et al., 1993; Baler et al., 1993; Zuo et al., 1994)). Cependant le gradient n'étant pas linéaire, il est difficile d'estimer la taille des complexes de haut poids moléculaires. Il est intéressant de noter qu'HSF1 existerait sous la forme de complexes multiples, de tailles et de compositions très variés. Ceci est reflété par l'étalement d'HSF1 sur une dizaine de fractions après choc thermique.

Le mutant HSF1-K80Q, qui possède la même taille que la protéine sauvage, existe sous forme de complexes similaires à ceux observés pour la protéine sauvage, que ce soit avant ou après choc thermique (Figure 23-B). Il est à noter tout de même, qu'en condition normale, le mutant HSF1-K80Q semble exister sous forme de complexes de tailles maximales plus importantes. Le mutant HSF1- $\Delta$ DBD, présente un changement important de complexes après choc thermique. Cependant, ces complexes sont moins gros que ceux observés pour la protéine sauvage et le mutant HSF1-K80Q, que ce soit avant et après choc thermique (Figure 23-C). Ceci peut s'expliquer par la perte



**Figure 23 Comparaison des changements de complexes moléculaires pour les protéines HSF1 sauvage ou mutées fusionnées à la protéine GFP.**

Les protéines des cellules HeLa exprimant la protéine sauvage (A. HSF1-wt) ou les mutants (B. HSF1-K80Q, C. HSF1- $\Delta$ DBD et D. HSF1- $\Delta$ TRIM), incubées à 37°C (NHS) ou pendant une heure à 43°C (HS), sont extraites puis déposées sur un gradient de glycérol dont la concentration varie entre 20 et 40%. Après ultracentrifugation à 53 000 rpm pendant 5 heures, les gradients sont fractionnés avec des volumes de mêmes quantités (fractions 1 à 13). Les fractions sont ensuite analysées par Western Blot avec un anticorps anti-HSF1. Pour chaque gel, la bande du haut correspond à la protéine fusionnée à la protéine eGFP (HSF1-eGFP), la bande du bas correspond à la protéine endogène (HSF1). L'extrait protéique total (TE) est déposé en guise de contrôle. En guise de rappel la position de trois standards protéiques (66, 200 et 669 kDa) est rappelée sous les numéros des fractions.

totale du domaine de liaison à l'ADN, et donc de la possible perte de partenaires protéiques capables d'interagir via ou au voisinage de ce domaine. Il faut aussi remarquer que le niveau d'expression très faible de la protéine HSF1- $\Delta$ DBD ne permet pas d'exposer et de révéler correctement le Western Blot, et donc entraîne peut être une sous-estimation de la taille des complexes protéiques.

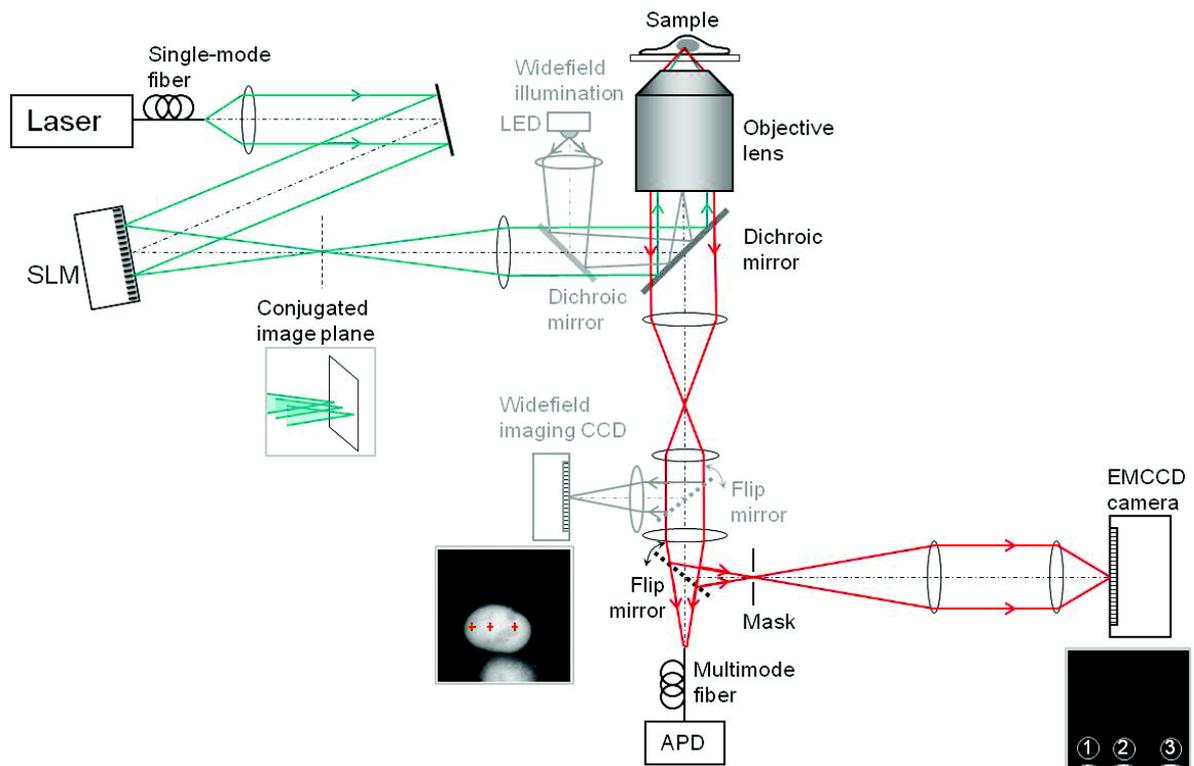
Le mutant HSF1- $\Delta$ TRIM présente des complexes protéiques un peu moins importants que la protéine sauvage en condition normale (Figure 23-D). Ceci s'explique encore une fois par la perte totale du domaine de trimérisation, qui peut entraîner la perte d'interaction avec d'autres partenaires protéiques. Après choc thermique, la taille des complexes formés par le mutant HSF1- $\Delta$ TRIM augmente, mais reste très limitée, avec une taille maximale de 400-500 kDa. Il semblerait que certains partenaires soient capables d'interagir avec HSF1, uniquement en réponse au choc thermique, indépendamment de son état trimérique.

## **2. Développement d'un système multi-confocal FCS (mFCS) pour l'analyse de la dynamique du facteur de transcription HSF1.**

Le développement du système mFCS, ainsi que les premières mesures de dynamique d'HSF1 en cellules H1299 ont fait l'objet d'une publication dans le journal « Frontiers in Bioscience », en 2011 (cf. Annexe 1).

### **2.1. Intérêt**

Pouvoir analyser la dynamique de protéines fluorescentes à différents endroits au même instant présente un réel enjeu biologique. En FCS conventionnelle, l'analyse en plusieurs points ne peut se faire qu'en mode séquentiel, très couteux en temps. Nous avons développé un système mFCS permettant une analyse en plusieurs points simultanément, dont l'intérêt principal est de pouvoir comparer la dynamique d'une protéine au sein d'une même cellule, au même moment, mais à différents endroits ou compartiments cellulaires. Dans le cas des facteurs de transcription, les sites de liaison spécifiques ne sont pas répartis de façon homogène dans l'espace. Il devient possible de comparer la variabilité entre les différents points, et donc de mettre en évidence une variabilité intracellulaire. Il est aussi possible d'envisager l'étude de flux ou de mouvements dirigés à l'intérieur de la cellule, en analysant la variation du nombre de molécules de l'espace, ou en réalisant des expériences de corrélation croisée dans l'espace. Au-delà de ces aspects spatio-temporels, un autre intérêt des techniques mFCS est le gain de temps.



**Figure 24 Schéma du système expérimental utilisé pour les mesures mFCS.**

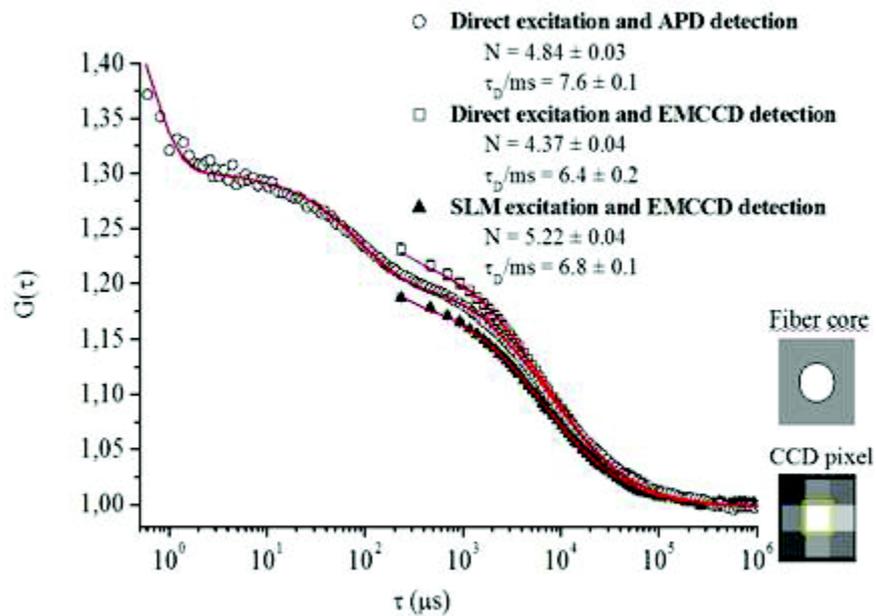
Le trajet optique du faisceau d'excitation est représenté par le trait vert. A partir du laser, le faisceau passe sur le modulateur spatial de lumière (SLM). Le SLM crée plusieurs points qui sont ensuite envoyés sur l'échantillon via l'objectif. La fluorescence émise (trait rouge) est ensuite envoyée sur une photodiode à avalanche (APD) pour la détection d'un point unique, ou sur une caméra EMCCD pour la détection de plusieurs points. Pour l'imagerie plein champs (partie grisée), l'excitation est assurée par une diode électroluminescente émettant à 470 nm et la détection de la fluorescence est assurée par une caméra CCD.

Il est possible d'obtenir plusieurs ACFs pour la même durée qu'une acquisition conventionnelle. Tout cela procure aussi à cette technique un pouvoir statistique important, en multipliant considérablement le nombre d'acquisitions, par rapport à une analyse conventionnelle en simple point.

## 2.2. Description du système mFCS

Nous avons participé au développement d'un système de FCS muti-confocale (mFCS) qui combine les propriétés d'un modulateur spatial de lumière (SLM) et d'une caméra sensible et rapide EMCCD. Le système est développé au LIPhy (Equipe MOTIV, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, Grenoble) par l'équipe d'Antoine Delon. Il est basé sur un microscope inversé Olympus IX70. L'excitation est assurée par un laser solide émettant à une longueur d'onde de 488 nm avec une puissance maximale de 20 mW. Le laser peut ensuite être envoyé sur deux voies d'excitation différentes. La première, directe, est envoyée directement à l'objectif pour exciter l'échantillon. La deuxième voie passe par le modulateur spatial de lumière (LCOS-SLM X10468-01, Hamamatsu). Le faisceau laser est alors étendu afin de couvrir l'ensemble du SLM (800x600, pixel de 20  $\mu\text{m}$ ), qui permet de moduler à souhait la phase de l'onde incidente. Dans notre cas, il génère plusieurs faisceaux qui sont ensuite focalisés sur l'échantillon via l'objectif (Plan-apo 60x, NA=1,2, Olympus) (Figure 24).

La détection dépend de la voie d'illumination choisie. Pour la voie directe, le faisceau passe à travers une fibre optique multimode de 100  $\mu\text{m}$  connectée à une photodiode à avalanche (APD). La fibre multimode joue le rôle du pinhole et l'ensemble permet de réaliser des mesures FCS classiques. La deuxième voie, en mFCS, permet l'acquisition en simultanée des fluctuations de fluorescence à l'intérieur des multiples points créés par le SLM. La détection est assurée par une caméra rapide et sensible EMCCD (iXon+, Andor Technology, 128x128, pixel de 24  $\mu\text{m}$ ) (Figure 24). Dans le cas de la caméra EMCCD, chaque pixel agit comme un pinhole individuel pour chaque acquisition parallèle. Pour obtenir une résolution temporelle suffisante pour l'étude de la dynamique d'un facteur de transcription, les points générés par le SLM sont alignés sur la première ligne de la caméra EMCCD. La caméra est paramétrée sur un mode de lecture Crop FvB (« Full vertical Binning »). Avec ce mode, les charges provenant de la même colonne sont regroupées verticalement avant la lecture, d'où la nécessité d'éliminer la lumière hors-focus en appliquant un masque sur le reste de la caméra pour éviter l'illumination des parties inutilisées par la lumière hors-focus, qui pourrait détériorer le signal. Ce mode permet d'obtenir une fréquence de rafraîchissement de 70 kHz (résolution temporelle de 14  $\mu\text{s}$ ), mais oblige à un alignement parfait des spots sur la première ligne de la caméra.



**Figure 25 Validation en solution du système mFCS**

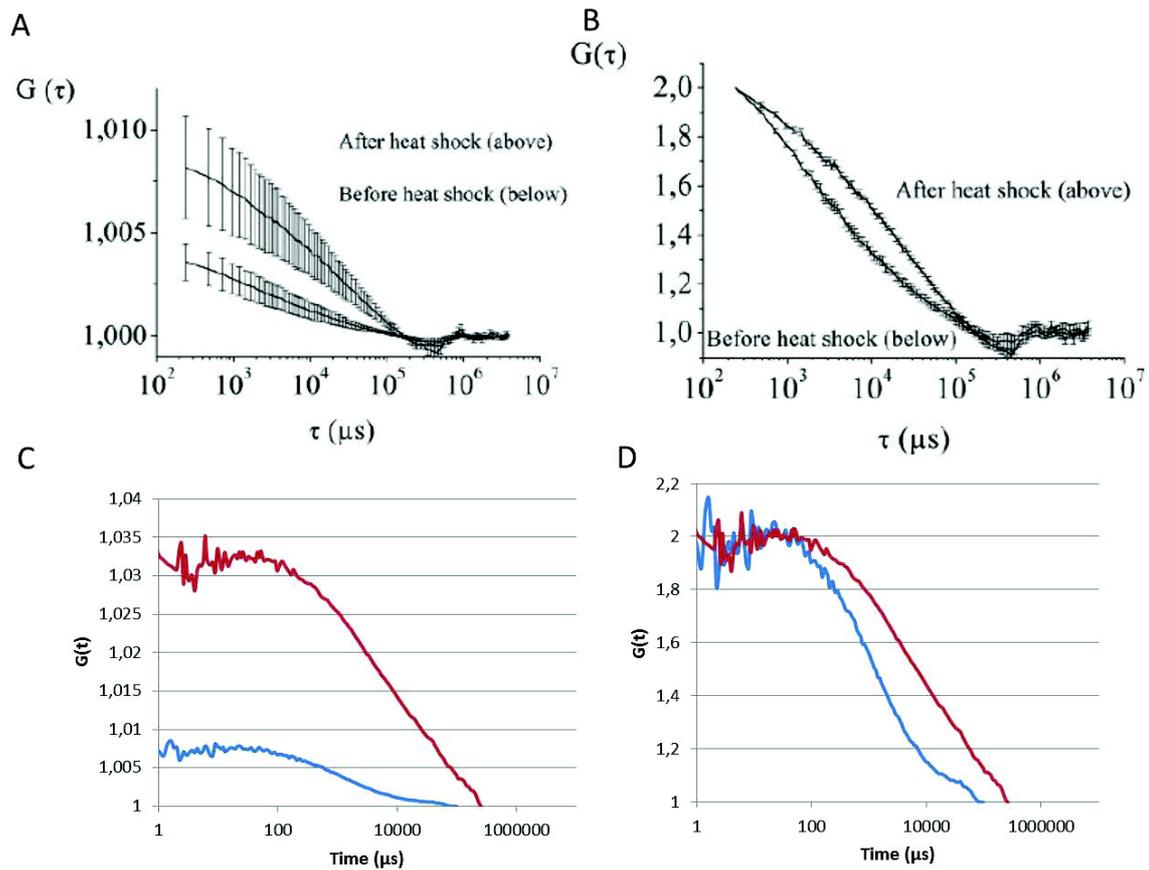
Comparaison des courbes d'autocorrélation obtenues pour la sulforhodamine G (SRG) en solution en fonction des différentes voies d'excitation et de détection : voie directe détectée par l'APD (rond), voie directe détectée par la caméra EMCCD (carré), voie SLM détectée par la caméra EMCCD (triangle). Les courbes détectées par la caméra EMCCD sont limitées par la résolution temporelle du système (environ 200  $\mu\text{s}$ ).

Pour visualiser les cellules marquées avec la protéine fluorescente eGFP, l'illumination est assurée par une diode électroluminescente émettant à 470 nm. La détection est assurée par une caméra CCD (Clara, Andor Technology, Figure 24, partie grisée). L'ensemble du système est géré via une interface développé sous MATLAB, qui permet aussi d'analyser les données de mFCS.

### **2.3. Mise au point du système d'induction du choc thermique sur microscope**

Pour la mise au point des conditions de choc thermique sous microscope et des conditions de culture cellulaire en absence de CO<sub>2</sub>, nous avons utilisé la lignée cellulaire H1299 exprimant la protéine HSF1-eGFP. Le choc thermique est induit directement sur le microscope en utilisant un système Delta T de Bioptechs. Ce système est constitué de 3 parties : une bague qui encercle l'objectif, une platine pour support spécifique, et un couvercle. Le courant que reçoit chacun de ces éléments est ajustable afin de réguler la température par effet joule. Les supports spécifiques sont des coupelles Delta T, recouvertes sur la face inférieure par un revêtement spécifique permettant la conduction du courant électrique. Le passage du courant sur l'ensemble de la coupelle permet une répartition homogène de la température sur l'ensemble du support. Pour mettre au point les conditions de choc thermique, nous avons utilisé deux outils, le premier exploite la faculté intrinsèque d'HSF1 de former des corps nucléaires de stress lorsque les conditions de choc thermique sont suffisantes (au-delà de 42°C). Le deuxième est un indicateur de température collé à la lamelle de verre de la coupelle et immergé dans de l'eau. L'une des principales difficultés dans la mise au point des conditions de choc thermique provient de la limite de température applicable aux optiques du microscope. Pour ne pas détériorer l'objectif, il n'est pas possible d'appliquer des températures supérieures à 40°C, les colles utilisées dans leur fabrication n'étant pas données pour supporter des températures supérieures. Il nous a donc fallu jongler entre la température de l'objectif et la température de la coupelle pour trouver le juste équilibre permettant d'obtenir une température homogène dans la coupelle. En condition normale, l'objectif est maintenu à 37°C, la coupelle à 37°. Après choc thermique, la coupelle est chauffée jusqu'à 43,5°C et l'objectif à 39°C. Ces valeurs permettent d'obtenir une répartition homogène de la température de 37°C en NHS et 43°C en HS sur l'ensemble de la coupelle. Le voltage appliqué au couvercle est aussi adapté à chaque condition, ce qui évite des échanges thermiques trop importants entre l'extérieur et le milieu à l'intérieur de la coupelle.

Les conditions de culture ont été elles aussi adaptées pour permettre une survie maximale des cellules en absence de CO<sub>2</sub> et après induction du choc thermique. Afin de tamponner le milieu en absence de CO<sub>2</sub>, nous avons ajouté de l'HEPES (concentration finale de 20 mM pour les cellules HeLa et H1299 et de 10 mM pour les cellules U87). Dans un premier temps, nous avons cultivé les



**Figure 26** Courbes d'autocorrélation en mFCS et FCS d'HSF1-eGFP en cellules H1299

A et B, courbes d'autocorrélation d'HSF1-eGFP avant (bas) et après (haut) choc thermique, obtenues en mFCS. A, les courbes non normalisées rendent compte d'un changement du nombre de molécules après choc thermique. B, les courbes sont normalisées à 240  $\mu\text{s}$  (limite de la résolution temporelle), elles rendent compte d'un ralentissement de la dynamique après choc thermique.

C et D, courbes d'autocorrélation d'HSF1-eGFP avant (bleu) et après (rouge) choc thermique, obtenues en FCS simple point avec le module Confocor 2 du système commercial Zeiss LSM510. C, courbe non normalisées, D courbes normalisées aux premiers temps (dizaines de microseconde).

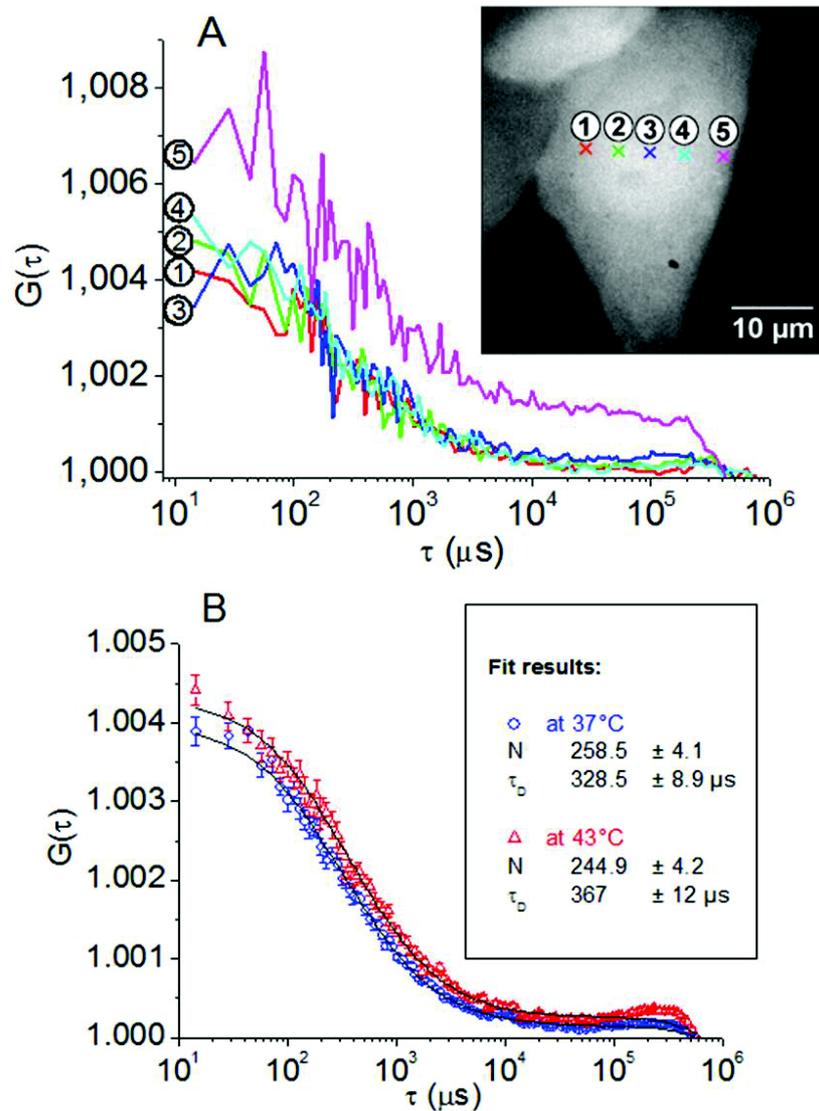
cellules dans un milieu HBSS, pour éviter l'autofluorescence induite par le rouge de phénol, et pour que l'effet tampon de l'HEPES soit efficace. Cependant il s'avère que l'utilisation d'un milieu de culture DMEM blanc, en présence de glutamine et de SVF (1%) est plus bénéfique à la survie des cellules en présence d'HEPES. Ces observations sont basées sur une inspection des cellules en lumière transmise avant et après choc thermique, mais aussi avant et après illumination par le laser.

