



HAL
open science

Caractérisation de l'effet de mutations MODY sur la fonction de bookmarking de HNF1beta

Jonathan Lerner

► **To cite this version:**

Jonathan Lerner. Caractérisation de l'effet de mutations MODY sur la fonction de bookmarking de HNF1beta. Biologie moléculaire. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T064 . tel-01223110

HAL Id: tel-01223110

<https://theses.hal.science/tel-01223110>

Submitted on 2 Nov 2015

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Ecole Doctorale « Génétique, Cellules, Immunologie, Infectiologie, Développement » (Gc2iD)

Spécialité : Biologie moléculaire.

Présentée par M. Jonathan Lerner.

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'Université Paris Descartes.

Caractérisation de l'effet de mutations MODY sur la fonction de *bookmarking* de HNF1beta.

Soutenance le 25 Novembre 2014,

Composition du jury :

Dr Marco Pontoglio, Directeur de thèse.

Dr Claire Rougeulle et Dr Pierre-Antoine Defossez, Rapporteurs.

Pr Jonathan Weitzman, Pr Reiner Veitia, Dr Michel Cohen-Tannoudji, Dr Laurence Heidet.

Equipe "Expression Génique, Développement et Maladies" (EGDM)

INSERM U1016/ CNRS UMR 8104 / Université Paris-Descartes

Institut Cochin Dpt. Génétique et Développement

24, Rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France

“Hold on to the now, the here, through which all future plunges to the past.”

James Joyce.

Remerciements:

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, et tout spécialement mes rapporteurs, pour avoir accepté de juger mon travail scientifique.

La plus grande difficulté de ces quatre années de thèse sera de faire tenir ces remerciements sur une page unique.

Je remercie mon directeur de thèse Marco Pontoglio pour ses précieux conseils, sa disponibilité permanente, son enthousiasme inaltérable, et sa passion si contagieuse pour la science et la recherche (ainsi que pour les délicieux dîners qu'il organise tous les hivers pour l'équipe).

Je remercie Alessia Bagattin, avec qui j'ai eu l'immense privilège et plaisir de travailler sur ce projet et dont les grandes qualités humaines et scientifiques ont été primordiales à l'aboutissement de notre étude. Je la remercie également d'avoir gentiment accepté de faire les sacrifices de souris quand c'était nécessaire, pour préserver mon âme sensible.

Je remercie Serge Garbay, pour son aide inestimable sur la partie bioinformatique de notre projet, qu'il a toujours apporté avec sa gentillesse naturelle. J'adresse toute mon amitié et ma reconnaissance à Kiko Verdeguer et à Tristan Félix, et avec qui j'ai démarré ce projet, et qui ont quitté le laboratoire depuis, avec lesquels cela a été un réel plaisir de travailler, et d'échanger à propos de tout et rien.

Je remercie l'ensemble des membres actuels et passés de l'équipe EGDM, les meilleurs collègues dans le meilleur des mondes possible : Michel Leibovici, Magali Chiral, Armelle Grevellec-Christophorou, Arianna Fiorentino, Evelyne Fischer, Claire Carette, Miguel Garcia-Gonzales, Cécile Madaras, Nelly Lourenço, Filippo Massa, en compagnie desquels j'ai passé quatre belles, agréables et stimulantes années. Leur grande patience à mon égard fût d'ailleurs démontrée, si besoin est, par le fait que je sois toujours en vie malgré mes occupations sauvages de paillasse et mes emprunts fréquents de matériel. Je suis heureux