#### 2.4. Validation du système mFCS

Les premières validations ont été faites sur la première version du système mFCS. La résolution temporelle de la caméra EMCCD n'était alors que d'environ 200  $\mu$ s. La Figure 25 rend compte de cette différence de résolution temporelle entre la détection via l'APD et via la caméra EMCCD. Les courbes d'autocorrélations sont similaires quelles que soient les voies d'excitation et de détection choisies pour la sulforhodamine G en solution (Figure 25).

Nous avons réalisé des acquisitions avant et après choc thermique sur les cellules H1299 exprimant la protéine HSF1-eGFP. Les courbes d'autocorrélation en mFCS sont présentées en Figure 26-A et B. Nous observons que le choc thermique induit un ralentissement de la dynamique d'HSF1. Pour valider le système mFCS nous avons réalisé des acquisitions en FCS conventionnelle sur un système commercial ZEISS LSM 510 Confocor2. Nous observons, comme en mFCS, un ralentissement de la dynamique après choc thermique (Figure 26-C et D). Si l'on ramène les courbes à la même résolution temporelle (200  $\mu$ s), on observe que les courbes sont similaires. Une différence importante est l'ordonnée à l'origine qui permet de définir le nombre de molécules et donc de remonter à la concentration. Le système mFCS actuel a été grandement amélioré et possède une résolution temporelle de 14  $\mu$ s, ce qui permet d'obtenir une meilleure précision sur l'ordonnée à l'origine et donc une meilleure estimation de la concentration. La visualisation et le positionnement des points sur les cellules ont aussi été améliorés par l'acquisition d'une nouvelle caméra CCD. La vitesse d'enregistrement des données a été accélérée par la mise en place d'un disque dur plus rapide, ce qui permet de fluidifier le système. L'interface utilisateur a été modifiée de façon à rendre le système plus accessible pour de nouveaux utilisateurs non-initiés.

Nous avons développé un système de multi-confocal FCS qui permet l'acquisition d'un grand nombre de données en simultané. Ce système possède une résolution temporelle suffisante pour l'analyse en cellule vivante et, avec les différentes améliorations apportées, pourrait être appliqué à d'autres types d'analyse.



**Figure 27** Courbe d'autocorrélation d'eGFP en cellules HeLa

A. Exemple de positionnement des spots à l'intérieur d'une cellule HeLa-eGFP à 37°C et des courbes d'autocorrélation correspondantes. Sur la photo les points 1 à 4 sont localisés dans le noyau, le point 5 se trouve dans le cytoplasme. B. Courbes d'autocorrélation moyennes obtenues pour les cellules HeLa-eGFP avant (bleu) et après (rouge) choc thermique. Dans le cadre sont représentés les résultats de l'ajustement des deux courbes.

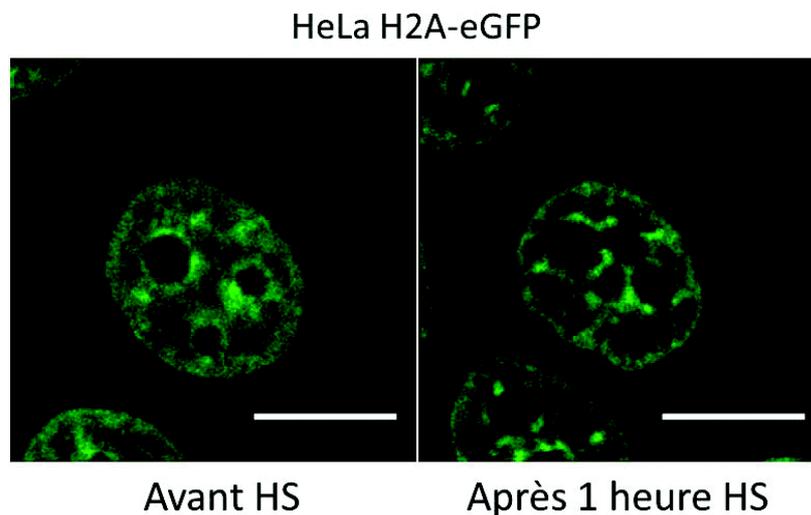
### 3. Analyse de la dynamique d'HSF1 par mFCS et FRAP

Pour analyser la dynamique d'HSF1, nous avons dans un premier temps analysé la dynamique de la protéine eGFP en cellules vivantes, puis la dynamique de la protéine sauvage HSF1 et enfin la dynamique des différents mutants.

#### 3.1. Analyse de la dynamique de la protéine eGFP

La protéine eGFP a été utilisée pour pouvoir contrôler l'efficacité du système mais surtout pour servir de référence par rapport à l'analyse de la dynamique d'HSF1. La protéine eGFP sert de standard dans beaucoup de calculs, notamment pour estimer la masse ou la diffusion d'une protéine d'intérêt, mais aussi pour déterminer des valeurs limites de certaines constantes, notamment la constante de diffusion.

Pour les expériences en cellules vivantes, cinq spots sont répartis de façon irrégulière le long de la ligne avec une distance moyenne entre les spots d'environ 3  $\mu\text{m}$ . Avant chaque nouvelle expérience de mFCS, une solution de Dextran-Rhodamine Green est utilisée afin de calibrer et de vérifier la stabilité de l'appareil. Pour chaque cellule, deux séries de mesures sont effectuées, avec au moins trois points dans le noyau des cellules. Une série de mesure consiste en cinq acquisitions de dix secondes, suivi d'une acquisition sans laser qui sert à éliminer le bruit de fond.

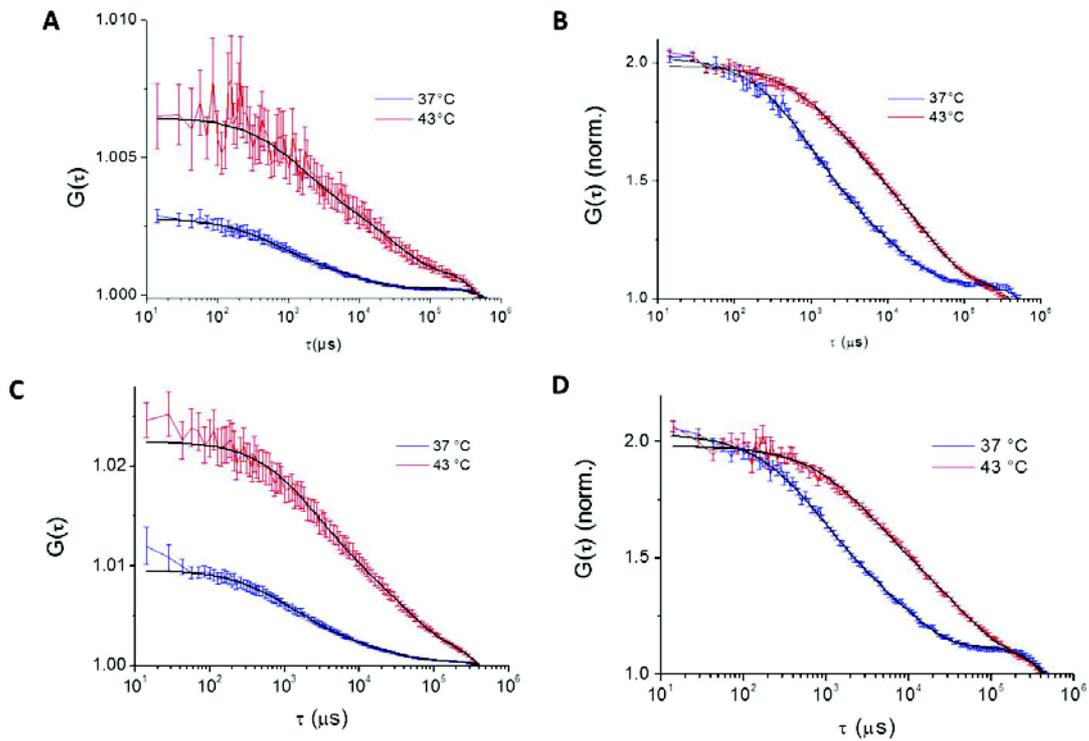


**Figure 28** Modification de la texture chromatinienne induite par le choc thermique

Image confocale d'un noyau d'une cellule HeLa exprimant l'histone de cœur H2A fusionnée à la protéine eGFP, avant (gauche) ou après une heure de choc thermique (droite). La visualisation de l'histone H2A permet de voir l'état de condensation de la chromatine par microscopie de fluorescence. Barre = 10  $\mu\text{m}$ .

La moyenne de toutes les courbes obtenues pour les cellules HeLa-eGFP, peut être ajustée avec un modèle de diffusion libre en 3D. La Figure 27-A représente la position de chaque point dans une cellule HeLa-eGFP à 37°C et l'ACF correspondante. Le point cinq est le seul point présent hors du noyau, dans le cytoplasme. La Figure 27-B permet de comparer les courbes moyennes à 37°C (bleu) et à 43°C (rouge). Nous observons peu de différences avant et après choc thermique. Pour voir si le choc thermique avait un effet irréversible sur la dynamique de la protéine eGFP, nous avons inversé le sens d'analyse pour une coupelle, en commençant l'analyse à 43°C puis en laissant les cellules récupérer à 37°C pendant une heure, alors que les deux autres coupelles ont d'abord été analysées à 37°C puis chauffées pendant une heure à 43°C. Que ce soit la température, la séquence d'analyse ou la localisation des points, aucun de ces éléments n'a un effet significatif sur le temps de diffusion ( $\tau_D$ ) ou sur le nombre de molécules (N). Nous avons observé toutefois une diminution de l'intensité globale de 23% après choc thermique. Comme le nombre de molécules ne change pas significativement entre 37 et 43°C, cette diminution correspond à une baisse de la brillance de la protéine eGFP de 23% à 43°C.

Le temps de diffusion varie de 314 à 588  $\mu\text{s}$  (pour respectivement le premier et le dernier quartile) avec une médiane à 422  $\mu\text{s}$ . En utilisant le rayon du volume d'observation ( $\omega_r=0,251 \mu\text{m}$ ), la constante de diffusion médiane a pu être déterminée à  $D= 37 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , ce qui est quatre fois plus lent que la valeur obtenue pour la protéine eGFP en solution ( $155 \mu\text{m}^2/\text{s}$  à 37°C). Le choc thermique induit d'importants changements de texture chromatinienne, observables en utilisant des lignées cellulaires exprimant la protéine H2A-eGFP (Figure 28). Ces modifications apparaissent dès 15 minutes de choc, mais sont plus prononcées après une heure de choc thermique (cf. Annexe 2.3). Comme la mobilité de la protéine eGFP est dépendante de l'état de compaction de la chromatine (Bancaud et al., 2009), la dynamique de la protéine eGFP pourrait être modifiée par le choc thermique. Or nous n'observons pas de modification de la dynamique de la protéine eGFP à 43°C, malgré sa dépendance vis-à-vis de la viscosité. En effet celle-ci diminue avec la température, c'est-à-dire lors du choc thermique. Son effet doit donc contrebalancer l'effet de la texture chromatinienne sur la dynamique de la protéine eGFP. Pour comparer ces données avec les données de la protéine hHSF1-eGFP, les courbes moyennes ont été ajustées avec un modèle de diffusion et d'interaction en faisant varier les paramètres, fraction de molécules libres ( $F_{eq}$ ) et temps de dissociation ( $t_{off}$ ). Les ajustements ne sont pas de meilleure qualité que ceux obtenus pour le modèle de diffusion libre et aucun paramètre ne varie de façon significative avec la température.



**Figure 29** Courbe d'autocorrélation d'hHSF1-eGFP dans les cellules U87 et HeLa avant et après choc thermique

A et B. Courbes d'autocorrélation moyenne obtenue en mFCS sur les cellules U87 HSF1-eGFP, avant (bleu) ou après (rouge) choc thermique. A. courbes d'autocorrélation non normalisée, B. Courbes d'autocorrélation normalisée.

C et D. Courbes d'autocorrélation moyenne obtenue en mFCS sur les cellules HeLa HSF1-eGFP, avant (bleu) ou après (rouge) choc thermique. C. courbes d'autocorrélation non normalisée, D. Courbes d'autocorrélation normalisée.

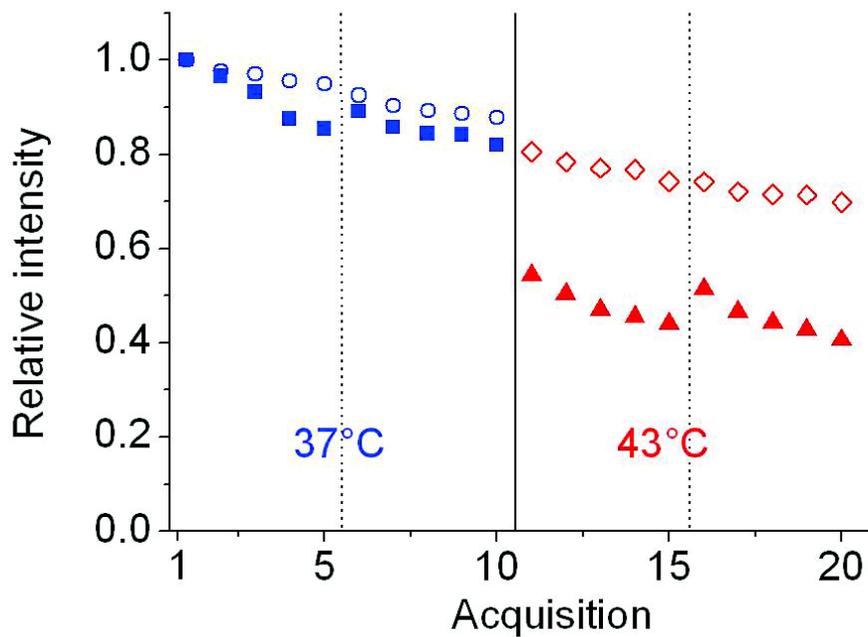
Cependant la constante de diffusion médiane augmente jusqu'à une valeur  $D = 79 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , due au fait que les temps longs de la courbe d'autocorrélation sont pris en compte par le paramètre  $t_{\text{off}}$ . La constante de vitesse de dissociation est de  $k_{\text{off}} = 240.5 \text{ s}^{-1}$  et la fraction liée est de 16%.

### 3.2. Analyse de la dynamique d'HSF1

Les cellules exprimant la protéine hSHF1-eGFP ont été analysées en mFCS et en FRAP. En mFCS, le même protocole que pour l'étude de la dynamique de la protéine eGFP a été utilisé. Les mesures sont réalisées dans le noyau, en dehors des corps nucléaires de stress et en dehors des nucléoles. En FRAP les mesures sont réalisées i) dans le noyau en dehors des nucléoles, ii) dans les corps nucléaires de stress.

En mFCS, Les courbes d'autocorrélation sont ajustées avec un modèle complet de diffusion et interaction, le modèle de diffusion libre, contrairement aux cellules HeLa-eGFP, donnant des ajustements de mauvaise qualité. Les courbes non normalisées pour les cellules U87 et HeLa (Figure 29–A et C) rendent compte d'une diminution importante du nombre de molécules ou complexes moléculaires. En effet sur les courbes d'autocorrélation, l'ordonnée à l'origine est inversement proportionnelle au nombre de molécules et donc à la concentration en molécules. L'analyse des données pour l'ensemble des courbes d'autocorrélation, montre une diminution de l'intensité globale et du nombre de molécules HSF1-eGFP par un facteur deux après choc thermique. L'ensemble de ces données reflètent la trimérisation et la relocalisation d'HSF1 dans les corps nucléaires de stress.

La trimérisation aurait dû provoquer une augmentation très significative de l'intensité moyenne ou brillance des molécules, ce qui n'a pas été observé. La brillance d'une molécule est définie par le nombre de photons détectés par molécule et par unité de temps. En FCS la brillance d'une molécule est obtenue en divisant la fluorescence totale par le nombre de molécules ( $\eta = F/N_{\text{Eff}}$ ). Dans les cellules U87-HSF1-eGFP, le fait que l'intensité globale soit divisée par deux comme le nombre de molécules après choc thermique, signifie que la brillance de la molécule ne change pas. Pour avoir une vision de la baisse d'intensité globale, la courbe de l'intensité relative en fonction du temps a été tracée sur la Figure 30, pour la protéine eGFP seule et la protéine HSF1-eGFP. Dans les cellules U87-HSF1-eGFP (symbole plein), le passage de 37 à 43°C induit une baisse importante de l'intensité relative, reflétant clairement la conséquence de la relocalisation d'HSF1 dans les corps nucléaires de stress. Cette baisse prononcée de l'intensité relative n'est pas observée pour les cellules HeLa-eGFP (symbole vide). La légère baisse observée pour eGFP entre les deux températures peut être attribuée uniquement à la baisse de brillance de la molécule.



**Figure 30** Variation relative de l'intensité de fluorescence au cours de l'acquisition

Tracé de l'intensité relative en fonction du numéro d'ordre d'acquisition. Pour une cellule, deux séries de mesure de cinq répétitions sont effectuées à chaque température (1 :5, 6 :10 ; 11 :15, 16 :20). Les deux séries d'acquisitions successives sont séparées par un trait en pointillé, le trait plein sépare les deux températures. Les symboles vides correspondent aux cellules HeLa-eGFP (cercle bleu, losange rouge), alors que les symboles pleins correspondent aux cellules U87-hHSF1-eGFP (carré bleu, triangle rouge).

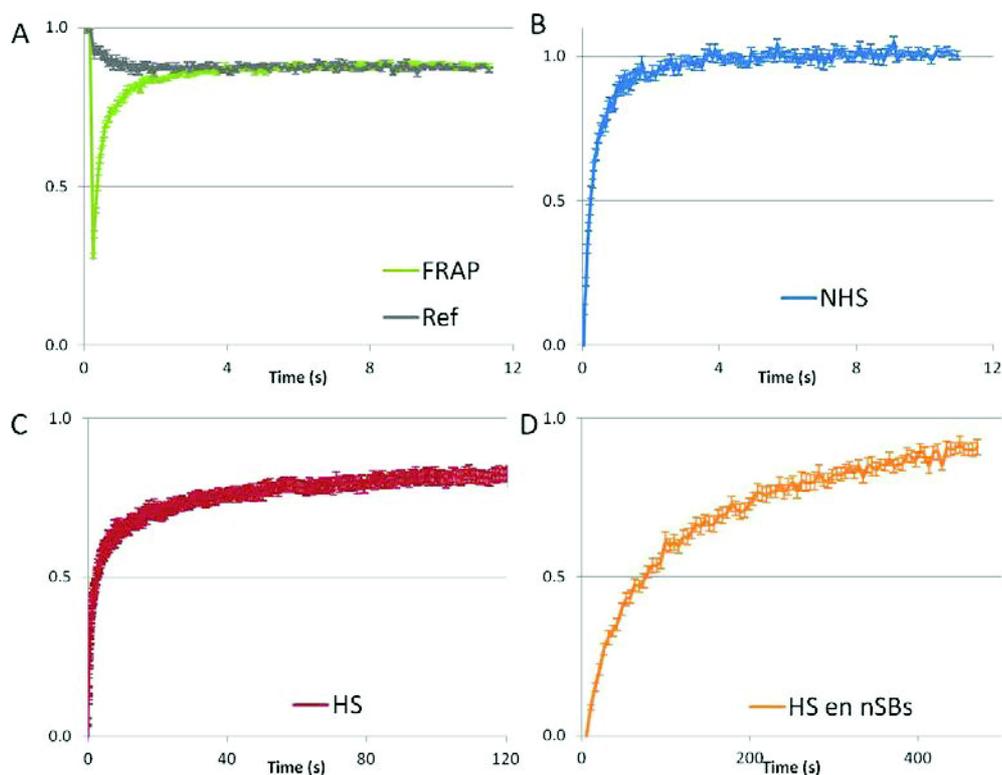
Pour les cellules U87-hHSF1-eGFP, à chaque température, nous observons pour chaque nouvelle série d'acquisition de cinq répétitions, une légère augmentation de l'intensité relative. Cette différence peut être attribuée aux molécules peu mobiles photoblanchies. Quand les points sont déplacés lors de la deuxième série d'acquisition, les nouvelles molécules peu mobiles commencent à être photoblanchies. De telles molécules peu mobiles ne sont pas retrouvées pour les cellules HeLa-eGFP, où la baisse d'intensité est monotone aux deux températures. La brillance est maintenue entre 37 et 43°C à cause de l'action réciproque de la trimérisation d'HSF1 et du photoblanchiment. Ainsi trois phénomènes contribuent à la baisse du nombre de molécules après choc thermique : la trimérisation d'HSF1, la relocalisation d'HSF1 dans les corps nucléaires de stress mais aussi le photoblanchiment qui est augmenté quand la protéine HSF1-eGFP est liée à l'ADN (Delon et al., 2006).

Les courbes d'autocorrélation normalisées pour les cellules U87 et HeLa exprimant la protéine hHSF1-eGFP sont présentées Figure 29-B et D. Ces courbes montrent un ralentissement de la dynamique d'HSF1 avec un allongement du temps de diffusion après choc thermique. En utilisant un modèle complet de diffusion et interaction, nous avons déterminé les paramètres dynamiques  $t_D$ ,  $t_{off}$  (ou  $k_{off}=1/t_{off}$ ),  $F_{eq}$  (Valeurs médianes, Tableau 4). La valeur médiane de la constante de diffusion  $D$  d'HSF1-eGFP est de  $18 \mu\text{m}^2/\text{s}$  à  $37^\circ\text{C}$  et  $7,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  à  $43^\circ\text{C}$  pour les cellules U87 et de  $14 \mu\text{m}^2/\text{s}$  à  $37^\circ\text{C}$  et  $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  à  $43^\circ\text{C}$  pour les cellules HeLa.

**Tableau 4 Paramètres dynamiques d'hHSF1-eGFP obtenues en mFCS sur les cellules U87 et HeLa**

	U87 – NHS	U87 – HS	HeLa – NHS	HeLa – HS
Int (kHz)	39 [25 – 60]	17 [13 – 25]	33 [25 – 46]	9 [6 – 12]
N	447 [321 – 606]	197 [145 – 267]	115 [81 – 222]	57 [34 – 93]
$t_D$ ( $\mu\text{s}$ )	873 [492 – 1223]	2197 [1007 – 3868]	1112 [926 – 1459]	1501 [1127 – 2606]
$D$ ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )	18,0 [12,9 – 32,0]	7,2 [4,1 – 15,6]	14,2 [10,8 – 17,0]	10,5 [6,0 – 14,0]
$k_{on}^*$ ( $\text{s}^{-1}$ )	22,4 [8,8 – 46,3]	23,3 [11,1 – 44,9]	15,0 [8,2 – 24,8]	15,9 [9,9 – 26,1]
F liée	0,28 [0,20 – 0,35]	0,44 [0,34 – 0,55]	0,24 [0,19 – 0,28]	0,39 [0,31 – 0,48]
$k_{off}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	65,1 [33,5 – 102,4]	30,2 [17,7 – 48,3]	45,2 [30,9 – 66,1]	25,2 [16,3 – 33,5]

Valeurs médianes, [premier et troisième quartile]



**Figure 31** Courbes de récupération de fluorescence d'HSF1-eGFP avant et après choc thermique et dans les corps nucléaires de stress

A - C. Les expériences de FRAP sont réalisées en balayant en continu une ligne de 128 pixels, le photoblanchiment ayant lieu sur un cercle d'un rayon de dix pixels, situé au centre de la ligne. A. Courbes de FRAP obtenues dans le nucléoplasme avant choc thermique. La courbe de FRAP non normalisée (verte) est obtenue en moyennant les dix pixels du centre de la ligne, et la courbe de référence (grise) est prise sur les extrémités de la ligne. B. Courbe de FRAP normalisée obtenue avant choc thermique, rapport de la courbe brute (verte-A) sur la courbe de référence (grise-A). La récupération est obtenue en 12 secondes. C. Courbe de FRAP obtenues dans le nucléoplasme après une heure de choc thermique. La récupération est obtenue en plus de 120 secondes. D. Les courbes de FRAP dans un nSBs sont obtenues à partir d'une série d'image en z d'une région carrée. Le photoblanchiment a lieu sur un cercle de rayon de dix pixels placés sur un nSBs. La courbe est normalisée à l'aide d'un autre nSBs. La récupération est obtenue en 500 secondes.

En utilisant la constante de diffusion de la protéine eGFP définie précédemment ( $D = 37 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) et en supposant que la protéine diffuse sous une forme globulaire, il est possible d'estimer la constante de diffusion théorique de la protéine HSF1-eGFP compte tenu de sa masse. Les constantes de diffusion de la protéine HSF1-eGFP sous forme monomérique à 37°C ou sous forme trimérique à 43°C devraient être respectivement de 26 et 18  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ . Ces valeurs étant plus élevées que nos valeurs expérimentales, HSF1 diffuserait sous la forme d'un complexe moléculaire de masse plus importante.

A partir de nos valeurs expérimentales, la masse moléculaire calculée des complexes HSF1-eGFP est de 235 – 498 kDa à 37°C et de 3664 – 1368 kDa à 43°C, respectivement en cellules U87 et HeLa. La valeur à 37°C est en accord avec nos données obtenues en fractionnement sur gradient de glycérol après ultracentrifugation ( $\approx 200$  kDa) et les données de la littérature en gel filtration (220-360 kDa) (Sarge et al., 1993; Zuo et al., 1994; Baler et al., 1993). La masse moléculaire déterminée après choc thermique est par contre significativement plus grande que celle donnée dans la littérature (700-800 kDa), mais nos données sur gradient de glycérol montrent l'existence de complexes supérieur à 700 kDa. La fraction liée augmente après choc thermique et passe de 25.6 à 43.5% pour les cellules U87 et de 24.4 à 48.4% pour les cellules HeLa. Ceci reflète une augmentation des interactions d'HSF1 avec l'ADN après choc thermique. De plus la constante de vitesse de dissociation  $k_{\text{off}}$  diminue après choc thermique et passe de 65 à 30.1  $\text{s}^{-1}$  pour les cellules U87 et de 45.2 à 25.2  $\text{s}^{-1}$  pour les cellules HeLa. Cette baisse correspond à une augmentation du temps de résidence de la protéine sur l'ADN après choc thermique. Ainsi, en plus de l'augmentation de la taille des complexes reflétée par la constante de diffusion, nous observons une augmentation des interactions avec l'ADN après choc thermique.

Pour confirmer l'hypothèse selon laquelle la constante de diffusion d'HSF1 après choc thermique reflète des interactions spécifiques avec des sites de liaison à l'ADN. Nous avons analysé la variation spatiale des paramètres mesurés avec le modèle complet. La littérature nous indique que le nombre de site spécifique d'HSF1 augmente lors de la réponse au choc thermique (Trinklein et al., 2004; Pandey et al., 2011), mais ce nombre reste limité. On s'attend donc à observer une variabilité intracellulaire plus importante à 43°C. Pour chaque cellule, nous avons calculé les coefficients de variation des paramètres  $D$ ,  $k_{\text{on}}^*$  et  $k_{\text{off}}$ , définis par le rapport de l'écart-type sur la valeur moyenne des mesures obtenues pour différents points dans la cellule. Alors que le coefficient de variation de  $k_{\text{on}}^*$  et  $k_{\text{off}}$  ne varie pas après choc thermique (respectivement 0,90 et 0,57), celui de la constante de diffusion  $D$  va de 0,63 à 37°C à 1,02 à 43°C ( $p < 10^{-5}$ ). Un résultat similaire a été obtenu en cellules HeLa avec le coefficient de variation de  $D$ , qui varie significativement de 0,44 à 37°C à 0,69 à 43°C. L'augmentation de la variabilité peut être attribuée

**Tableau 5 Paramètres dynamiques obtenues en FRAP sur les cellules HeLa HSF1-eGFP**

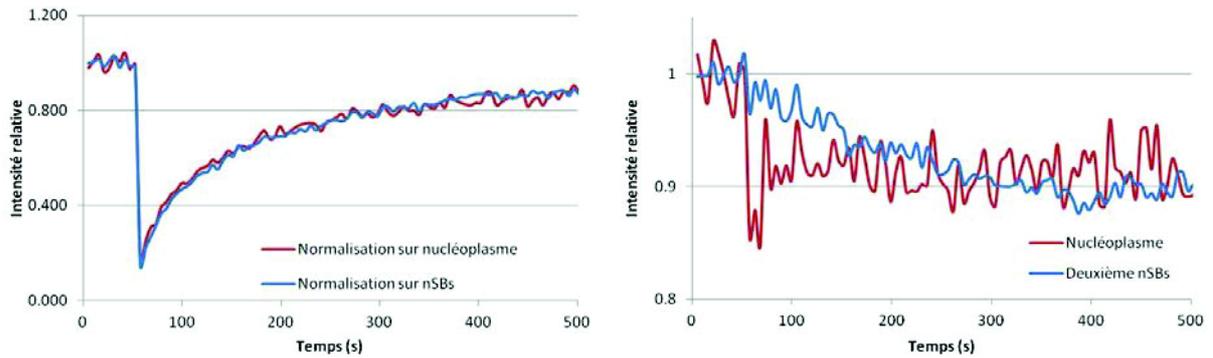
	NHS-nucléoplasme	HS-nucléoplasme	HS-nSBs
$t_{1/2}$ (s)	0,18 [0,14 – 0,21]	2,58 [1,24 – 5,96]	65,4 [46,8 – 80,0]
D ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )	1,92 [1,55 – 2,12]	0,36 [0,26 – 0,59]	0,007 [0,003 – 0,014]
F liée (%)	8 [6 – 10]	26 [15 – 35]	30 [6 - 54]
$k_{\text{off}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	0 [0 – 0,004]	0,019 [0,006 – 0,042]	0,004 [0,001 – 0,007]

Valeurs médianes obtenues sur les courbes individuelles, [premier et troisième quartile].

à la part spécifique des interactions d’HSF1 avec l’ADN qui augmente après choc thermique. Comme les interactions spécifiques sont localisées sur un nombre limité de sites, elles induisent une importante inhomogénéité spatiale (évaluée par le coefficient de variation) de la constante de diffusion. A titre de comparaison, le coefficient de variation de la constante de diffusion pour la protéine eGFP est de 0,4 avant et après choc thermique, ce qui indique que la structure de la chromatine, qui est modifiée après choc thermique, n’impacte pas sur l’inhomogénéité de la diffusion.

Pour compléter les données de mFCS en prenant mieux en compte les échelles de temps plus élevées ( $> 10$  s) et pour pouvoir comparer nos résultats avec ceux de la littérature nous avons réalisé des expériences de FRAP avant et après choc thermique, dans le nucléoplasme mais aussi sur les corps nucléaires de stress. Cette analyse a été restreinte aux cellules HeLa. Nous avons adapté un protocole de FRAP développé par l’équipe de McNally (Stasevich et al., 2010a). Ce protocole (détaillé dans la partie matériel et méthode) nous permet d’atteindre une résolution temporelle de l’ordre de la dizaine de millisecondes, et nous permet de normaliser nos données à partir de la même acquisition. L’analyse sur les corps nucléaires de stress est réalisée avec un protocole différent pour prendre en compte la mobilité cellulaire non négligeable à cause du temps d’acquisition plus long. Pour ce faire, une série d’images en Z est réalisée sur une région d’intérêt carré. La perte de fluorescence induite et permanente est corrigée avec le deuxième corps nucléaires de stress. Dans tous les protocoles, le photoblanchiment est effectué en 80 millisecondes sur un cercle de rayon  $r=1,04 \mu\text{m}$ .

La récupération complète de fluorescence est obtenue dans presque tous les cas ( $> 0,9$ ), avant et après choc thermique, dans le nucléoplasme ou dans les nSBs, mais à des temps différents (Figure 31). Pour la protéine HSF1-eGFP en cellules HeLa, le temps de demi-récupération dans le

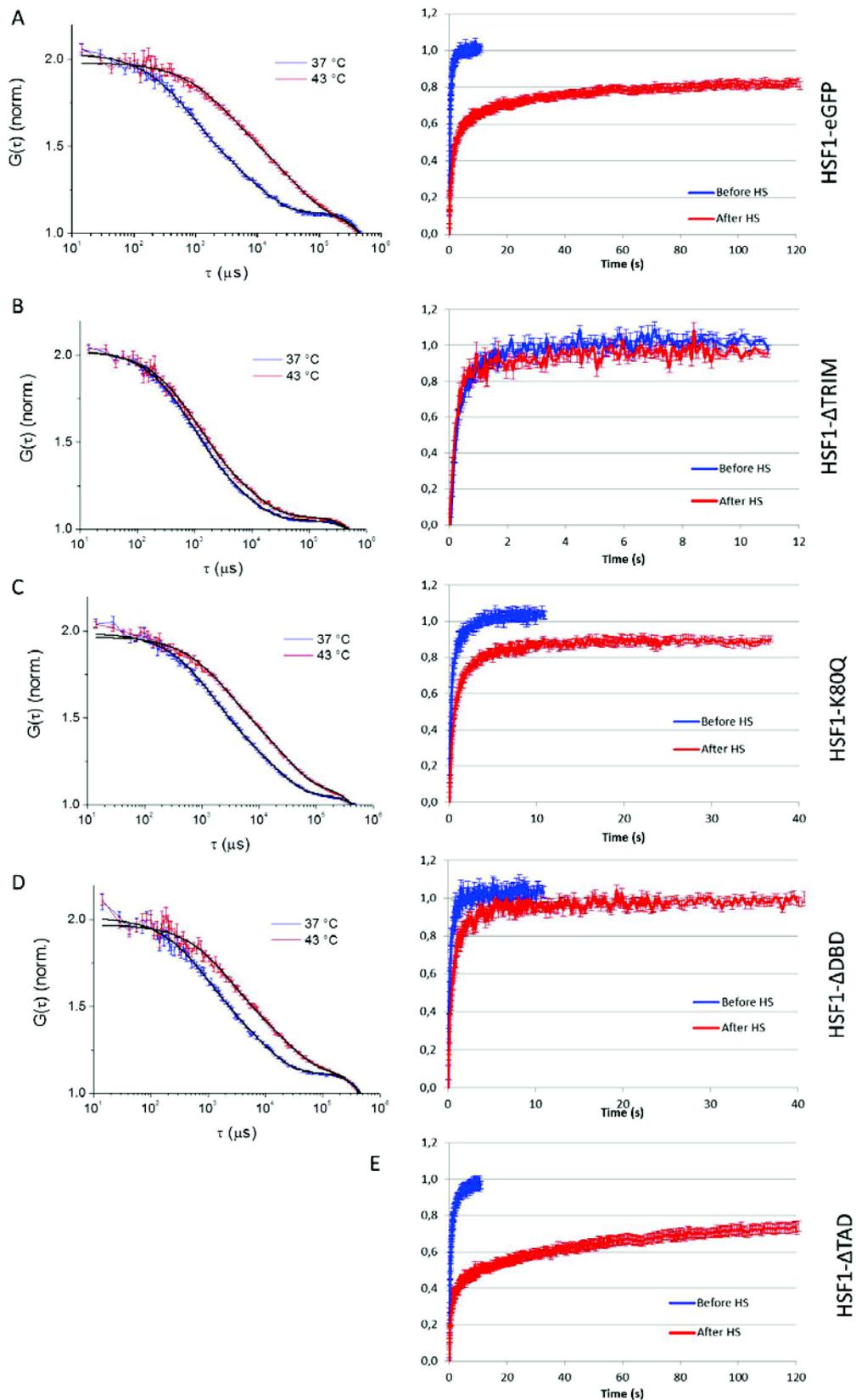


**Figure 32 Normalisation des courbes de FRAP sur les corps nucléaires de stress**

Les courbes de FRAP sur les corps nucléaires de stress peuvent être normalisées à partir d'un deuxième corps nucléaires de stress (bleu) ou à partir du nucléoplasme (rouge). A gauche les courbes de FRAP normalisées des deux façons possibles. A droite, les courbes de références.

nucléoplasme augmente de  $0,2 \pm 0,1$  à  $2,6 \pm 1,1$  s après une heure de choc thermique. Sur le site naturel d'activité d'HSF1, dans les corps nucléaires de stress, le  $t_{1/2}$  atteint une valeur de  $65,4 \pm 3,5$  s (Valeurs médianes des courbes individuelles, Tableau 5). Pour les courbes de FRAP sur les corps nucléaires de stress, deux modes de normalisation ont été testés, le photoblanchiment pendant l'acquisition étant différent pour une protéine libre (nucléoplasme) que pour une protéine liée (nSBs). Le premier mode de normalisation utilise comme référence un deuxième corps nucléaire de stress (Figure 32 - trait bleu), le second une zone dans le nucléoplasme (trait rouge). Dans les deux cas, les courbes de récupération normalisées sont similaires (Figure 32).

Avant choc thermique les courbes de FRAP peuvent être ajustées avec un modèle de diffusion. La constante de diffusion obtenue est probablement une constante de diffusion effective prenant en compte les constantes de vitesse de d'association et de dissociation. Après choc thermique, les courbes sont ajustées, comme en mFCS, avec un modèle de diffusion et interaction. Les résultats sont résumés sur le Tableau 5. Comme en mFCS, la dynamique d'HSF1 est ralentie par le choc thermique. La constante de diffusion varie de  $1.9$  à  $0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  dans le nucléoplasme, respectivement avant et après choc thermique, pour atteindre une valeur de  $0.007 \mu\text{m}^2/\text{s}$  dans les nSBs. La constante de vitesse de dissociation après choc thermique est de  $k_{\text{off}} = 0.019 \text{ s}^{-1}$  dans le nucléoplasme pour une fraction liée de 26 %. Après choc thermique sur les corps nucléaires de stress, la constante de vitesse de dissociation diminue par rapport à celle obtenue dans le nucléoplasme avec une valeur de  $k_{\text{off}} = 0.004 \text{ s}^{-1}$ . La fraction de protéines liées augmente de 26% dans le nucléoplasme à 30% sur les corps nucléaires de stress. Ce qui reflète une augmentation des interactions sur les sites spécifiques d'activité.



**Figure 33** Courbes des mutants d'HSF1 obtenues en mFCS et FRAP

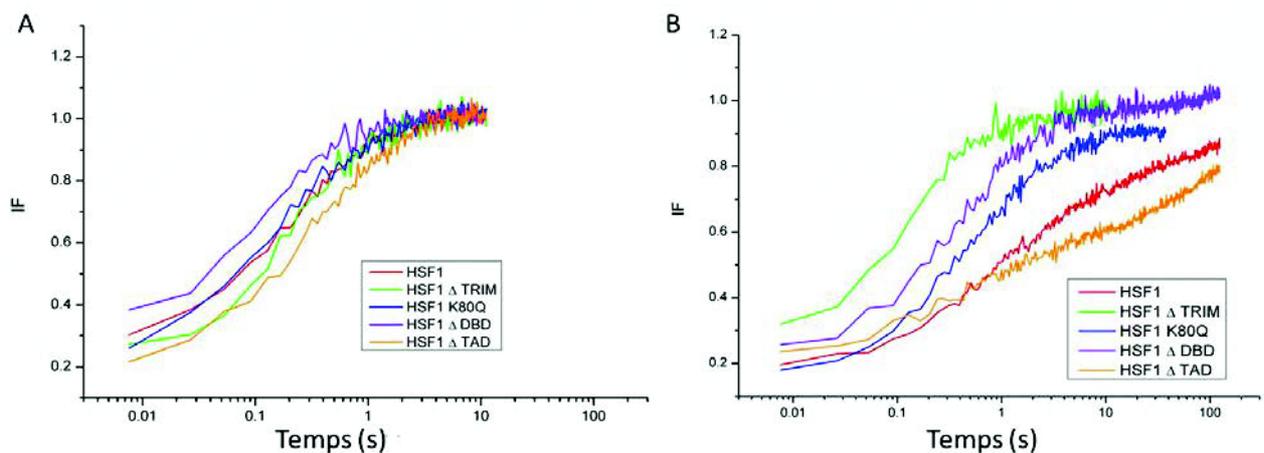
Courbes moyennes de mFCS (gauche) et de FRAP (droite) avant (bleu) et après une heure de choc thermique (rouge) pour A. La protéine HSF1-eGFP, en FRAP la récupération est obtenue en 12 s avant choc thermique et en 120 s après choc thermique B. La protéine HSF1- $\Delta$ TRIM. En FRAP la récupération complète est obtenue en 12 s pour les deux conditions. C. La protéine HSF1-K80Q. D. La protéine HSF1- $\Delta$ DBD. Pour ces deux protéines, en FRAP la récupération après choc thermique est obtenue en 40 s. E. Courbes de FRAP de la protéine HSF1- $\Delta$ TAD. Comme pour la protéine sauvage, la récupération est obtenue en 120 s.

Les données obtenues en mFCS et en FRAP sont significativement différentes, ce qui est probablement due aux échelles d'analyses différentes. En FCS l'échelle d'analyse est inférieure à une seconde, alors qu'en FRAP nous mesurons des paramètres dynamiques à des échelles de temps supérieures : la centaine de millisecondes. La constante de diffusion mesurée en FRAP doit être interprétée comme une constante de diffusion effective, incluant à la fois le temps de diffusion et de faibles associations avec l'ADN. Au contraire, les données de mFCS, acquises sur une durée de dix secondes, doivent sous-estimer ces dynamiques au temps long.

### 3.3. Analyse de la dynamique des mutants d'HSF1

Pour mieux comprendre la dynamique de la protéine sauvage en cellules vivantes, nous avons étudié les différents mutants générés et caractérisés précédemment. Les mutants ont été analysés en mFCS et en FRAP et les courbes ont été ajustées par un modèle de diffusion et d'interaction, les résultats étant présentés sur la Figure 33 et Tableau 6 (valeurs des courbes médianes). Pour rappel, la dynamique de la protéine sauvage HSF1-eGFP est donnée Figure 33-A.

En absence du domaine de trimérisation, la dynamique d'HSF1 n'est pas ou peu modifiée au cours du choc thermique (Figure 33, B). La constante de diffusion et la fraction liée ne sont pas affectées par le choc thermique (en mFCS et en FRAP) (Valeurs médianes, Tableau 6). La protéine HSF1- $\Delta$ TRIM semble même légèrement plus rapide que la protéine sauvage avec une constante de diffusion avant choc thermique, en mFCS, de 14 et 19  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  pour respectivement la protéine sauvage et le mutant HSF1- $\Delta$ TRIM (Figure 34 et Tableau 6).



**Figure 34 Comparaison des courbes de FRAP obtenues pour la protéine sauvage et les mutants d'HSF1**

Comparaison des courbes de FRAP obtenues pour la protéine sauvage (Rouge) et les mutants d'HSF1, avant (A) et après (B) choc thermique. Le temps est représenté sur une échelle logarithmique.

**Tableau 6 Paramètres dynamiques en mFCS et en en FRAP pour la protéine sauvage et les mutants d'HSF1 en cellules HeLa.**

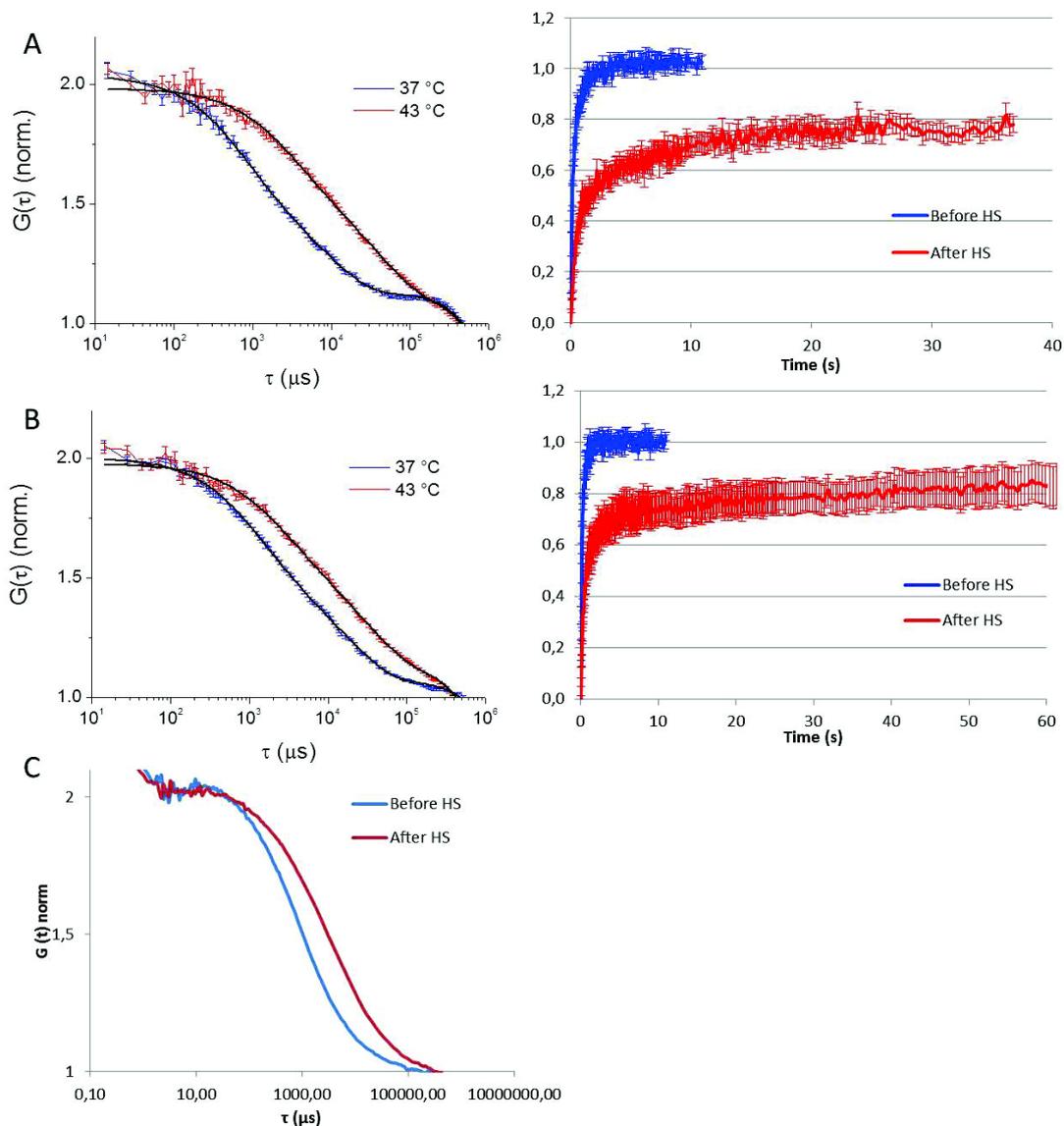
<b>FCS</b>	$t_{1/2}$ (ms)		$D \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$		F liée %		$k_{\text{off}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	
	NHS	HS	NHS	HS	NHS	HS	NHS	HS
HSF1	1.8	4.9	14	10	24.4	39.8	45	25
HSF1- $\Delta$ TRIM	1.2	1.4	19	18	26.6	21.2	90	76
HSF1- $\Delta$ DBD	1.6	4.3	18	8	26.6	34.5	81	34
HSF1-K80Q	2.7	5.8	11	7	29.4	39.0	42	27
<b>siARN HSF1_endogène</b>								
HSF1, siARN	1.4	8.1	19	6	28.6	45.8	76	19
HSF1-K80Q, siARN	2.9	6.9	11	7	34.2	46.9	43	25
<b>FRAP</b>	$t_{1/2}$ (s)		$D \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$		F liée %		$k_{\text{off}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	
	NHS	HS	NHS	HS	NHS	HS	NHS	HS
HSF1 - nucléoplasme	0.14	2.96	1.7	0.3	0	19.1	0	2.5E-02
HSF1 - nSBs		77.4		0.01		45.7		5.0E-03
HSF1- $\Delta$ TRIM	0.21	0.16	1.8	3.0	0	2.8	0	3.4E-02
HSF1- $\Delta$ DBD	0.12	0.41	3.2	0.9	0	1.9	0	2.3E-02
HSF1-K80Q	0.17	0.42	2.8	0.6	9.0	10.0	5.1E-01	0
HSF1- $\Delta$ TAD - nucléoplasme	0.14	2.96	0.9	0.6	0	41.0	0	1.4E-02
HSF1- $\Delta$ TAD - nSBs		93.5		0.006		39.4		2.0E-03
<b>siARN HSF1_endogène</b>								
HSF1, siARN	0.14	0.64	2.1	0.9	0	20.8	0	1.9E-02
HSF1-K80Q, siARN	0.09	0.41	4.0	0.7	0	0	0	1.4E-03

Valeurs médianes obtenues sur les courbes médianes.

De façon plus surprenante, les dynamiques des mutants de liaison à l'ADN (HSF1-K80Q, Figure 33-C et HSF1- $\Delta$ DBD, Figure 33-D) sont significativement affectées par le choc thermique. Comme pour la protéine sauvage, les constantes de diffusion, les pourcentages de protéines liées et les constantes de vitesse de dissociation globalement diminuent après choc thermique (Tableau 6). Les constantes de diffusion passent par exemple en mFCS, de 11 à 7  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  après choc thermique pour le mutant HSF1-K80Q et de 18 à 8  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  pour le mutant HSF1- $\Delta$ DBD. En FRAP, les constantes de diffusion passent de 2,8 à 0,6  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  après choc thermique pour le mutant HSF1-K80Q et de 3,2 à 0,9  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  pour le mutant HSF1- $\Delta$ DBD. Avant choc thermique, Le mutant HSF1- $\Delta$ DBD est plus rapide que le mutant HSF1-K80Q, ce dernier ayant une dynamique similaire à celle de la protéine sauvage (Figure 34-A).

La similitude entre les dynamiques des mutants de liaison à l'ADN et celle de la protéine sauvage pourrait être expliquée par une possible hétérotrimérisation des mutants avec la protéine endogène. L'effet d'une possible hétérotrimérisation a été étudié en traitant les cellules avec un siARN dirigé contre la protéine HSF1 et en transfectant un plasmide exprimant une forme résistante au siARN de la protéine d'intérêt (sauvage ou mutée pour le domaine de liaison à l'ADN). Nous avons comparé la dynamique, en mFCS et en FRAP, de la protéine HSF1 sauvage et du mutant HSF1-K80Q en absence de la protéine endogène (Tableau 6 et Figure 35-A et B). La dynamique du mutant HSF1- $\Delta$ DBD en absence de la protéine endogène a aussi été étudiée en FCS simple point (Figure 35-C). Dans tous les cas, comme en présence de la protéine endogène, un ralentissement significatif de la dynamique est observé pour la protéine sauvage et pour les deux mutants du domaine DBD. Nous remarquons, en mFCS, qu'en absence de la protéine endogène, l'augmentation de la fraction de molécules liées après choc thermique est plus importante, avec environ 46% de protéines liées pour les protéines HSF1 et HSF1-K80Q, qu'en présence de la protéine endogène (39% de protéines liées).

L'hétérotrimérisation des mutants avec la protéine endogène ne peut expliquer le changement de dynamique après choc thermique. Une autre hypothèse que nous avons testé est un possible effet de la position de la protéine eGFP sur la dynamique de la protéine HSF1 et qui pourrait être différent entre les mutants et la protéine sauvage. L'effet de la position de la protéine eGFP sur la dynamique de la protéine HSF1 sauvage ou du mutant HSF1-K80Q a été analysé en fusionnant la protéine eGFP en position N-terminale d'HSF1 (eGFP-HSF1). La présence de la protéine eGFP à proximité du domaine de liaison à l'ADN n'empêche pas la liaison de la protéine eGFP-HSF1 sur les corps nucléaires de stress. Le mutant HSF1-K80Q fusionné en N-terminal à la protéine eGFP est nucléaire et ne forme pas de nSBs après choc thermique.



**Figure 35** Dynamique de la protéine HSF1 et des mutants de liaison à l'ADN, en l'absence de la protéine endogène

Les cellules HeLa sont traitées avec un siARN dirigé contre HSF1, puis transfectée avec un plasmide exprimant une forme résistante d'HSF1 au siARN. Les cellules sont étudiées avant (bleu) et après (rouge) choc thermique. A. Courbe d'autocorrélation en mFCS (gauche) et de récupération en FRAP (droite) de la protéine HSF1 sauvage en absence de la protéine endogène. B. Courbe d'autocorrélation en mFCS (gauche) et de récupération en FRAP (droite) du mutant HSF1-K80Q en absence de la protéine endogène. C. Courbe d'autocorrélation obtenue en FCS simple point du mutant HSF1- $\Delta$ DBD en absence de la protéine endogène.

D'un point de vue dynamique, les protéines eGFP-HSF1 et eGFP-HSF1-K80Q sont aussi affectées par le choc thermique, à un degré similaire à celui observé pour les protéines HSF1-eGFP et HSF1-K80Q-eGFP.

Une troisième hypothèse pour expliquer les changements de dynamiques observées pour les mutants de liaison à l'ADN, est la possible interaction d'un partenaire d'HSF1 avec l'ADN. Le domaine de transactivation pouvant lier de multiples protéines impliquées dans le processus de transcription, nous avons analysé la dynamique de la protéine HSF1- $\Delta$ TAD. Le mutant HSF1- $\Delta$ TAD a été analysé uniquement en FRAP, dans le nucléoplasme et sur les corps nucléaires de stress. La dynamique de ce mutant est aussi affectée par la température, avec un ralentissement après choc thermique (Figure 33-E et Tableau 6). Le  $t_{1/2}$  de FRAP augmente de 0,14 à 2,96 s respectivement à 37°C et 43°C dans le nucléoplasme et atteint 93.5 s dans les corps nucléaires de stress. Si l'on compare les paramètres dynamique de ce mutant (Tableau 6), nous observons que ce mutant semble plus lent que la protéine sauvage à 37°C avec une constante de diffusion  $D= 0.9 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour la protéine HSF1- $\Delta$ TAD et  $D= 1.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour la protéine sauvage (Figure 34 et Tableau 6). Les paramètres dynamiques d'HSF1- $\Delta$ TAD dans les corps nucléaires de stress, sont assez similaires à ceux observés pour la protéine sauvage dans les nSBs.

## Chapitre III Discussion

### 1. Complémentarité des méthodes de dynamique : FCS et FRAP

Les techniques de spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) et de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) sont des techniques complémentaires pour l'analyse de la dynamique des protéines en cellules vivantes. Ces techniques sont complémentaires du point de vue de leur échelle temporelle. En effet la FCS permet d'atteindre des informations sur la dynamique à des temps inférieurs à la seconde et de mesurer des temps d'association ( $t_{on}$ ) ou de dissociation ( $t_{off}$ ) de l'ordre de la milliseconde. Au contraire le FRAP nous permet d'analyser la dynamique à des temps longs, supérieurs à la centaine de milliseconde et de mesurer des  $t_{on}$  ou des  $t_{off}$  de l'ordre de la centaine de millisecondes jusqu'à plusieurs secondes ( $t_{off}$  entre 200 - 250 s pour HSF1 après choc thermique, sur les nSBs). Ainsi la FCS est adaptée à la mesure d'association non spécifique et le FRAP à des associations non spécifiques et spécifiques. Par les deux techniques, nous obtenons des constantes de diffusion qui diffèrent d'un peu moins d'un ordre de grandeur. La différence observée correspond à la différence d'échelle temporelle. La constante de diffusion observée en FRAP pourrait être une constante de diffusion effective qui tiendrait compte des associations non spécifiques de l'ordre de la dizaine de milliseconde que l'on détecte en FCS mais qui ne sont pas mesurables en FRAP.

Au-delà de la complémentarité temporelle, les deux techniques apportent des informations spécifiques. Ainsi la FCS permet d'estimer la concentration des molécules fluorescentes à l'intérieur des cellules (de l'ordre du micromolaire pour HSF1-eGFP en cellules HeLa et U87). Le FRAP quant à lui nous permet d'analyser la dynamique d'HSF1 sur son site d'activité spécifique : les corps nucléaires de stress. En effet la FCS étant une technique d'analyse de fluctuations de fluorescence, elle est optimisée pour un nombre faible de molécules traversant le volume confocal. Le matériel de détection n'autorise pas non plus un taux de comptage fort. Ainsi la FCS n'est pas adaptée pour la mesure de la dynamique d'HSF1 sur les corps nucléaires de stress, où la concentration trop importante en molécules entrainerait un photoblanchiment conséquent ou une détérioration du matériel.

D'un point de vue expérimental, la FCS est une technique non invasive, qui ne nécessite aucune perturbation du système, alors que le FRAP nécessite une perturbation induite par le photoblanchiment. Le photoblanchiment est provoqué par l'exposition des cellules à une impulsion laser de forte intensité, induisant l'extinction des protéines fluorescentes. Les effets du photoblanchiment ne perturbent pas trop la physiologie des cellules (Stasevich et al., 2010b). Cependant, la prise en compte du photoblanchiment dans la modélisation des courbes de

recouvrement après photoblanchiment est délicate d'autant plus que la durée du photoblanchiment n'est pas nulle. Cette question ne se pose pas en FCS. D'un point de vue matériel, le FRAP est une technique conventionnelle réalisable sur n'importe quel microscope confocal à balayage laser. La FCS nécessite un équipement particulier, une calibration et une attention particulière. Des solutions commerciales sont disponibles, cependant ces dernières sont restreintes à une analyse en simple point. Le système mFCS que nous avons développé et sur lequel nous avons réalisé nos acquisitions permet de réaliser des mesures en plusieurs points simultanément.

La technique « raster image correlation spectroscopy » (RICS), est une technique récente qui pourrait permettre d'obtenir des données dynamiques dans une échelle de temps élargie (analyse des points sur une ligne pour les temps court, entre ligne pour les temps moyens et entre images pour les temps plus lents). Cependant elle demande un balayage laser précis, homogène et reproductible sur l'ensemble de la surface d'analyse et une résolution spatiale et temporelle adaptée à la mobilité de la protéine d'intérêt. Elle n'en est qu'à ses débuts mais c'est une technique qui pourrait compléter les données de FCS dans l'avenir.

## **2. Dynamique d'HSF1 dans les cellules HeLa et U87**

La dynamique de la protéine HSF1 sauvage est fortement ralentie par le choc thermique. Que ce soit en cellules HeLa ou en cellules U87, l'élévation de la température a un effet significatif sur le temps de diffusion ( $t_D$ ), la constante de diffusion ( $D$ ), la constante de vitesse de dissociation ( $k_{off}$ ), et la fraction de molécules liée ( $F_{eq}$ ). Les données indiquent que la diffusion d'HSF1 est ralentie après choc thermique. Ce ralentissement peut s'expliquer par la formation de complexes moléculaires, confirmée par les données obtenues en fractionnement sur gradient de glycérol qui montrent un changement important de la taille des complexes moléculaire d'HSF1 après choc thermique. Avant choc thermique, la dynamique d'HSF1 et les gradients s'accordent sur un complexe d'une taille voisine de 200-500 kDa. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui s'accordent sur une interaction d'HSF1 avec des protéines d'un complexe multi-chaperonnes composé principalement de la protéine HSP90 et de petites HSPs (Voellmy and Boellmann, 2007), mais aussi de la protéine HSP70 et de sa co-chaperonne HSP40 (Shi et al., 1998). Après choc thermique, HSF1 est capable d'interagir avec une multitude de protéines, notamment des chaperonnes, des kinases, des protéines impliquées dans la machinerie de transcription, ... (Yuan and Gurley, 2000; Guo et al., 2001; Boellmann et al., 2004). Toutes ces interactions pourrait conduire à la formation de complexes de tailles et de compositions variées, comme l'indique les données de la littérature (taille maximale de 700-800kDa) et nos données de fractionnement sur

gradient de glycérol après ultracentrifugation (>669 kDa) ainsi que nos données de dynamique (1400-3700 kDa).

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer le changement de dynamique de la protéine serait l'encombrement et la forte hétérogénéité du milieu à l'intérieur du noyau. Ainsi il a été démontré que la diffusion de la protéine eGFP est plus lente dans les régions denses d'hétérochromatine que dans les régions acétylées de l'euchromatine (Bancaud et al., 2009). Comme le choc thermique induit une déacétylation globale des histones (Fritah et al., 2009), la mobilité de la protéine eGFP devrait être ralentie par le choc thermique. En solution la constante de diffusion augmente avec la température, principalement à cause de la diminution de la viscosité. Etant donné que nous n'observons pas de changement significatif de la diffusion de la protéine eGFP après choc thermique, on peut supposer que les effets opposés de la déacétylation de la chromatine et des changements de viscosité se compensent l'un l'autre. Les modifications de dynamique d'HSF1 ne peuvent pas être attribuées aux changements de modifications de la texture chromatinienne après choc thermique.

En mFCS, les courbes d'autocorrélation d'HSF1 ne peuvent pas être ajustées avec un modèle à un composant diffusant librement après choc thermique. L'ajustement est bien meilleur avec un modèle à deux composants diffusant librement. Cependant la constante de diffusion de la composante lente correspondrait à un complexe d'une masse moléculaire irréaliste ( $D$  compris entre 0,3 et 0,5  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , correspondant à un complexe moléculaire de plusieurs milliers de mégadalton). Nous avons donc choisi, pour ajuster nos données, un modèle de diffusion et d'interaction qui correspond mieux à la fonction biologique d'HSF1 dans la cellule et aux résultats des expériences d'extraction de protéines aux sels sur cellules vivantes. Avant choc thermique, en mFCS les courbes s'ajustent avec un modèle de diffusion et interaction, alors qu'en FRAP, les courbes peuvent s'ajuster avec un modèle de diffusion. Il est possible que la constante de diffusion observée dans ce cas soit une constante de diffusion effective prenant en compte les interactions aspécifiques observées en mFCS.

Les données de mFCS et de FRAP rendent compte de l'augmentation des interactions avec l'ADN après choc thermique. Ces données sont en accord avec celles obtenues en RT-QPCR et en extraction de protéines sur cellules vivantes, où l'on observe dans les deux cas, une augmentation des liaisons de la protéine à l'ADN, qu'elles soient spécifiques ou globales. La combinaison des deux techniques de FRAP et mFCS, nous permet de mettre en évidence l'existence de plusieurs types de sites de liaison. Ainsi en mFCS on observe les sites de liaison transitoire ou aspécifique, correspondant à une constante de vitesse de dissociation  $k_{\text{off}}$  entre 25 et 30  $\text{s}^{-1}$ . Les expériences de

FRAP mettent en évidence l'existence de sites d'interactions plus spécifiques avec une constante de vitesse de dissociation  $k_{off}$  compris entre 0,019 et 0,004  $s^{-1}$ , dans respectivement le nucléoplasme et les corps nucléaires de stress. Cependant il faut prendre en compte le fait que par ces deux techniques, nous observons un ensemble moyen de sites, ce qui est reflété par l'hétérogénéité que nous observons après choc thermique. Cette hétérogénéité s'explique par la présence d'un nombre limité de sites de liaison d'HSF1 à l'intérieur du noyau (Trinklein et al., 2004; Pandey et al., 2011).

En comparant les paramètres dynamiques obtenus pour les deux lignées cellulaires HeLa et U87, on observe que la protéine hHSF1-eGFP est plus lente dans les cellules HeLa que dans les cellules U87. Ces résultats sont en accord avec des travaux publiés sur le récepteur au glucocorticoïde (GR), démontrant que les dynamiques de GR et de la protéine YFP sont plus lentes dans les cellules HeLa que dans d'autres types cellulaires (COS-1 et HEK293, (Schaaf and Cidlowski, 2003)). Nous observons le même phénomène ici avec les cellules HeLa et U87. Une explication à cette dynamique plus lente dans les cellules HeLa pourrait provenir de la ploïdie très particulière de ces cellules avec un nombre modal de chromosome de 82. Les autres lignées cellulaires ont une ploïdie moins importante avec un nombre modal de chromosome de 44, 60 et 64 pour respectivement les cellules U87, COS-1 et HEK293. Ainsi l'encombrement dans l'espace du noyau et le nombre de sites de liaison spécifiques et aspécifiques pourraient être moins importants dans ces cellules que dans les cellules HeLa, favorisant une diffusion plus rapide dans ces lignées (U87, COS-1 et HEK293).

Dans les corps nucléaires de stress, la dynamique d'HSF1 est fortement ralentie, la récupération complète en FRAP est obtenue en environ six minutes avec un  $t_{1/2}$  de récupération de 65,4 s, alors que dans le nucléoplasme la récupération complète est obtenue en deux minutes avec un  $t_{1/2}$  de 2,58 s. La constante de vitesse de dissociation sur les corps nucléaires de stress est de  $k_{off} = 0.004 s^{-1}$ , correspondant à un temps de résidence d'environ 250 secondes. L'allongement du temps de résidence d'HSF1 après activation traduit sa capacité de liaison et de transactivation des gènes cibles. La fraction liée augmente considérablement dans les corps nucléaires de stress, avec 30% de molécules liées contre 26% dans le nucléoplasme, ceci est en accord avec la plus grande concentration de sites de liaison sur les corps nucléaires de stress.

Nos données confirment les premiers résultats sur la dynamique d'HSF1 dans les corps nucléaires de stress publiés précédemment par notre équipe sur des cellules HeLa (Jolly et al., 1999). Par contre les données obtenues sur la drosophile indiquent une dynamique d'HSF très lente, avec une récupération incomplète même après six minutes (Yao et al., 2006). De plus ces travaux sur la

drosophile indiquent qu'en FCS, la dynamique de la protéine HSF-eGFP dans le nucléoplasme est peu affectée par le choc thermique. De façon surprenante la dynamique lente d'HSF est retrouvée à la fois sur les sites spécifiques de liaison (gènes hsp70, locus 87A) mais aussi sur d'autres sites où HSF est moins actif voir inactif transcriptionnellement. Ces données suggèrent une liaison stable d'HSF sur l'ADN après choc thermique. Nos données sont plus en accord avec une dynamique rapide d'HSF1 avec une augmentation des interactions et du temps de résidence après choc thermique, mais sans que la protéine reste pour autant fixée sur le promoteur du gène cible. Deux éléments sont à prendre en considération dans la comparaison de ces deux analyses : le protocole expérimental et le modèle d'étude. Concernant le protocole expérimental, notre protocole nous permet de réduire considérablement le temps de photoblanchiment, 80 millisecondes contre cinq secondes. De plus nous réalisons une acquisition d'une série d'images en z qui permet de suivre le mouvement des corps nucléaires de stress lors de la récupération (que ce soit en x, y et en z), alors que sur la drosophile, les auteurs considèrent le mouvement en z comme négligeable. Le modèle d'étude est aussi un élément important à considérer. Chez la drosophile, le site majeur de liaison d'HSF en réponse au choc thermique est le locus 87A-C qui correspond aux gènes d'hsp70, d'autres petits sites de liaison apparaissent mais dont l'intensité n'égale pas celle du site des gènes hsp70 (Yao et al., 2006). En cellules humaines, les sites majeurs de liaison d'HSF1 sont au moins au nombre de deux (pour des cellules diploïdes). Nous avons utilisé cet avantage pour pouvoir normaliser nos courbes. Ainsi, lors de la normalisation des courbes de FRAP, le photoblanchiment induit et le photoblanchiment continu sont corrigés grâce à un deuxième corps nucléaire de stress situé dans le noyau de la même cellule. De façon intéressante, nous avons remarqué en changeant le mode de normalisation, que le photoblanchiment induit une perte de fluorescence plus importante dans le nucléoplasme qui remonte pour atteindre un plateau en quelques dizaines de secondes, alors que la fluorescence du deuxième corps nucléaires de stress diminue dès l'induction du photoblanchiment pour atteindre progressivement le plateau vers 300 secondes (Figure 32). Le retour de fluorescence sur le corps nucléaires de stress doit puiser dans un premier temps sur la fraction de molécules libres présentes dans le nucléoplasme puis via un échange avec les autres corps nucléaires de stress.

### **3. Rôle des différents domaines dans la dynamique d'HSF1**

Le domaine de trimérisation joue un rôle majeur dans le changement de dynamique observé après choc thermique. En effet en absence du domaine de trimérisation, la dynamique d'HSF1- $\Delta$ TRIM n'est pas ou peu modifiée par le changement de température. La protéine HSF1- $\Delta$ TRIM diffuse même un peu plus vite que la protéine sauvage à 37°C, ce qui pourrait s'expliquer par une modification du complexe moléculaire d'HSF1 à 37°C, indiquée aussi par les gradients de glycérol.

Malgré l'absence du domaine de trimérisation, le choc thermique induit des changements au niveau des complexes moléculaires, ainsi qu'au niveau de la phosphorylation du mutant. Lors du choc thermique, l'absence du domaine de trimérisation entraîne une incapacité de la protéine à se trimériser. Cependant, l'augmentation de la taille des complexes protéiques observée après choc thermique, indiquerait que la protéine serait capable de se déplier et donc d'interagir avec certains partenaires d'HSF1. Cette augmentation de la taille des complexes n'est pas suffisante pour induire un changement de dynamique observable en mFCS. En mFCS, l'élévation de la température entraîne une légère augmentation du temps de résidence d'HSF1- $\Delta$ TRIM sur l'ADN, conformément aux données d'extraction de protéines sur cellules vivantes. Avant choc thermique le mutant est totalement extrait en absence de sel, après choc thermique, une fraction de la protéine mutée est faiblement associée à la chromatine et se décroche à 200 mM de sel. Les changements de complexes observés après choc thermique pourraient expliquer l'augmentation des interactions à la chromatine notamment par des interactions indirecte via d'autres partenaires protéiques.

Le mutant de liaison à l'ADN HSF1-K80Q présente une dynamique similaire à la protéine sauvage que ce soit en condition normale ou après choc thermique. D'un point de vue fonctionnel, le mutant HSF1-K80Q est nucléaire tout comme la protéine sauvage, mais le mutant n'est pas capable de former des corps nucléaires de stress après choc thermique. L'absence de corps nucléaires de stress corrèle avec l'absence de synthèse de transcrits sat III. Le mutant est aussi incapable d'induire la transcription de l'ARNm hsp70. Tout ceci est en accord avec l'incapacité de ce mutant à se lier de façon spécifique à l'ADN (Westerheide et al., 2009). De façon surprenante, Le mutant HSF1-K80Q est capable d'interagir avec la chromatine, comme le montre les extractions de protéines sur cellules vivantes. Comme la protéine sauvage, le mutant HSF1-K80Q est capable d'interagir avec la chromatine mais n'est pas capable de se lier sur les cibles spécifiques d'HSF1. Le mutant HSF1-K80Q est aussi capable de former des complexes moléculaires de taille similaire à ceux observés pour la protéine sauvage. Tous ces résultats nous indiquent que le domaine de liaison à l'ADN, ou au moins la lysine responsable de liaison au HSE, n'as pas de rôle majeur dans la dynamique d'HSF1 après choc thermique. La contribution des liaisons spécifiques à la dynamique observée pourrait être négligeable par rapport à d'autres facteurs (changement de complexes, interactions avec la chromatine à la recherche de sites spécifiques).

Le mutant HSF1-K80Q est capable d'interagir avec l'ADN, au moins de façon non spécifique ou peut être de façon indirecte. Pour voir si les interactions proviennent de la présence du domaine de liaison à l'ADN, un autre mutant du domaine de liaison à l'ADN a été étudié. Ce mutant

présente une délétion totale du domaine de liaison à l'ADN. Comme pour le mutant HSF1-K80Q, la dynamique du mutant HSF1- $\Delta$ DBD est significativement affectée par le choc thermique. Cependant la dynamique avant choc thermique est plus rapide que celle observée pour la protéine sauvage et le mutant HSF1-K80Q, de même la taille des complexes moléculaire est un peu plus réduite comme l'indique les gradients de glycérol. La taille des complexes formés par le mutant HSF- $\Delta$ DBD est significativement affectée par le choc thermique, mais la taille maximale des complexes semble moins importante que celle observée pour la protéine sauvage. Il faut cependant prendre en compte le fait que le niveau d'expression de ce mutant est très faible comparé à la protéine endogène, il est donc difficile lors de la révélation des Western Blot d'exposer suffisamment la membrane pour observer correctement le mutant sans que le signal de la protéine endogène ne viennent interférer sur le signal du mutant. Ainsi la taille des complexes du mutant HSF1- $\Delta$ DBD est peut être sous-estimée par rapport aux autres protéines. Le mutant HSF1- $\Delta$ DBD est capable, comme la protéine sauvage et le mutant HSF1-K80Q de s'associer à la chromatine après choc thermique. En effet une fraction de la protéine mutée reste associée à la chromatine même à de forte concentration en sels (2 M NaCl). Cependant ce mutant n'est pas capable d'induire la transcription des ARNm hsp70 et des ARN sat III. Comme pour le mutant HSF1-K80Q, ces résultats mettent en évidence l'existence d'interactions avec la chromatine, qui ne sont pas liées au domaine de liaison à l'ADN, expliquant le changement de dynamique observé après choc thermique pour ces deux mutants.

Le fait que le ralentissement de la dynamique des mutants de liaison à l'ADN après choc thermique soit indépendant de la présence ou non de la protéine endogène, va dans le sens d'une absence de rôle du domaine de liaison à l'ADN. En effet les deux mutants présentent un ralentissement sensiblement identique que les cellules soient traitées ou non avec un siARN contre la protéine endogène. Nous ne pouvons pas totalement exclure une possible interaction des mutants avec la protéine HSF2, en absence la protéine HSF1 endogène. Cependant, le fait que nous n'observons pas de corps nucléaires de stress après choc thermique, rend compte de l'absence d'interaction entre les mutants et la protéine HSF1 ou HSF2. Ceci confirme que le domaine DBD ne joue pas un rôle majeur dans la dynamique d'HSF1 avant ou après choc thermique.

Des résultats similaires ont été obtenus pour la protéine p53 (Hinow et al., 2006). Les courbes de FRAP pour la protéine p53, s'ajustent avec un modèle de diffusion et d'interaction, en accord avec le modèle biologique de la protéine. Pour cette protéine, la dynamique de deux mutants du domaine de liaison a été étudiée : l'un entraînant une perturbation majeure du domaine de liaison à l'ADN (p53 R175H), l'autre entraînant une perte de liaison sans perturbation du domaine

(p53 R273H). La dynamique de ces deux mutants est identique à celle obtenue pour la protéine sauvage. La liaison spécifique à l'ADN ne contribue pas significativement à la dynamique de la protéine p53. Ainsi la protéine p53 serait capable de se lier à l'ADN de façon séquence indépendante. Nous observons à peu près les mêmes résultats pour les deux mutants HSF1- $\Delta$ DBD et HSF1-K80Q, qui sont affectés totalement et ponctuellement au niveau du domaine de liaison à l'ADN. Comme pour la protéine p53 il se pourrait que le ralentissement de la dynamique d'HSF1 implique d'autres domaines qui seraient capables directement ou indirectement d'interagir avec la chromatine.

L'un des domaines qui pourrait jouer un rôle important dans le changement de dynamique des mutants de liaison à l'ADN est le domaine de transactivation (TAD). Ce domaine semble jouer le rôle d'une plateforme d'interaction pour un grand nombre de régulateurs de la transcription (Yuan and Gurley, 2000; Choi et al., 2000; Kim et al., 2004; Sullivan et al., 2001). Le domaine TAD via ses interactions avec d'autres partenaires protéiques pourrait permettre à HSF1 de s'associer à l'ADN de façon indirecte. Cependant les analyses de la dynamique nous indiquent que ce mutant est ralenti après choc thermique, à un degré similaire à celui de la protéine sauvage. Bien que le mutant HSF1- $\Delta$ TAD soit capable de former des corps nucléaires de stress après choc thermique, il n'est pas capable d'induire la transcription des ARN sat III et des ARNm hps70. Le mutant HSF1- $\Delta$ TAD est donc capable de lier les séquences régulatrices mais ne peut pas induire la transcription, ce qui confirme son rôle de dominant négatif (Voellmy, 2005).

**Tableau 7 Points isoélectriques des différentes protéines et domaines d'HSF1**

	Pi	Charge si pH7	Résidus +	Résidus -	Total résidus	Pi + eGFP	Pi domaine	Charge domaine si pH7
HSF1	5,02	-	46	68	529	5,22		
$\Delta$ DBD	4,72	-	33	56	421	5,01	8,03	+
$\Delta$ LD	5	-	43	65	515	5,21	5,79	-
$\Delta$ TRIM	4,59	-	32	62	453	4,89	10,18	+
$\Delta$ RD	5,16	-	34	47	357	5,39	4,79	-
$\Delta$ HR-C	5,11	-	46	64	503	5,31	4,13	-
$\Delta$ TAD	6,14	-	42	47	401	5,95	3,84	-

Les paramètres physicochimiques des différents mutants et domaines d'HSF1, sont obtenus à partir du logiciel en ligne ProtParam du portail Expasy (<http://web.expasy.org/protparam/>). Si le pH est inférieur au Pi, la charge est positive car la protéine a tendance à conserver ses protons. A l'inverse si le pH est supérieur au Pi, la charge est négative, car la protéine a tendance à céder ses protons. LD = Domaine de liaison situé entre le domaine DBD et le domaine de trimérisation. RD = domaine de régulation. HR-C = domaine de répression de la trimérisation.

De façon surprenante le mutant HSF1- $\Delta$ TAD est plus lent avant choc thermique que la protéine sauvage. Pour expliquer les dynamiques observées et l'absence de rôle du domaine de liaison à l'ADN, nous avons regardé un possible effet de charge due aux différentes délétions. En effet la protéine pourrait via des interactions électrostatiques de faible intensité (van der Waals) interagir avec l'ADN chargé négativement. Pour cela nous avons calculé bio-informatiquement le point isoélectrique (Pi) de chaque protéine et de chaque domaine d'intérêt (Tableau 7). Le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de trimérisation sont des domaines basiques avec des PI respectifs de 8,03 et 10,18. Le domaine de transactivation est quant à lui un domaine acide avec un PI de 3,84. La protéine HSF1 fusionnée à la protéine eGFP a un PI de 5,22, ce qui implique qu'à pH physiologique la charge globale de la protéine est négative. La délétion des domaines de liaison à l'ADN ou de trimérisation entraîne une baisse du PI due à la délétion d'un domaine basique. Les PI deviennent respectivement de 5,01 et 4,89 pour les mutants HSF1- $\Delta$ DBD et HSF1- $\Delta$ TRIM fusionnés à la protéine eGFP. La charge globale de la protéine serait encore plus négative. Le PI du mutant HSF1- $\Delta$ TAD fusionné à la protéine eGFP est quant à lui de 5,95, réduisant un peu la charge globale négative de la protéine. Aucune des délétions n'entraîne de changement de charge globale, ce qui aurait pu avoir un effet sur la dynamique d'HSF1. Cependant ce calcul ne prend pas en compte les charges des éventuelles modifications post-traductionnelles, ni les charges globales des partenaires d'HSF1.

## Chapitre IV Conclusion et Perspectives

Le facteur de transcription HSF1 présente une dynamique rapide avant choc thermique qui est ralentie après choc thermique. Deux phénomènes contribuent à ce ralentissement : i) la formation de complexes de haut poids moléculaire, ii) une augmentation des interactions avec l'ADN. La technique de mFCS donne des valeurs de constante de diffusion, à partir desquelles nous pouvons extrapoler la taille des complexes moléculaires d'HSF1, en accord avec les données biochimiques, avant et après choc thermique. La technique de mFCS met en évidence des interactions aspécifiques d'HSF1 avec l'ADN, alors que la FRAP met en évidence des interactions plus spécifiques, avec des temps de résidence après choc thermique, d'environ 50 secondes dans le nucléoplasme et 250 secondes sur les corps nucléaires de stress.

Le domaine de trimérisation est un domaine indispensable pour l'activité d'HSF1 mais aussi pour sa dynamique. Contrairement à la protéine sauvage, la dynamique du mutant HSF1- $\Delta$ TRIM est peu affectée par le stress thermique. Malgré l'incapacité du mutant HSF1- $\Delta$ TRIM à se trimériser, le choc thermique entraîne la liaison de certaines protéines sur le mutant, ainsi que l'apparition de certaines modifications post-traductionnelles. Le domaine de liaison à l'ADN a peu d'impact sur la dynamique d'HSF1. En effet, même si les deux mutants de liaison à l'ADN (HSF1-K80Q et HSF1- $\Delta$ DBD) ne sont pas capables de former des corps nucléaires de stress, ni même d'induire la transcription des cibles spécifiques d'HSF1, ils présentent un changement de dynamique après choc thermique similaire à celui observé pour la protéine sauvage. Les données biochimiques indiquent que ces mutants sont capables de former des complexes de tailles similaires à ceux observés pour la protéine sauvage, et sont aussi capables d'interagir avec la chromatine. Ainsi, Le changement de dynamique observé ne serait pas dû aux interactions spécifiques du domaine DBD avec l'ADN, mais pourrait être dû : i) à des interactions avec la chromatine, par exemple pour rechercher des sites de liaison, ii) à des interactions indirectes via des protéines capables de se lier à HSF1. Le domaine de transactivation, représente une plateforme de liaison pour de multiples facteurs impliqués dans la transcription. Il pourrait être responsable des interactions indirectes avec la chromatine. Cependant la dynamique du mutant HSF1- $\Delta$ TAD n'est pas augmentée par rapport à la protéine sauvage, le domaine TAD ne serait donc pas responsable du ralentissement d'HSF1.

Etant donné que le domaine TAD et le domaine DBD ne sont pas responsables du changement de dynamique après choc thermique, il se pourrait que d'autres domaines soient impliqués directement ou indirectement. Un de ces domaines pourrait être le domaine de régulation d'HSF1, sur lequel se trouvent de multiples sites de modifications post-traductionnelles, induisant

l'interaction avec d'autres protéines. Une autre possibilité serait que les domaines se compensent entre eux, il serait donc intéressant de combiner plusieurs mutations, notamment celle du domaine de liaison à l'ADN (K80Q) avec la délétion du domaine TAD.

Pour mieux analyser et comprendre la dynamique d'HSF1, il serait intéressant de réaliser des expériences de suivi de molécule unique (SMT). Par une technique de super-résolution telle que le PALM (microscopie de localisation par photoactivation), il est possible d'illuminer uniquement quelques protéines, et de suivre leurs traces au cours du temps. La forme et la longueur des déplacements rendent compte des éventuelles contraintes dans la mobilité des protéines. Ces informations complèteraient les données de mFCS et de FRAP. Ces études pourraient nous permettre d'analyser le comportement d'HSF1 à proximité et sur les corps nucléaires de stress. En comparant les tracés obtenus pour les mutants à ceux de la protéine sauvage, il devrait être possible de mettre en évidence des changements dans la mobilité des mutants au voisinage des corps nucléaires de stress. Pour cela une collaboration a débuté avec Virgile Adam (PIXEL, IBS, Grenoble) et des travaux préliminaires (cf. Annexe 2.2) ont conduit à la construction de deux plasmides encodant la protéine HSF1 fusionnée à deux protéines fluorescentes photo-transformables : Dendra2 et NijiFP. Ces constructions vont dans un premier temps être utilisées pour essayer d'obtenir des images en super-résolution, en PALM, des corps nucléaires de stress, puis pour réaliser des expériences de SMT.

Nous avons utilisé la technique mFCS, pour analyser la dynamique d'HSF1 en plusieurs points dans le nucléoplasme, en évitant les corps nucléaires de stress et les nucléoles. Cependant, la technique mFCS a d'autres potentiels, notamment celui d'étudier des flux. En positionnant les spots à différentes distances des nSBs ou entre deux nSBs, nous espérons pouvoir mesurer des flux et étudier les variations de concentration dans les différentes positions et lors des différentes phases de la réponse au choc thermique.

Les résultats de FRAP et de mFCS mettent en évidence différents phénomènes qu'il pourrait être utile d'analyser par modélisation mathématique. En FRAP nous avons observé, après photoblanchiment d'un corps nucléaire de stress, une différence de décroissance de la fluorescence des zones de références : nucléoplasme ou second nSBs (Figure 32). Sur les nSBs, la fluorescence décroît progressivement pour atteindre un plateau à environ 300 secondes, alors que dans le nucléoplasme, la fluorescence décroît brutalement juste après le photoblanchiment et augmente pour atteindre le plateau en une dizaine de secondes. Ainsi en modélisant ces comportements différents, il serait peut être possible de mettre en évidence des flux particuliers

au sein du noyau : un premier, au temps court, puisant directement dans le nucléoplasme, un second à des temps plus longs, par échange entre plusieurs nSBs.

En mFCS, il serait possible d'analyser les dynamiques lentes d'HSF1. En effet nous avons observé des variations de l'intensité de fluorescence après chaque nouvelle série d'acquisition (Figure 30), qui sont dues à des protéines peu mobiles qui sont rapidement photoblanchies lors de la nouvelle série d'acquisitions. En modélisant ces variations, il serait peut être possible d'accéder aux informations de dynamiques lentes d'HSF1 en mFCS.

La trimérisation d'HSF1 est une étape cruciale de l'activation d'HSF1 et peu d'informations sont disponibles sur la dynamique et le déroulement temporel et spatial de cette étape en cellules vivantes. La FCS pourrait permettre de suivre la trimérisation d'HSF1 via l'analyse de la brillance des molécules. Nous avons cependant observé que la brillance de la protéine eGFP est affectée par le choc thermique, ne permettant pas d'exploiter les variations de nombre de molécules pour HSF1 en mFCS. Une variante de la technique de FCS, la FCCS, utilise des protéines couplées à deux couleurs différentes pour observer des évènements d'oligomérisation. Cette technique analyse la co-diffusion des molécules, rendant possible l'étude de la trimérisation d'HSF1 en cellules vivantes. Par des expériences préliminaires en FCCS en utilisant un couple de protéine HSF1-IFP 1.4 et eGFP-HSF1, nous avons mis en évidence la trimérisation d'HSF1 après choc thermique (cf. Annexe 2.1). Ces études ont été réalisées en présence de la protéine endogène, ainsi pour améliorer le signal de corrélation croisée, il serait intéressant de réaliser des expériences de FCCS en absence de la protéine endogène. D'autres techniques peuvent être utilisées pour analyser la trimérisation d'HSF1, c'est le cas du suivi d'homoFRET par anisotropie de fluorescence (Chan et al., 2011). Après choc thermique, l'homoFRET entre protéines HSF1-eGFP entraînerait une perte de polarisation de fluorescence qui traduirait l'oligomérisation d'HSF1.

## Chapitre V Matériels et méthodes

### Culture cellulaire et préparation des échantillons

#### Culture cellulaire :

Les lignées cellulaires HeLa sont cultivées en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 4 mM de glutamine (2%), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (PS, 1%). Les lignées cellulaires H1299 sont cultivées en RPMI1640, complété de 10 % SVF, 4 mM glutamine, 100 U/ml et 100 µg/ml PS. Les lignées cellulaires U87 sont cultivées en milieu DMEM, 4 mM glutamine, 100 U/ml et 100 µg/ml PS et acides aminés non essentiels 1 x. Pour les lignées cellulaires stables exprimant une construction GFP, le milieu de culture est complété avec de la généticine à 0,3 mg/ml pour les HeLa et U87 ou 0,2 mg/ml pour les H1299.

#### Observation au microscope :

Deux jours avant observation, les cellules sontensemencées à une concentration de  $5 \cdot 10^5$  cellules pour une Lab-Tek 1 puits (Nunc), ou  $2.5 \cdot 10^5$  cellules pour une coupelle Delta T (Biotechs). Avant observation au microscope les cellules sont rincées avec un milieu DMEM complet, dépourvu de rouge de phénol.

#### Transfections :

Pour l'expression transitoire de protéines fluorescentes, un jour après ensemencement, les cellules sont transfectées en utilisant la lipofectamine 2000. En Lab-Tek 1 puits ou en coupelle Delta T, les cellules sont transfectées avec 1µg d'ADN et 1µl de lipofectamine, incubées pendant 24 heures, puis rincées.

Pour éliminer l'expression de la protéine endogène HSF1, les cellules sont transfectées avec un siARN dirigé spécifiquement contre HSF1. La transfection est réalisée en deux cycles espacés de 24h, le premier est réalisé avec la lipofectamine RNAimax, en utilisant 5µl de lipofectamine et 75nM de siARN (pour une Lab-Tek 1 puits, ou une coupelle Delta T). Le deuxième cycle est réalisé en utilisant 5µl de lipofectamine 2000 et 25nM de siARN, ainsi que 1µg de plasmide en fonction des expériences considérées.

## **Plasmides**

### **peGFP-N3/C3-hHSF1 :**

Pour une fusion de la protéine eGFP en C-terminale d'HSF1, la séquence codante de hHSF1 est obtenue par PCR en utilisant les amorces 1 et 2 (Tableau 8). Le produit de PCR est ensuite digéré avec les enzymes EcoRI et BglII, puis inséré dans le plasmide peGFP-N3 entre les sites EcoRI et BamHI (BglII et BamHI étant compatibles).

Pour une fusion en position N-terminale d'HSF1. La séquence codante d'HSF1 est obtenue par PCR avec les amorces 3 et 4 (Tableau 8). Le produit de PCR est ensuite digéré par les enzymes HindIII et BglII, puis inséré dans le plasmide peGFP-C3 entre les sites HindIII et BamHI.

La séquence du siARN/shARN est GCUCAUUCAGUCCUGAUC (Ostling et al., 2007). Pour conférer à HSF1 la résistance au siARN ou shARN, deux mutations silencieuses sont introduites dans la séquence codante d'HSF1, en position 573 (Guanosine -> Adénosine) et 576 (Cytidine -> Thymidine). Pour cela une mutagénèse dirigée est réalisée à partir des plasmides codant pour HSF1 humain avec les amorces 5 et 6 (Tableau 8).

### **peGFP-N3-hHSF1-ΔTRIM :**

Les mutants nécessitant le retrait total d'un domaine sont obtenus par PCR chevauchante. La séquence codante d'HSF1 est obtenue par PCR avec un lot de quatre amorces. Dans un premier temps, les deux extrémités bordant le domaine de trimérisation sont amplifiées séparément en utilisant les couples d'amorces 1-7 et 8-2. Les amorces 7 et 8 possèdent chacune un bout de séquence complémentaire l'une de l'autre. Les deux fragments amplifiés sont ensuite incubés ensemble, les séquences complémentaires s'hybrident entre elles, formant une séquence délétée du domaine de trimérisation. Cette séquence est amplifiée avec les amorces 1 et 2, puis digérée par les enzymes EcoRI et BglII et insérée dans le plasmide peGFP-N3 entre les sites EcoRI et BamHI. La séquence cible du siARN se situant dans la séquence du domaine de trimérisation, cette construction est naturellement résistante au siARN.

### **peGFP-N3-hHSF1-ΔDBD :**

Comme pour le mutant hHSF1-ΔTRIM, le mutant hHSF1-ΔDBD est obtenu par PCR chevauchante en utilisant les couples d'amorces 1-9 et 10-2. La séquence finale est digérée par EcoRI et BglII puis insérée dans le plasmide peGFP-N3 entre les sites EcoRI et BamHI. La résistance au siARN est obtenue, par mutagénèse dirigée en utilisant les amorces 5 et 6.

#### *peGFP-N3/C3-hHSF1-K80Q:*

La mutation sur de la lysine 80 en glutamine, est obtenue par mutagenèse dirigée en changeant dans la séquence d'HSF1 sauvage, l'adénosine en position 238 en cytidine (AAA -> CAA). La mutagenèse est réalisée avec les amorces 11 et 12 (Tableau 8), à partir du plasmide peGFP-N3-hHSF1 ou peGFP-C3-hHSF1. Comme pour les autres constructions, la résistance au siARN est obtenue grâce à la mutagenèse dirigée en utilisant les amorces 5 et 6.

#### *peGFP-N3-hHSF1-ΔTAD :*

La séquence codante du mutant HSF1-ΔTAD est obtenue par PCR en utilisant les amorces 1 et 13 pour le mutant HSF1-ΔTAD401 ou 1 et 14 pour le mutant HSF1-ΔTAD410. Le fragment résultant est digéré par les enzymes EcoRI et BglII et inséré dans le plasmide peGFP-N3 entre les sites EcoRI et BamHI. Comme pour les autres constructions, la résistance au siARN est obtenue par mutagenèse dirigée en utilisant les amorces 5 et 6.

#### *pcDNA3-hHSF1-TagRFP-T :*

La séquence codante d'HSF1 est obtenue par PCR en utilisant les amorces 3 et 4. Le produit de PCR est ensuite digéré par les enzymes HindIII et BglII puis insérée dans le plasmide pcDNA3-TagRFP-T (Shaner et al., 2008), entre les sites HindIII et BamHI. La protéine hHSF1 est ainsi fusionnée en position C terminale à la protéine TagRFP-T.

#### *pcDNA3.1-hHSF1-IFP1.4 :*

La séquence codante de la protéine IFP1.4 est obtenue par PCR en utilisant les amorces 15 et 16, à partir du plasmide pcDNA3-IFP1.4 (Shu et al., 2009). Le produit de PCR est digéré par les enzymes BamHI et EcoRI puis inséré dans le plasmide pcDNA3.1 entre les sites BamHI et EcoRI, donnant ainsi un nouveau plasmide pcDNA3.1-IFP1.4. La séquence codante de la protéine HSF1 est obtenue par PCR avec les amorces 3 et 4. Le fragment de PCR est ensuite digéré par les enzymes HindIII et BglII puis inséré dans le plasmide pcDNA3.1-IFP1.4 digéré par les mêmes enzymes.

La fin de la séquence codante d'HSF1-IFP1.4 dépendait du plasmide pcDNA3.1, ainsi le codon stop n'intervenait que 54 nucléotides après la fin de la séquence normale d'IFP1.4. Pour régler cela, une mutagenèse dirigée est réalisée avec les amorces 17 et 18 (Tableau 8), transformant le codon GAA du site EcoRI en TAA.

**Tableau 8 Liste des amorces utilisées pour les clonages**

	Nom	Séquence (5' -> 3')	Sens	Site clivage
1	Début HSF1 wt	GGAATTCACCATGGATCTGCCCGTGGGCCCCG	Sens	EcoRI
2	Fin HSF1 wt	GAAGATCTGGAGACAGTGGGGTCCTTGGC	Antisens	BglIII
3	Début HSF1 wt	GAAAGCTTACCATGGATCTGCCCGTGGGCCCC	Sens	HindIII
4	Fin HSF1 wt	GAAGATCTCCGGAGACAGTGGGGTCCTTGGC	Antisens	BglIII
5	HSF1 résistant	CGTCAACAAGCTCATTCAATTCTGATCTCACTGGTGCAG	Sens	No
6	HSF1 résistant	CTGCACCAGTGAGATCAGAAATTGAATGAGCTTGTTGACG	Antisens	No
7	Début ΔTRIM	GTCGTTCCAGGCTGTCTGGCGGATCTTTATGTC	Antisens	No
8	Fin ΔTRIM	CAGGACAGCCTGAACGACAGTGGCTCAGCAC	Sens	No
9	Début ΔDBD	GGACACACTGACGTTGCTGGGCCCCGCC	Antisens	No
10	Fin ΔDBD	AGCAACGTCAGTGTGTCCACCCTGAAGAGTGAAGACAT	Sens	No
11	HSF1 K80Q	CATGTATGGCTTCCGGCAAGTGGTCCACATCG	Sens	No
12	HSF1 K80Q	CGATGTGGACCACTTGCCGGAAGCCATACATG	Antisens	No
13	Fin ΔTAD 401	GAAGATCTCATGGTCTGCAGGTTATCCAGGTTGG	Antisens	BglIII
14	Fin ΔTAD 410	GAAGATCTGTCCACGCTGAAGCCGTGGC	Antisens	BglIII
15	Début IFP1.4	AGGATCCGATGGCTCGGGACCCTCTGCCA	Sens	BamHI
16	Fin IPF1.4	TGAATTCGGCTTCTTTCTCTGCACCTGCC	Antisens	EcoRI
17	IFP 1.4 stop	GCAGAGGAAAGAAGCCTAATTCTGCAGATATCC	Sens	No
18	IFP1.4 stop	GGATATCTGCAGAAATTAGGCTTCTTTCTCTGTC	Antisens	No

### **Génération de lignées cellulaires stables**

Des lignées cellulaires exprimant le plasmide peGFP-N3-hHSF1 ont été générées à partir des cellules HeLa, H1299 et U87. Les mutants hHSF1-ΔTRIM, hHSF1-ΔDBD et hHSF1-K80Q ont été insérés dans les cellules HeLa uniquement. Pour cela, les plasmides sont transfectés dans les cellules en utilisant la lipofectamine 2000. Les cellules sont rincées 24h après transfection, puis la pression de sélection est ajoutée 48h après transfection. Les cellules sont ensuite cultivées jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de mort cellulaire induite par l'ajout d'agent de sélection (environ deux semaines). Les cellules sont ensuite triées par cytométrie en flux, sur un cytomètre ARIA (Becton Dickinson). Les cellules non transfectées servent de contrôle, et permettent de définir une fenêtre de sélection à la limite de l'autofluorescence. Les cellules sont triées en plaque 96 puits, avec un mode de pureté permettant d'isoler une cellule d'intérêt par puits. Après plusieurs semaines de croissance, les cellules sont contrôlées et sélectionnées sur la base de leur niveau de fluorescence.

## FCS/mFCS

Les acquisitions de FCS ont été réalisées soit sur un système commercial Zeiss LSM 510 équipé du module Conforcor 2, soit sur un système commercial Zeiss LSM 710 équipé du module Confocor 3. Dans les deux cas, la calibration de l'appareil est effectuée avec une solution de Rhodamine 6 G à une concentration de 5 nM. Pour les analyses en cellules, chaque acquisition résulte de la moyenne de six acquisitions de dix secondes. Le choc thermique est effectué en incubant les cellules sur une platine chauffante pendant une heure à 43°C.

Les acquisitions de mFCS ont été réalisées sur un système développé par l'équipe d'Antoine Delon (LIPhy, Grenoble), le système est décrit Chapitre II, section 2.2. Avant chaque expérience en cellule, le système est calibré en utilisant une solution de dextran-rhodamine green. En cellules les acquisitions résultent de la moyenne de cinq acquisitions de dix secondes. Les différentes corrections pour le bruit électronique, le bruit de fond, le recouvrement des différents spots nécessitent l'acquisition d'une mesure supplémentaire de dix secondes sans laser. Sur ce système le choc thermique est directement appliqué sur le microscope en utilisant un système Delta T, permettant de chauffer l'objectif et la coupelle contenant les cellules.

Les données de mFCS sont ajustées avec un modèle de diffusion et interaction (Michelman-Ribeiro et al., 2009) avec l'équation suivante :

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[ (1 - C_{eq}) \left( 1 + \frac{\tau}{t_{dif}} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{\tau}{S^2 \cdot t_{dif}} \right)^{-1/2} \right] + C_{eq} (e^{-k_{off} \tau})$$

$N$  est le nombre de molécules,  $C_{eq}$ , la fraction de molécules liées,  $t_{dif}$  le temps de diffusion,  $S$  le paramètre de structure (rapport des rayons longitudinaux et transversaux du volume confocal) et  $k_{off}$  la constante de vitesse de dissociation.

$$C_{eq} = (1 - F_{eq}) = \frac{k_{on}^*}{k_{off} + k_{on}^*}$$

Avec  $F_{eq}$ , la fraction de molécules libre et  $k_{on}^*$  la constante de vitesse d'association qui incorpore la concentration de sites de liaison vacant à l'équilibre. Une autre composante temporelle a été ajoutée à cause des oscillations aux temps long ( $\approx 1$  s). Les ajustements sont effectués en utilisant le logiciel MATLAB. Pour la standardisation de la diffusion, les récentes valeurs estimées en FCS double focus pour la R6G ont été utilisées pour calculer  $D_{R6G} = 555 \mu\text{m}^2/\text{s}$  à 37°C et  $D_{R6G} = 634 \mu\text{m}^2/\text{s}$  à 43°C (Müller et al., 2008).

## **FRAP**

Les images confocales et les expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ont été réalisées sur un microscope confocal à balayage laser à excitation monophotonique commercial (Zeiss LSM 710), équipé d'un objectif à immersion à eau, 40x (C-Apochromat, 1.2 NA). Lors des acquisitions, les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère contenant 5% CO<sub>2</sub> grâce à une chambre d'incubation implantées sur le microscope. Le choc thermique est effectué pendant une heure à 43°C, sur platine chauffante située à proximité du microscope. Les mêmes cellules sont étudiées avant et après choc thermique.

Pour les expériences de FRAP, l'excitation est réalisée avec un laser argon à 488 nm, le photoblanchiment est assuré par la combinaison du laser 488 nm et d'une diode DPSS à 405 nm. L'intensité de l'émission de fluorescence est mesurée à travers un filtre Long Pass (LP 505 nm) par un photomultiplicateur (PMT). La fluorescence est brièvement photoblanchie (une itération de 80 ms) dans une région circulaire de rayon dix pixels ( $r=1,04 \mu\text{m}$ ). Pour les analyses dans le nucléoplasme, l'acquisition temporelle est réalisée sur une ligne de 128 pixels, toutes les 3,78 ms, sur une durée de 12 secondes ou plus quand nécessaire. Pour les corps nucléaires de stress, l'acquisition temporelle est réalisée par une série de cinq images en z, d'une région d'intérêt de 250 x 250 pixels, toutes les 5,23 secondes, pendant huit minutes.

L'intensité de fluorescence pendant la récupération a été mesurée à l'intérieur et à l'extérieur de la région de photoblanchiment en utilisant le logiciel MetaMorph. Les données sont corrigées pour le bruit de fond, le photoblanchiment et la perte de fluorescence globale due à l'acquisition continue, en utilisant l'équation suivante :

$$I_{ROI,corrigée,t} = \frac{(I_{ROI,mesurée,t} - I_{fond})}{(I_{OUT,mesurée,t} - I_{fond})}$$

Avec I représentant l'intensité de fluorescence soit à l'intérieur de la région de photoblanchiment (ROI), soit en dehors de la zone de photoblanchiment (OUT). L'intensité de fond est mesurée sur les images avant/après acquisition dans une région « noire » en dehors de la cellule. Les données de FRAP en ligne sont lissées en moyennant l'intensité de fluorescence de plusieurs lignes via le logiciel MetaMorph. Les 50 premières lignes avant photoblanchiment sont moyennées en 5 x 10 lignes, les lignes suivant le photoblanchiment sont de plus en plus lissées en fonction de l'éloignement temporelle avec le photoblanchiment. Ainsi les premières lignes sont moyennées en 2 x 5 lignes, puis en 100 x 10 lignes, 100 x 20 lignes, 100 x 40 lignes, 100 x 80 lignes, 100 x 120 lignes et n x 160 lignes. Une attention particulière a été portée à la zone de transition du

photoblanchiment, pour ne pas moyenner entre elles, les données avant et après photoblanchiment.

L'intensité de fluorescence des corps nucléaires de stress a été mesurée en utilisant le logiciel MetaMorph. Les corps nucléaires de stress sont recalés automatiquement par rapport à leurs mouvements en x, y et z.

Les courbes de FRAP sont ajustées avec deux modèles de diffusion et interaction. Le premier est un modèle analytique (Michelman-Ribeiro et al., 2009), l'ajustement non linéaire est réalisé avec le logiciel Origin Pro 8, avec l'équation suivante :

$$frap(t) = I_b + [I_f - I_b] \times \left[ \left[ F_{eq} \left[ e^{-\frac{zt_{dif}}{t}} \times \left( I_0 \left( \frac{2t_{dif}}{t} \right) + I_1 \left( \frac{2t_{dif}}{t} \right) \right) \right] + (1 - F_{eq}) \times (1 - e^{-k_{off}t}) \right] \right]$$

Avec  $F_{eq}$  représentant la fraction protéine libre,  $I_n$  les fonctions de Bessel d'ordre  $n$ ,  $t_{dif}$ , le temps de diffusion,  $I_b$  l'intensité relative de fluorescence juste après le photoblanchiment, et  $I_f$  l'intensité au temps infini,  $k_{off}$  la constante de vitesse de dissociation.

Le deuxième modèle est un modèle numérique (Sprague et al., 2004). Les données mesurées sont comparées aux courbes simulées obtenues en faisant varier les paramètres  $D$ ,  $k_{on}^*$  et  $k_{off}$  en utilisant le logiciel Mathematica.

Les données de mFCS et de FRAP sont analysées avec le logiciel de statistique STATA.

## **RT-QPCR**

Pour analyser l'expression des ARN d'HSP70 ou Sat III en réponse au choc thermique, les cellules sont cultivées en plaque 6 puits, et transfectées avec un siARN contrôle ou un siARN anti-HSF1 ainsi que différents plasmides, 72 heures avant l'extraction. Les ARN sont ensuite extraits avec le kit « Nucleospin RNA II » (Macherey Nagel). Une fois extraits, les ARN sont dosés, puis  $1\mu\text{g}$  d'ARN total est rétro-transcrit en ADN complémentaire, grâce au kit « transcription first strand cDNA synthesis kit » (Roche). Les cDNA sont ensuite analysés en Q-PCR sur l'appareil LightCycler 480 (Roche). Pour chaque expérience, les amorces ciblées contre GAPDH, HSF1, HSP70 et Sat III (pHUR98) sont systématiquement utilisées. Les analyses sont toujours réalisées en duplicata, en utilisant une gamme standard de six points ( $\text{H}_2\text{O}$ , 1/15 – 1/240). Pour la détection de GAPDH et HSP70, 5 ng de cDNA sont ajoutés au mélange réactionnel « quantitative SYBR-Green based PCR

assays » (Roche). 125 ng et 250 ng de cDNA sont utilisés pour la détection de Sat III et HSF1, respectivement.

La normalisation et la quantification des données sont réalisées en utilisant la formule suivante :  $induction = Eff_{test}^{\Delta Cp_{test}} / Eff_{GAPDH}^{\Delta Cp_{GAPDH}}$ . Avec  $Eff_{test}$  et  $Eff_{GAPDH}$  correspondant à l'efficacité de réaction des amorces testées (HSF1, HSP70 ou Sat III) ou GAPDH,  $\Delta Cp_{test}$  et  $\Delta Cp_{GAPDH}$ , correspondent au différentiel du nombre de cycles nécessaire pour atteindre le seuil de référence entre la condition normale et la condition 1h HS + 4h de récupération des différents ARNs. Ainsi la condition normale sert de référence (=1), et les conditions tests reflètent l'induction de l'expression de l'ARNm par rapport à la condition NHS.

**Tableau 9 Liste des amorces utilisées pour la RT-Q-PCR**

Nom	Sens	Séquence
hHSF1	Sens	GCACATTCCATGCCCAAGTAT
	Antisens	GGCCTCTCGTCTATGCTCC
hHSP70	Sens	GCGAGGCGGACAAGAAGAA
	Antisens	GATGGGGTTACACACCTGCT
hGAPDH	Sens	CGAGATCCCTCCAAAATCAA
	Antisens	ATCCACAGTCTTCTGGGTGG
pHUR(9q12 – Sat III)	Sens	AATCAACCCGAGTGCAATCGAA
	Antisens	TCCATTCCATTCTGTACTCGG

### **Fractionnement sur gradients de glycérol après ultracentrifugation**

Les gradients sont coulés dans des tubes à centrifugation Beckman, de dimension 11\*34 mm. Trois concentrations de glycérol sont préparées, 20, 30 et 40% dans une solution 20 mM Hepes pH 7,9, 100 mM NaCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, inhibiteur de protéase (Complete Ultra, Roche), inhibiteur de phosphatase (PhosSTOP, Roche), 100 ng/ml TSA. La plus forte concentration est déposée dans le fond du tube (700 µl), puis les deux autres dans un ordre décroissant de concentration. Les gradients sont ensuite congelés à -80°C. Avant ultracentrifugation, les gradients sont décongelés et conservés à 4°C pendant au moins quatre heures.

Les cellules sont cultivées dans une boîte de 10 cm de diamètre, elles sont ensuite incubées ou non pendant une heure à 43°C, au bain marie. Les protéines sont extraites en utilisant 150 µl d'un tampon LSDB 500 (25 mM Hepes pH 8, 500 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycérol, 0,1% NP40, inhibiteur de protéase (Complete Ultra), inhibiteur de phosphatase (PhosSTOP), 1 mM DTT)

à 4°C pendant une heure. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 20 minutes à 14 000 rpm à 4°C. Le surnageant est dilué avec 100µl de LSDB 0 afin de réduire la concentration en sel, pendant 20 minutes à 4°C. Une partie de l'extrait total est conservée pour être déposée sur gel. Le reste du surnageant (220 µl) est déposé délicatement sur le haut d'un gradient. Les tubes sont ensuite équilibrés au mg près et ultracentrifugés pendant 5h à 53 000 rpm à 4°C sur une centrifugeuse Sorval RCH 120 EX, en utilisant le rotor RP55S-164. L'accélération et la décélération sont fixées à la valeur 3.

Après ultracentrifugation les gradients sont fractionnés en 13 fractions de volumes constants (180 µl). Les fractions sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE, et révélées avec un anticorps anti-HSF1.

### **Extraction de protéines sur cellules adhérentes**

Les cellules sont cultivées dans une Lab-Tek huit puits, et incubées ou non pendant une heure à 43°C. Les cellules sont observées au microscope confocal avant extraction. Les protéines sont ensuite extraites en utilisant un protocole adapté de de la littérature (Sheval and Polyakov, 2006). Les cellules sont dans un premier temps perméabilisées pendant dix minutes à 4°C en utilisant un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CuSO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF et 0,5% Triton X-100. Les cellules sont ensuite rincées avec le même tampon sans Triton. Les protéines sont ensuite extraites pendant dix minutes à 4°C avec un tampon contenant 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl et différentes concentrations en NaCl (de 0 à 2 M NaCl). Les cellules sont ensuite rincées en PBS puis fixées en PFA 4% pendant dix minutes à 4°C, et observées de nouveau au microscope confocal.

### **FCCS**

Les études de FCS à deux couleurs (FCCS) ont été réalisées sur le système commercial Zeiss LSM 710 équipé du module Confocor 3. La rhodamine 6 G et la cyanine 5 ont été utilisées pour calibrer les dimensions des volumes d'analyses. La R6G est utilisée pour estimer le volume obtenu avec le laser 488 nm, et la Cy5 pour le volume obtenu avec le laser 633 nm. Des standards FCCS *in-vitro* 488/633 nm (IBA BioTAGnology, Allemagne) ont été utilisées pour valider les expériences de FCCS. Les mesures correspondent à la moyenne de six acquisitions de dix secondes.

### **Wb**

Après extraction à l'urée 8 M, les protéines sont séparées sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Après transfert les Western Blot sont révélées avec un anticorps primaire anti-HSF1 (ADI-SPA 901,

Enzo Life Sciences) ou un anticorps primaire anti-tubuline (T5168, Sigma-Aldrich), puis par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Amersham ECL-HRP, GE Healthcare). La révélation est effectuée en utilisant le réactif ECL prime (Amersham, GE Healthcare).

## Références

- Abane, R. and Mezger, V.** (2010). Roles of heat shock factors in gametogenesis and development. *FEBS J.* **277**, 4150–4172.
- Abravaya, K., Phillips, B. and Morimoto, R. I.** (1991). Heat shock-induced interactions of heat shock transcription factor and the human hsp70 promoter examined by in vivo footprinting. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 586–592.
- Adam, V., Moeyaert, B., David, C. C., Mizuno, H., Lelimosin, M., Dedecker, P., Ando, R., Miyawaki, A., Michiels, J., Engelborghs, Y., et al.** (2011). Rational design of photoconvertible and biphotochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications. *Chem. Biol.* **18**, 1241–1251.
- Ahn, S. G., Liu, P. C., Klyachko, K., Morimoto, R. I. and Thiele, D. J.** (2001). The loop domain of heat shock transcription factor 1 dictates DNA-binding specificity and responses to heat stress. *Genes Dev.* **15**, 2134–2145.
- Akerfelt, M., Trouillet, D., Mezger, V. and Sistonen, L.** (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1113**, 15–27.
- Amici, C., Sistonen, L., Santoro, M. G. and Morimoto, R. I.** (1992). Antiproliferative prostaglandins activate heat shock transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6227–6231.
- Anckar, J. and Sistonen, L.** (2011). Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 1089–1115.
- Arsène, F., Tomoyasu, T. and Bukau, B.** (2000). The heat shock response of Escherichia coli. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 3–9.
- Bacia, K. and Schwille, P.** (2007). Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Protoc* **2**, 2842–2856.
- Bacia, K., Kim, S. A. and Schwille, P.** (2006). Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat. Methods* **3**, 83–89.
- Baler, R., Dahl, G. and Voellmy, R.** (1993). Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2486–2496.

- Bancaud, A., Huet, S., Daigle, N., Mozziconacci, J., Beaudouin, J. and Ellenberg, J.** (2009). Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J.* **28**, 3785–3798.
- Baudendistel, N., Müller, G., Waldeck, W., Angel, P. and Langowski, J.** (2005). Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interactions in vivo. *Chemphyschem* **6**, 984–990.
- Beaudouin, J., Mora-Bermúdez, F., Klee, T., Daigle, N. and Ellenberg, J.** (2006). Dissecting the contribution of diffusion and interactions to the mobility of nuclear proteins. *Biophys. J.* **90**, 1878–1894.
- Becker, M., Baumann, C., John, S., Walker, D. A., Vigneron, M., McNally, J. G. and Hager, G. L.** (2002). Dynamic behavior of transcription factors on a natural promoter in living cells. *EMBO Rep.* **3**, 1188–1194.
- Belmont, A. S.** (2001). Visualizing chromosome dynamics with GFP. *Trends Cell Biol.* **11**, 250–257.
- Bharadwaj, S., Ali, A. and Ovsenek, N.** (1999). Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8033–8041.
- Biamonti, G.** (2004). Nuclear stress bodies: a heterochromatin affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 493–498.
- Biamonti, G. and Vourc'h, C.** (2010). Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000695.
- Björk, J. K. and Sistonen, L.** (2010). Regulation of the members of the mammalian heat shock factor family. *FEBS J.* **277**, 4126–4139.
- Boellmann, F., Guettouche, T., Guo, Y., Fenna, M., Mnayer, L. and Voellmy, R.** (2004). DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 4100–4105.
- Bosisio, D., Marazzi, I., Agresti, A., Shimizu, N., Bianchi, M. E. and Natoli, G.** (2006). A hyperdynamic equilibrium between promoter-bound and nucleoplasmic dimers controls NF-kappaB-dependent gene activity. *EMBO J.* **25**, 798–810.

**Bruce, J. L., Price, B. D., Coleman, C. N. and Calderwood, S. K.** (1993). Oxidative injury rapidly activates the heat shock transcription factor but fails to increase levels of heat shock proteins. *Cancer Res.* **53**, 12–15.

**Calderwood, S. K., Xie, Y., Wang, X., Khaleque, M. A., Chou, S. D., Murshid, A., Prince, T. and Zhang, Y.** (2010). Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription. *Sign Transduct Insights* **2**, 13–24.

**Carter, D. R. F., Eskiw, C. and Cook, P. R.** (2008). Transcription factories. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 585–589.

**Chan, F. T. S., Kaminski, C. F. and Kaminski Schierle, G. S.** (2011). HomoFRET fluorescence anisotropy imaging as a tool to study molecular self-assembly in live cells. *Chemphyschem* **12**, 500–509.

**Choi, Y., Asada, S. and Uesugi, M.** (2000). Divergent hTAFII31-binding motifs hidden in activation domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 15912–15916.

**Chou, S.-D., Prince, T., Gong, J. and Calderwood, S. K.** (2012). mTOR Is Essential for the Proteotoxic Stress Response, HSF1 Activation and Heat Shock Protein Synthesis. *PLoS ONE* **7**, e39679.

**Chu, B., Zhong, R., Soncin, F., Stevenson, M. A. and Calderwood, S. K.** (1998). Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta. *J. Biol. Chem.* **273**, 18640–18646.

**Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A. B. and Lindquist, S.** (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* **130**, 1005–1018.

**Darzacq, X., Singer, R. H. and Shav-Tal, Y.** (2005). Dynamics of transcription and mRNA export. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 332–339.

**Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turris, V., Brody, Y., Shenoy, S. M., Phair, R. D. and Singer, R. H.** (2007). In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 796–806.

**Darzacq, X., Yao, J., Larson, D. R., Cause, S. Z., Bosanac, L., de Turris, V., Ruda, V. M., Lionnet, T., Zenklusen, D., Guglielmi, B., et al.** (2009). Imaging transcription in living cells. *Annu Rev Biophys* **38**, 173–196.

- Day, R. N. and Schaufele, F.** (2005). Imaging molecular interactions in living cells. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1675–1686.
- de Graaf, P., Mousson, F., Geverts, B., Scheer, E., Tora, L., Houtsmuller, A. B. and Timmers, H. T. M.** (2010). Chromatin interaction of TATA-binding protein is dynamically regulated in human cells. *J. Cell. Sci.* **123**, 2663–2671.
- Delon, A., Usson, Y., Derouard, J., Biben, T. and Souchier, C.** (2006). Continuous photobleaching in vesicles and living cells: a measure of diffusion and compartmentation. *Biophys. J.* **90**, 2548–2562.
- Digman, M. A., Brown, C. M., Sengupta, P., Wiseman, P. W., Horwitz, A. R. and Gratton, E.** (2005). Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope. *Biophys. J.* **89**, 1317–1327.
- Dundr, M., McNally, J. G., Cohen, J. and Misteli, T.** (2002). Quantitation of GFP-fusion proteins in single living cells. *J. Struct. Biol.* **140**, 92–99.
- Elson, E. L.** (2011). Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophys. J.* **101**, 2855–2870.
- Erdel, F., Müller-Ott, K., Baum, M., Wachsmuth, M. and Rippe, K.** (2011). Dissecting chromatin interactions in living cells from protein mobility maps. *Chromosome Res.* **19**, 99–115.
- Eymery, A., Souchier, C., Vourc'h, C. and Jolly, C.** (2010). Heat shock factor 1 binds to and transcribes satellite II and III sequences at several pericentromeric regions in heat-shocked cells. *Exp. Cell Res.* **316**, 1845–1855.
- Farla, P., Hersmus, R., Geverts, B., Mari, P. O., Nigg, A. L., Dubbink, H. J., Trapman, J. and Houtsmuller, A. B.** (2004). The androgen receptor ligand-binding domain stabilizes DNA binding in living cells. *J. Struct. Biol.* **147**, 50–61.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M.** (2003). Controlling the double helix. *Nature* **421**, 448–453.
- Ferrand, P., Wenger, J. and Rigneault, H.** (2011). Fluorescence correlation spectroscopy. *Methods Mol. Biol.* **783**, 181–195.
- Fritah, S., Col, E., Boyault, C., Govin, J., Sadoul, K., Chiocca, S., Christians, E., Khochbin, S., Jolly, C. and Vourc'h, C.** (2009). Heat-shock factor 1 controls genome-wide acetylation in heat-shocked cells. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4976–4984.

**Fujimoto, M. and Nakai, A.** (2010). The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J.* **277**, 4112–4125.

**Fujimoto, M., Oshima, K., Shinkawa, T., Wang, B. B., Inouye, S., Hayashida, N., Takii, R. and Nakai, A.** (2008). Analysis of HSF4 binding regions reveals its necessity for gene regulation during development and heat shock response in mouse lenses. *J. Biol. Chem.* **283**, 29961–29970.

**Gabai, V. L., Meng, L., Kim, G., Mills, T. A., Benjamin, I. J. and Sherman, M. Y.** (2012). Heat shock transcription factor Hsf1 is involved in tumor progression via regulation of hypoxia-inducible factor 1 and RNA-binding protein HuR. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 929–940.

**Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H. and Tsien, R. Y.** (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217–224.

**Gorman, J. and Greene, E. C.** (2008). Visualizing one-dimensional diffusion of proteins along DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 768–774.

**Gorski, S. A., Snyder, S. K., John, S., Grummt, I. and Misteli, T.** (2008). Modulation of RNA polymerase assembly dynamics in transcriptional regulation. *Mol. Cell* **30**, 486–497.

**Grøntved, L. and Hager, G. L.** (2012). Impact of chromatin structure on PR signaling: Transition from local to global analysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **357**, 30–36.

**Guettouche, T., Boellmann, F., Lane, W. S. and Voellmy, R.** (2005). Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* **6**, 4.

**Guo, Y., Guettouche, T., Fenna, M., Boellmann, F., Pratt, W. B., Toft, D. O., Smith, D. F. and Voellmy, R.** (2001). Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 45791–45799.

**Hager, G. L., McNally, J. G. and Misteli, T.** (2009). Transcription dynamics. *Mol. Cell* **35**, 741–753.

**Hahn, S.** (2008). Transcriptional regulation. Meeting on Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Transcription. *EMBO Rep* **9**, 612–616.

**Halford, S. E. and Marko, J. F.** (2004). How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res.* **32**, 3040–3052.

**Haustein, E. and Schwille, P.** (2007). Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**, 151–169.

- Hemmerich, P., Schmiedeberg, L. and Diekmann, S.** (2011). Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance. *Chromosome Res.* **19**, 131–151.
- Herr, A. J., Jensen, M. B., Dalmay, T. and Baulcombe, D. C.** (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* **308**, 118–120.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H. A., Fujimoto, M., Palvimo, J. J., Nakai, A. and Sistonen, L.** (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 45–50.
- Hinow, P., Rogers, C. E., Barbieri, C. E., Pietenpol, J. A., Kenworthy, A. K. and DiBenedetto, E.** (2006). The DNA binding activity of p53 displays reaction-diffusion kinetics. *Biophys. J.* **91**, 330–342.
- Holmberg, C. I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J. O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R. I., et al.** (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* **20**, 3800–3810.
- Hong, S., Kim, S. H., Heo, M. A., Choi, Y. H., Park, M. J., Yoo, M. A., Kim, H. D., Kang, H. S. and Cheong, J.** (2004). Coactivator ASC-2 mediates heat shock factor 1-mediated transactivation dependent on heat shock. *FEBS Lett.* **559**, 165–170.
- Hoogstraten, D., Nigg, A. L., Heath, H., Mullenders, L. H. F., van Driel, R., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeulen, W. and Houtsmuller, A. B.** (2002). Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo. *Mol. Cell* **10**, 1163–1174.
- Hsu, A.-L., Murphy, C. T. and Kenyon, C.** (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **300**, 1142–1145.
- Htun, H., Barsony, J., Renyi, I., Gould, D. L. and Hager, G. L.** (1996). Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 4845–4850.
- Hu, Y., Kireev, I., Plutz, M., Ashourian, N. and Belmont, A. S.** (2009). Large-scale chromatin structure of inducible genes: transcription on a condensed, linear template. *J. Cell Biol.* **185**, 87–100.
- Hu, Y., Plutz, M. and Belmont, A. S.** (2010). Hsp70 gene association with nuclear speckles is Hsp70 promoter specific. *J. Cell Biol.* **191**, 711–719.

- Janicki, S. M., Tsukamoto, T., Salghetti, S. E., Tansey, W. P., Sachidanandam, R., Prasanth, K. V., Ried, T., Shav-Tal, Y., Bertrand, E., Singer, R. H., et al.** (2004). From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell* **116**, 683–698.
- Jasinska, A. and Krzyzosiak, W. J.** (2004). Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *FEBS Lett.* **567**, 136–141.
- Johnson, T. A., Elbi, C., Parekh, B. S., Hager, G. L. and John, S.** (2008). Chromatin remodeling complexes interact dynamically with a glucocorticoid receptor-regulated promoter. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3308–3322.
- Jolly, C., Morimoto, R., Robert-Nicoud, M. and Vourc'h, C.** (1997). HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites. *J. Cell. Sci.* **110** ( Pt 23), 2935–2941.
- Jolly, C., Usson, Y. and Morimoto, R. I.** (1999). Rapid and reversible relocalization of heat shock factor 1 within seconds to nuclear stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 6769–6774.
- Jolly, C., Konecny, L., Grady, D. L., Kutsikova, Y. A., Cotto, J. J., Morimoto, R. I. and Vourc'h, C.** (2002). In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J. Cell Biol.* **156**, 775–781.
- Jolly, C., Metz, A., Govin, J., Vigneron, M., Turner, B. M., Khochbin, S. and Vourc'h, C.** (2004). Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J. Cell Biol.* **164**, 25–33.
- Jurivich, D. A., Sistonen, L., Kroes, R. A. and Morimoto, R. I.** (1992). Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* **255**, 1243–1245.
- Karpova, T. S., Kim, M. J., Spriet, C., Nalley, K., Stasevich, T. J., Kherrouche, Z., Heliot, L. and McNally, J. G.** (2008). Concurrent fast and slow cycling of a transcriptional activator at an endogenous promoter. *Science* **319**, 466–469.
- Kim, T. W., Kwon, Y.-J., Kim, J. M., Song, Y.-H., Kim, S. N. and Kim, Y.-J.** (2004). MED16 and MED23 of Mediator are coactivators of lipopolysaccharide- and heat-shock-induced transcriptional activators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12153–12158.
- Kim, S.-A., Yoon, J.-H., Lee, S.-H. and Ahn, S.-G.** (2005a). Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress. *J. Biol. Chem.* **280**, 12653–12657.

- Kim, S.-A., Yoon, J.-H., Kim, D.-K., Kim, S.-G. and Ahn, S.-G.** (2005b). CHIP interacts with heat shock factor 1 during heat stress. *FEBS Lett.* **579**, 6559–6563.
- Kimura, H., Sugaya, K. and Cook, P. R.** (2002). The transcription cycle of RNA polymerase II in living cells. *J. Cell Biol.* **159**, 777–782.
- Kino, T., Liou, S.-H., Charmandari, E. and Chrousos, G. P.** (2004). Glucocorticoid receptor mutants demonstrate increased motility inside the nucleus of living cells: time of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) is an integrated measure of receptor function. *Mol. Med.* **10**, 80–88.
- Klein, C. and Waharte, F.** (2010). Analysis of molecular mobility by fluorescence recovery after photobleaching in living cells.
- Kline, M. P. and Morimoto, R. I.** (1997). Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2107–2115.
- Klokk, T. I., Kurys, P., Elbi, C., Nagaich, A. K., Hendarwanto, A., Slagsvold, T., Chang, C.-Y., Hager, G. L. and Saatcioglu, F.** (2007). Ligand-specific dynamics of the androgen receptor at its response element in living cells. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1823–1843.
- Kloster-Landsberg, M., Herbomel, G., Wang, I., Derouard, J., Vourc'h, C., Usson, Y., Souchier, C. and Delon, A.** (2012). Cellular response to heat shock studied by multiconfocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **103**, 1110–1119.
- Kornberg, R. D.** (2005). Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 235–239.
- Kouzarides, T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705.
- Kramer, P. R., Fragoso, G., Pennie, W., Htun, H., Hager, G. L. and Sinden, R. R.** (1999). Transcriptional state of the mouse mammary tumor virus promoter can affect topological domain size in vivo. *J. Biol. Chem.* **274**, 28590–28597.
- Lee, Y.-J., Kim, E.-H., Lee, J. S., Jeoung, D., Bae, S., Kwon, S. H. and Lee, Y.-S.** (2008). HSF1 as a mitotic regulator: phosphorylation of HSF1 by Plk1 is essential for mitotic progression. *Cancer Res.* **68**, 7550–7560.
- Li, B., Carey, M. and Workman, J. L.** (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707–719.
- Lindquist, S.** (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1151–1191.

- Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N. and Patterson, G. H.** (2003). Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat. Cell Biol. Suppl*, S7–14.
- Liu, P. C. and Thiele, D. J.** (1999). Modulation of human heat shock factor trimerization by the linker domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 17219–17225.
- Lu, M., Sohn, K.-J., Kim, S.-W., Li, C.-R., Kim, S., Kim, D.-K. and Park, J.-S.** (2009). Alpha-helix 1 in the DNA-binding domain of heat shock factor 1 regulates its heat-induced trimerization and DNA-binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **385**, 612–617.
- Maruvada, P., Baumann, C. T., Hager, G. L. and Yen, P. M.** (2003). Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 12425–12432.
- Mazza, D., Stasevich, T. J., Karpova, T. S. and McNally, J. G.** (2012). Monitoring dynamic binding of chromatin proteins in vivo by fluorescence correlation spectroscopy and temporal image correlation spectroscopy. *Methods Mol. Biol.* **833**, 177–200.
- McMillan, D. R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K. and Benjamin, I. J.** (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 7523–7528.
- McNally, J. G.** (2008). Quantitative FRAP in analysis of molecular binding dynamics in vivo. *Methods Cell Biol.* **85**, 329–351.
- McNally, J. G., Müller, W. G., Walker, D., Wolford, R. and Hager, G. L.** (2000). The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* **287**, 1262–1265.
- Metz, A., Soret, J., Vourc'h, C., Tazi, J. and Jolly, C.** (2004). A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J. Cell. Sci.* **117**, 4551–4558.
- Michelman-Ribeiro, A., Mazza, D., Rosales, T., Stasevich, T. J., Boukari, H., Rishi, V., Vinson, C., Knutson, J. R. and McNally, J. G.** (2009). Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **97**, 337–346.
- Mikuni, S., Tamura, M. and Kinjo, M.** (2007). Analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS Lett.* **581**, 389–393.
- Misteli, T.** (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* **291**, 843–847.

- Misteli, T.** (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* **128**, 787–800.
- Morimoto, R. I.** (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**, 1409–1410.
- Morley, J. F. and Morimoto, R. I.** (2004). Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol. Biol. Cell* **15**, 657–664.
- Mueller, F., Wach, P. and McNally, J. G.** (2008). Evidence for a common mode of transcription factor interaction with chromatin as revealed by improved quantitative fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* **94**, 3323–3339.
- Mueller, F., Mazza, D., Stasevich, T. J. and McNally, J. G.** (2010). FRAP and kinetic modeling in the analysis of nuclear protein dynamics: what do we really know? *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 403–411.
- Müller, F., Demény, M. A. and Tora, L.** (2007). New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors. *J. Biol. Chem.* **282**, 14685–14689.
- Müller, C. B., Loman, A., Pacheco, V., Koberling, F., Willbold, D., Richtering, W. and Enderlein, J.** (2008). Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *EPL (Europhysics Letters)* **83**, 46001.
- Müller, K. P., Erdel, F., Caudron-Herger, M., Marth, C., Fodor, B. D., Richter, M., Scaranaro, M., Beaudouin, J., Wachsmuth, M. and Rippe, K.** (2009). Multiscale analysis of dynamics and interactions of heterochromatin protein 1 by fluorescence fluctuation microscopy. *Biophys. J.* **97**, 2876–2885.
- Murshid, A., Chou, S.-D., Prince, T., Zhang, Y., Bharti, A. and Calderwood, S. K.** (2010). Protein kinase A binds and activates heat shock factor 1. *PLoS ONE* **5**, e13830.
- Nakai, A., Suzuki, M. and Tanabe, M.** (2000). Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J.* **19**, 1545–1554.
- Nalley, K., Johnston, S. A. and Kodadek, T.** (2006). Proteolytic turnover of the Gal4 transcription factor is not required for function in vivo. *Nature* **442**, 1054–1057.
- Newton, E. M., Knauf, U., Green, M. and Kingston, R. E.** (1996). The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 839–846.

- Ostling, P., Björk, J. K., Roos-Mattjus, P., Mezger, V. and Sistonen, L.** (2007). Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J. Biol. Chem.* **282**, 7077–7086.
- Pan, D. and Zhang, L.** (2008). Tandemly arrayed genes in vertebrate genomes. *Comp. Funct. Genomics* 545269.
- Pandey, R., Mandal, A. K., Jha, V. and Mukerji, M.** (2011). Heat shock factor binding in Alu repeats expands its involvement in stress through an antisense mechanism. *Genome Biol.* **12**, R117.
- Park, J. M., Werner, J., Kim, J. M., Lis, J. T. and Kim, Y. J.** (2001). Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock. *Mol. Cell* **8**, 9–19.
- Phair, R. D. and Misteli, T.** (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* **404**, 604–609.
- Phair, R. D., Scaffidi, P., Elbi, C., Vecerová, J., Dey, A., Ozato, K., Brown, D. T., Hager, G., Bustin, M. and Misteli, T.** (2004). Global Nature of Dynamic Protein-Chromatin Interactions In Vivo: Three-Dimensional Genome Scanning and Dynamic Interaction Networks of Chromatin Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6393–6402.
- Pirkkala, L., Nykänen, P. and Sistonen, L.** (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J.* **15**, 1118–1131.
- Rabindran, S. K., Haroun, R. I., Clos, J., Wisniewski, J. and Wu, C.** (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* **259**, 230–234.
- Rafalska-Metcalf, I. U. and Janicki, S. M.** (2007). Show and tell: visualizing gene expression in living cells. *J. Cell. Sci.* **120**, 2301–2307.
- Rayasam, G. V., Elbi, C., Walker, D. A., Wolford, R., Fletcher, T. M., Edwards, D. P. and Hager, G. L.** (2005). Ligand-specific dynamics of the progesterone receptor in living cells and during chromatin remodeling in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2406–2418.
- Richard-Foy, H. and Hager, G. L.** (1987). Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid-inducible MMTV promoter. *EMBO J.* **6**, 2321–2328.
- Ries, J. and Schwille, P.** (2012). Fluorescence correlation spectroscopy. *Bioessays* **34**, 361–368.

- Rino, J., Braga, J., Henriques, R. and Carmo-Fonseca, M.** (2009). Frontiers in fluorescence microscopy. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 1569–1579.
- Ritossa, F.** (1996). Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* **1**, 97–98.
- Ritossa, F. M. and Von Borstel, R. C.** (1964). Chromosome puffs in drosophila induced by ribonuclease. *Science* **145**, 513–514.
- Sakurai, H. and Enoki, Y.** (2010). Novel aspects of heat shock factors: DNA recognition, chromatin modulation and gene expression. *FEBS J.* **277**, 4140–4149.
- Sandqvist, A., Björk, J. K., Akerfelt, M., Chitikova, Z., Grichine, A., Vourc'h, C., Jolly, C., Salminen, T. A., Nymalm, Y. and Sistonen, L.** (2009). Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1340–1347.
- Santagata, S., Hu, R., Lin, N. U., Mendillo, M. L., Collins, L. C., Hankinson, S. E., Schnitt, S. J., Whitesell, L., Tamimi, R. M., Lindquist, S., et al.** (2011). High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 18378–18383.
- Sarge, K. D., Murphy, S. P. and Morimoto, R. I.** (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1392–1407.
- Satyal, S. H., Chen, D., Fox, S. G., Kramer, J. M. and Morimoto, R. I.** (1998). Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev.* **12**, 1962–1974.
- Schaaf, M. J. M. and Cidlowski, J. A.** (2003). Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1922–1934.
- Shamovsky, I. and Nudler, E.** (2008). New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 855–861.
- Shamovsky, I., Ivannikov, M., Kandel, E. S., Gershon, D. and Nudler, E.** (2006). RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature* **440**, 556–560.
- Shaner, N. C., Patterson, G. H. and Davidson, M. W.** (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell. Sci.* **120**, 4247–4260.

- Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W. and Tsien, R. Y.** (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* **5**, 545–551.
- Sharp, Z. D., Mancini, M. G., Hinojos, C. A., Dai, F., Berno, V., Szafran, A. T., Smith, K. P., Lele, T. T., Ingber, D. E. and Mancini, M. A.** (2006). Estrogen-Receptor- $\alpha$  Exchange and Chromatin Dynamics Are Ligand- and Domain-Dependent. *J Cell Sci* **119**, 4101–4116.
- Sheldon, L. A. and Kingston, R. E.** (1993). Hydrophobic coiled-coil domains regulate the subcellular localization of human heat shock factor 2. *Genes Dev.* **7**, 1549–1558.
- Sheval, E. V. and Polyakov, V. Y.** (2006). Visualization of the chromosome scaffold and intermediates of loop domain compaction in extracted mitotic cells. *Cell Biol. Int.* **30**, 1028–1040.
- Shi, Y., Mosser, D. D. and Morimoto, R. I.** (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* **12**, 654–666.
- Shu, X., Royant, A., Lin, M. Z., Aguilera, T. A., Lev-Ram, V., Steinbach, P. A. and Tsien, R. Y.** (2009). Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* **324**, 804–807.
- Soncin, F., Zhang, X., Chu, B., Wang, X., Asea, A., Ann Stevenson, M., Sacks, D. B. and Calderwood, S. K.** (2003). Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 700–706.
- Soumpasis, D. M.** (1983). Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* **41**, 95–97.
- Sprague, B. L. and McNally, J. G.** (2005). FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol.* **15**, 84–91.
- Sprague, B. L., Pego, R. L., Stavreva, D. A. and McNally, J. G.** (2004). Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* **86**, 3473–3495.
- Sprague, B. L., Müller, F., Pego, R. L., Bungay, P. M., Stavreva, D. A. and McNally, J. G.** (2006). Analysis of binding at a single spatially localized cluster of binding sites by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.* **91**, 1169–1191.

- Sprouse, R. O., Karpova, T. S., Mueller, F., Dasgupta, A., McNally, J. G. and Auble, D. T.** (2008). Regulation of TATA-binding protein dynamics in living yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 13304–13308.
- Stasevich, T. J., Mueller, F., Brown, D. T. and McNally, J. G.** (2010a). Dissecting the binding mechanism of the linker histone in live cells: an integrated FRAP analysis. *EMBO J.* **29**, 1225–1234.
- Stasevich, T. J., Mueller, F., Michelman-Ribeiro, A., Rosales, T., Knutson, J. R. and McNally, J. G.** (2010b). Cross-validating FRAP and FCS to quantify the impact of photobleaching on in vivo binding estimates. *Biophys. J.* **99**, 3093–3101.
- Stavreva, D. A., Müller, W. G., Hager, G. L., Smith, C. L. and McNally, J. G.** (2004). Rapid glucocorticoid receptor exchange at a promoter is coupled to transcription and regulated by chaperones and proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2682–2697.
- Stavreva, D. A., Varticovski, L. and Hager, G. L.** (2012). Complex dynamics of transcription regulation. *Biochimica Et Biophysica Acta*.
- Stenoien, D. L., Patel, K., Mancini, M. G., Dutertre, M., Smith, C. L., O'Malley, B. W. and Mancini, M. A.** (2001). FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat. Cell Biol.* **3**, 15–23.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D.** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45.
- Sullivan, E. K., Weirich, C. S., Guyon, J. R., Sif, S. and Kingston, R. E.** (2001). Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human SWI/SNF. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5826–5837.
- Tamaru, T., Hattori, M., Honda, K., Benjamin, I., Ozawa, T. and Takamatsu, K.** (2011). Synchronization of circadian Per2 rhythms and HSF1-BMAL1:CLOCK interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. *PLoS ONE* **6**, e24521.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., et al.** (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**, 1016–1028.
- Tanabe, M., Sasai, N., Nagata, K., Liu, X. D., Liu, P. C., Thiele, D. J. and Nakai, A.** (1999). The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **274**, 27845–27856.

- Thomas, M. C. and Chiang, C.-M.** (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105–178.
- Toko, H., Minamino, T. and Komuro, I.** (2008). Role of heat shock transcriptional factor 1 and heat shock proteins in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc. Med.* **18**, 88–93.
- Trinklein, N. D., Chen, W. C., Kingston, R. E. and Myers, R. M.** (2004). Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation. *Cell Stress Chaperones* **9**, 21–28.
- Tsukamoto, T., Hashiguchi, N., Janicki, S. M., Tumber, T., Belmont, A. S. and Spector, D. L.** (2000). Visualization of gene activity in living cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 871–878.
- van Royen, M. E., Zotter, A., Ibrahim, S. M., Geverts, B. and Houtsmuller, A. B.** (2011). Nuclear proteins: finding and binding target sites in chromatin. *Chromosome Res.* **19**, 83–98.
- Voellmy, R.** (2005). Dominant-positive and dominant-negative heat shock factors. *Methods* **35**, 199–207.
- Voellmy, R. and Boellmann, F.** (2007). Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv. Exp. Med. Biol.* **594**, 89–99.
- Vuister, G. W., Kim, S. J., Orosz, A., Marquardt, J., Wu, C. and Bax, A.** (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of Drosophila heat shock transcription factor. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 605–614.
- Walker, D., Htun, H. and Hager, G. L.** (1999). Using inducible vectors to study intracellular trafficking of GFP-tagged steroid/nuclear receptors in living cells. *Methods* **19**, 386–393.
- Wang, X., Khaleque, M. A., Zhao, M. J., Zhong, R., Gaestel, M. and Calderwood, S. K.** (2006). Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. *J. Biol. Chem.* **281**, 782–791.
- Westerheide, S. D., Anckar, J., Stevens, S. M., Jr, Sistonen, L. and Morimoto, R. I.** (2009). Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* **323**, 1063–1066.
- Workman, J. L.** (2006). Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev.* **20**, 2009–2017.
- Xu, D., Zalmas, L. P. and La Thangue, N. B.** (2008). A transcription cofactor required for the heat-shock response. *EMBO Rep.* **9**, 662–669.

- Xu, Y.-M., Huang, D.-Y., Chiu, J.-F. and Lau, A. T. Y.** (2012). Post-translational modification of human heat shock factors and their functions: a recent update by proteomic approach. *J. Proteome Res.* **11**, 2625–2634.
- Yamamoto, N., Takemori, Y., Sakurai, M., Sugiyama, K. and Sakurai, H.** (2009). Differential recognition of heat shock elements by members of the heat shock transcription factor family. *FEBS J.* **276**, 1962–1974.
- Yao, J., Munson, K. M., Webb, W. W. and Lis, J. T.** (2006). Dynamics of heat shock factor association with native gene loci in living cells. *Nature* **442**, 1050–1053.
- Yao, J., Ardehali, M. B., Fecko, C. J., Webb, W. W. and Lis, J. T.** (2007). Intranuclear distribution and local dynamics of RNA polymerase II during transcription activation. *Mol. Cell* **28**, 978–990.
- Yao, J., Zobeck, K. L., Lis, J. T. and Webb, W. W.** (2008). Imaging transcription dynamics at endogenous genes in living *Drosophila* tissues. *Methods* **45**, 233–241.
- Yu, P. and Kodadek, T.** (2007). Dynamics of the Hypoxia-Inducible Factor-1-Vascular Endothelial Growth Factor Promoter Complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 35035–35045.
- Yuan, C. X. and Gurley, W. B.** (2000). Potential targets for HSF1 within the preinitiation complex. *Cell Stress Chaperones* **5**, 229–242.
- Zhang, X., Henderson, I. R., Lu, C., Green, P. J. and Jacobsen, S. E.** (2007). Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 4536–4541.
- Zhang, Y., Murshid, A., Prince, T. and Calderwood, S. K.** (2011). Protein kinase A regulates molecular chaperone transcription and protein aggregation. *PLoS ONE* **6**, e28950.
- Zobeck, K. L., Buckley, M. S., Zipfel, W. R. and Lis, J. T.** (2010). Recruitment timing and dynamics of transcription factors at the Hsp70 loci in living cells. *Mol. Cell* **40**, 965–975.
- Zorrilla, S., Lillo, M. P., Chaix, D., Margeat, E., Royer, C. A. and Declerck, N.** (2008). Investigating transcriptional regulation by fluorescence spectroscopy, from traditional methods to state-of-the-art single-molecule approaches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1130**, 44–51.
- Zuo, J., Baler, R., Dahl, G. and Voellmy, R.** (1994). Activation of the DNA-binding ability of human heat shock transcription factor 1 may involve the transition from an intramolecular to an intermolecular triple-stranded coiled-coil structure. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7557–7568.

**Zuo, J., Rungger, D. and Voellmy, R.** (1995). Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4319–4330.

## Annexes

### 1. Articles

- « Multi-confocal fluorescence correlation spectroscopy »

Remi Galland, Jie Gao, Meike Kloster, Gaetan Herbomel, Olivier Destaing, Martial Balland, Catherine Souchier, Yves Usson, Jacques Derouard, Irene Wang, Antoine Delon

Article Publié dans « Frontiers in Bioscience » Edition Elite, issue 2 du 1<sup>o</sup> janvier 2011, page 476-488.

- « Cellular response to heat shock studied by multiconfocal Fluorescence Correlation Spectroscopy »

Meike Kloster-Landsberg, Gaëtan Herbomel, Irène Wang, Jacques Derouard, Claire Vourc'h, Yves Usson, Catherine Souchier, and Antoine Delon

Article publié dans « Biophysical Journal », volume 103, issue 6 du 19 septembre 2012, page 1110-1119.

- « Dynamics of the Heat Shock Factor 1 in human cells »

Gaëtan Herbomel, Meike Kloster-Landsberg, Edwige Col, Yves Usson, Claire Vourc'h, Antoine Delon and Catherine Souchier

Article en préparation.

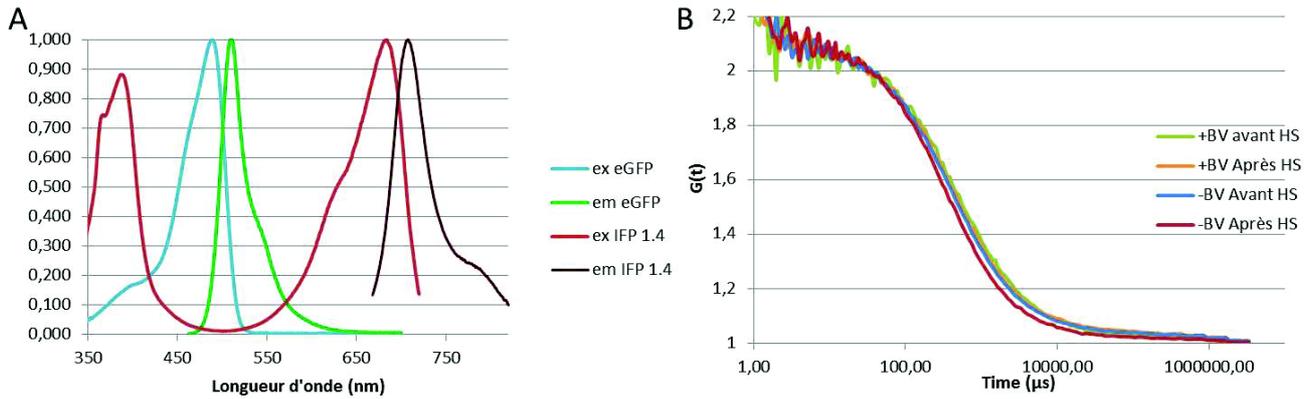
## 2. Résultats préliminaires

### 2.1. Etude de la trimérisation d'HSF1 en cellules vivantes

L'une des étapes principales de l'activation d'HSF1 est sa trimérisation en réponse au choc thermique. Nous avons vu que le domaine de trimérisation était primordial pour le changement de dynamique après choc thermique. Cependant peu d'informations temporelles sur la trimérisation d'HSF1 en cellules vivantes sont disponibles. Nous nous sommes donc intéressés à l'aspect dynamique de la trimérisation d'HSF1. Pour cela nous avons utilisé une technique de spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence (FCCS) pour visualiser la trimérisation d'HSF1 après choc thermique.

Pour l'analyse de la trimérisation d'HSF1 par FCCS, il est nécessaire de marquer la protéine HSF1 avec deux couleurs et d'exprimer ces deux protéines en même temps dans la cellule. La technique de FCCS corrèle les signaux des deux canaux (couleurs) entre eux. Il est donc nécessaire que le signal de chaque canal corresponde uniquement à la couleur associée. En d'autres termes, il faut éviter que la fluorescence d'une des protéines ne déborde dans le canal de la seconde. Ainsi il est préférable d'utiliser des protéines spectralement bien séparées. Dans un premier temps, nous avons utilisé un couple de protéines HSF1-TagRFP-T et HSF1-eGFP. La protéine eGFP possède un maximum d'excitation à 488 nm et un maximum d'émission à 507 nm, alors que la protéine TagRFP-T possède un maximum d'excitation à 555 nm et un maximum d'émission à 584 nm. En FCCS, nous observons un important passage de la fluorescence verte dans le canal rouge, ce qui entraîne l'apparition d'un signal de corrélation croisée parasite (faux positif). Ce signal résultant du débordement de la fluorescence verte dans le canal rouge pourrait être en partie corrigé. Cependant nous disposons d'une autre protéine fluorescente qui nous permet de nous affranchir de cette correction. A la place de la protéine fluorescente Tag-RFP-T nous avons utilisé la protéine IFP 1.4 dont le maximum d'excitation est de 684 nm et le maximum d'émission de 708 nm. Les deux protéines sont donc spectralement bien séparées et le signal de la protéine verte ne déborde pas dans le canal rouge lointain (Figure 36-A).

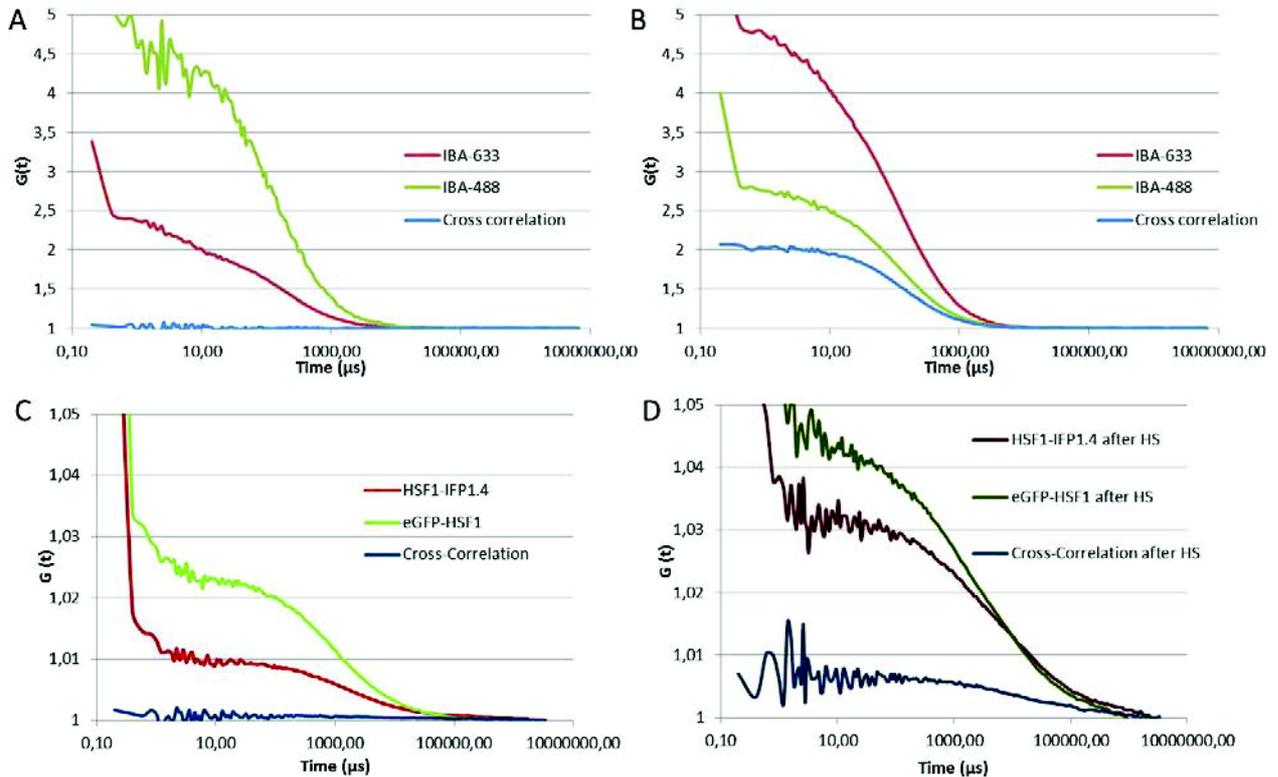
La protéine fluorescente IFP 1.4 a un faible rendement à l'état normal (rendement quantique de 0.070), cependant l'ajout de biliverdine (pigment naturel) permet d'augmenter le rendement de la protéine IFP 1.4 sans modifier ses autres propriétés (Shu et al., 2009). Nous avons voulu vérifier l'effet de l'ajout de biliverdine sur la dynamique de la protéine IFP 1.4 ainsi que l'effet du choc sur cette protéine en absence ou présence de biliverdine (Figure 36-B). Le choc thermique et/ou l'ajout de biliverdine, ne semble pas avoir d'effet sur la dynamique de la protéine IFP 1.4.



**Figure 36 Description et comportement des protéines fluorescentes**

A. spectre d'émission et d'excitation des protéines fluorescentes eGFP et IFP 1.4. (D'après les données du laboratoire de Tsien : <http://www.tsienlab.ucsd.edu>).

B. Courbe d'autocorrélation de la protéine fluorescente IFP 1.4 en présence ou en absence de biliverdine ( $\pm$ BV) avant ou après une heure de choc thermique. L'ajout de biliverdine ou le choc thermique n'a peu ou pas d'effet sur la mobilité de la protéine IFP 1.4



**Figure 37 FACS en cellules vivantes avec un couple de protéine eGFP-HSF1 et HSF1-IFP1.4**

A et B. Courbe d'autocorrélation (rouge et verte) et de corrélation croisée (bleue) pour les standards IBA 488-633 seuls (A) ou sur le même oligonucléotide (B). L'augmentation du signal de corrélation croisée (bleue) sur la courbe B traduit la co-diffusion des deux fluorochromes.

C et D. Courbe d'autocorrélation (rouge et verte) et de corrélation croisée (bleue) pour les protéines eGFP-HSF1 et HSF1-IFP 1.4 avant (C) et après (D) choc thermique. L'augmentation du signal de corrélation croisée (bleue) après choc thermique traduit la co-diffusion des deux protéines et donc leur trimérisation induite par le choc thermique.

Nous avons utilisé un couple de protéine HSF1-eGFP et HSF1-IFP 1.4, ces deux protéines se co-expriment en cellules HeLa en condition normale. De façon surprenante, l'induction du choc thermique induit la mort prématurée des cellules co-exprimant les deux protéines fluorescentes fusionnées en partie C-terminale d'HSF1. Les cellules exprimant les protéines fluorescentes individuelles ne présentent pas ce problème de viabilité avant et après choc thermique. Pour voir si cet effet n'est pas dû à la proximité des protéines fluorescentes lors de la trimérisation d'HSF1, nous avons utilisé un couple de protéine eGFP-HSF1 et HSF1-IFP 1.4. Dans ce cas, les protéines se co-expriment correctement, et se colocalisent après choc thermique dans les corps nucléaires de stress.

Les mesures ont été réalisées sur un microscope confocal Zeiss LSM710 couplé au module Confocor3 (Dynoscope, IAB, Grenoble). Un même pinhole est utilisé pour les deux longueurs d'ondes. Avant de réaliser des expériences de FCCS en cellules vivantes, il est nécessaire de procéder à plusieurs contrôles. Le réglage de l'appareil s'effectue comme pour une expérience de FCS classique, sauf qu'il est nécessaire de paramétrer le pinhole avec les deux longueurs d'onde d'excitation (488 et 633 nm). Nous utilisons pour cela la Rhodamine 6G et la cyanine 5. Il est nécessaire d'aligner les pinholes et les volumes de détection afin que ces derniers se superposent le mieux possible. Après calibration, il est nécessaire de réaliser des mesures tests. Nous utilisons pour cela des standards en solutions IBA 488/633 qui consistent en des oligonucléotides fusionnés à des molécules fluorescentes. Le contrôle négatif est assuré par un mélange d'oligonucléotides simplement marqués (Figure 37-A). Le contrôle positif est apporté par les oligonucléotides doublement marqués induisant un important signal de corrélation croisée (Figure 37-B).

Nous avons ensuite étudié la trimérisation d'HSF1 en cellules vivantes en utilisant le couple de protéines eGFP-HSF1 et HSF1-IFP 1.4. En condition normale, nous n'observons pas de signal de corrélation croisée (Figure 37-C). L'absence de signal rend compte de l'absence d'interactions entre les deux protéines, ce qui est en accord avec l'état monomérique d'HSF1 à 37°C. Après choc thermique, nous observons une augmentation du signal de corrélation croisée (Figure 37-D). L'augmentation du signal de corrélation croisée, traduit la co-diffusion des protéines fluorescentes et donc leur interaction. Il est donc possible de visualiser la trimérisation d'HSF1 après choc thermique, par la technique de FCCS.

L'utilisation de la spectroscopie à corrélation croisée de fluorescence (FCCS) avec un couple de protéines fluorescentes eGFP-HSF1 et HSF1-IFP 1.4 permet de visualiser la trimérisation d'HSF1 après choc thermique. Cependant le signal de corrélation croisée reste faible. Les expériences ont été réalisées en présence de la protéine endogène. Trois entités entre en compétition pour la

formation des trimères, la protéine endogène et les deux autres protéines marquées. Pour obtenir un meilleur signal de corrélation croisée il serait intéressant de retirer la protéine endogène et ainsi favoriser les interactions entre les protéines fluorescentes. Afin de contrôler l'efficacité de la corrélation croisée à l'intérieur de la cellule, il serait aussi intéressant d'utiliser des standards permettant de déterminer le maximum du signal de corrélation croisée que nous pouvons obtenir. Nous disposons pour cela de deux outils : le premier est une protéine de fusion exprimant la protéine eGFP fusionnée à la protéine IFP 1.4 espacée d'un linker de 15 acides aminés. Le deuxième est un standard IBA 488/633 à transfecter en cellules vivantes. Une autre technique pour suivre la trimérisation d'HSF1 serait le suivi d'homofRET par anisotropie de fluorescence.

Par la suite, il serait intéressant d'appliquer ces techniques pour visualiser des hétérotrimérisation, notamment d'HSF1 sauvage et des différents mutants, ou des différents mutants entre eux. Il serait aussi possible de visualiser en réponse au choc thermique l'hétérotrimérisation d'HSF1 et d'HSF2, nous disposons pour cela d'un plasmide exprimant la protéine HSF2-eGFP. Finalement pour décortiquer le processus dynamique du choc thermique, il serait intéressant de réaliser une cinétique en réponse à l'élévation de température. Une analyse de ce genre nous permettrait de répondre à des questions telles que à quel moment a lieu la trimérisation d'HSF1 en cellules vivantes ? Est-ce un processus progressif ou spontanée ? La trimérisation d'HSF1 a-t-elle lieu dans le noyau ou le cytoplasme des cellules ?

## **2.2. Visualisation en super-résolution des corps nucléaires de stress**

Dans la perspective de pouvoir analyser la dynamique d'HSF1 au niveau de la protéine unique, nous avons démarré une collaboration avec Virgile Adam (Equipe PIXEL, IBS, Grenoble). Nous avons deux objectifs principaux, le premier est de pouvoir obtenir des images haute-résolution des corps nucléaires de stress, le deuxième est de réaliser des expériences de suivi de molécule unique (SMT), pour étudier la dynamique d'HSF1.

Pour obtenir une image haute-résolution des corps nucléaires de stress, plusieurs techniques ont été explorées par Virgile Adam : PALM, STORM et STED. La technique de STED (déplétion par émission stimulée) permet de dépasser la limite de résolution imposée par la diffraction qui est imposée par la taille du spot d'excitation. Lorsque les molécules sont excitées, elles retournent à l'état normal par émission spontanée d'un photon fluorescent. Cependant les molécules peuvent aussi retourner à l'état normal par émission stimulée, si elles sont illuminées avec un laser de longueur d'onde similaire à celle de la fluorescence. Le STED utilise ce principe pour réduire la taille du spot d'excitation. Un premier laser excite les molécules, puis un deuxième laser pulsé est

envoyé sous la forme d'un anneau entourant le centre du spot d'excitation du premier laser. Ce deuxième laser est décalé vers les longueurs d'onde rouge, et permet ainsi d'empêcher la fluorescence des molécules contenues dans l'anneau par émission stimulée. Les molécules sont ainsi excitées par un spot d'une taille réduite, permettant un gain de résolution par rapport à la microscopie confocale conventionnelle. Nous avons réalisé des immunofluorescences de la protéine HSF1 après choc thermique, en utilisant un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente ATTO 647 N, fluorochrome conseillé pour le STED. De nouveaux essais sur STED et PALM sont prévus par Virgile Adam fin juillet.

Pour le suivi des molécules uniques (SMT), nous allons réaliser des expériences de PALM (microscopie de localisation par photoactivation) avec Virgile Adam. Le PALM consiste à utiliser des protéines fluorescentes photoactivables ou photoconvertibles afin de pouvoir contrôler la quantité de molécules qui fluorescent à un instant  $t$ , et de suivre la fluorescence de ces molécules jusqu'à ce qu'elles s'éteignent. En recommençant la procédure, il est possible d'obtenir de multiples tracés de molécules uniques. Pour réaliser des expériences de PALM, Virgile Adam a fusionné la protéine HSF1 à deux protéines fluorescentes : Dendra 2 (photoactivable) et Niji (photoconvertible). Après génération de lignées stables exprimant l'une de ces protéines, nous aimerions réaliser les premiers suivis de molécules uniques avec la protéine sauvage HSF1. Nous pourrions ainsi obtenir des mesures de déplacement carré moyen (MSD) des protéines et sur la forme des tracés : linéaire, contraint dans l'espace. Par la suite, il serait intéressant de pouvoir analyser les mutants en SMT, et comparer les tracés et le MSD des protéines sauvages et mutées. Les informations complèteraient à la fois les données de FRAP et de mFCS, et permettraient l'interprétation des données de dynamique d'HSF1.

### **2.3. Analyse des changements de texture chromatinienne induits par le choc thermique**

Le choc thermique induit un arrêt global de la transcription, qui s'accompagne d'une déacétylation globale sauf sur certaines régions, notamment les corps nucléaires de stress. En utilisant une lignée cellulaire HeLa exprimant l'histone de cœur H2A fusionnée à la protéine eGFP, nous avons voulu regarder les changements de texture chromatinienne que pouvait induire le choc thermique. La protéine H2A-eGFP a été choisie principalement pour sa non-toxicité pour les cellules. En effet d'autres colorants de l'ADN pour cellules vivantes auraient pu être utilisés (Hoechst 33342, DRAQ5), or le principe de ces colorants est de s'intercaler dans la double hélice d'ADN, ce qui peut entraîner des dommages irréversibles à l'ADN. Ces dommages pourraient entraîner des modifications de textures indépendamment du choc thermique, biaisant l'analyse.

De plus, des essais antérieurs dans l'équipe ont montré des effets secondaires de ces colorants à cause du choc thermique.

Nous avons réalisé des acquisitions de la texture chromatinienne par imagerie confocale en utilisant les cellules HeLa H2A-eGFP, à différents temps après choc thermique. Visuellement nous observons des différences dans la texture chromatinienne dès 15 minutes avec un remodelage très important après 1 heure de choc thermique. La quantification des changements de texture a été effectuée par Yves Usson (TIMC-IMAG, Grenoble), en utilisant une technique d'ondelette à trous. Le principe est de décomposer l'image d'origine en plusieurs coefficients d'ondelette (C1 à C5). Plus le coefficient d'ondelette est bas, moins les trous sont importants et plus les détails de l'image sont fins. Au contraire pour les hauts coefficients d'ondelettes, les trous entre les pixels sont grands et les détails plus grossiers. Quatre paramètres sont ensuite mesurés sur tous les plans d'ondelettes : moyenne, écart type, asymétrie (skewness) et écrasement (kurtosis) de la distribution des niveaux de gris. Des différences significatives ont été obtenues avant et après choc thermique.

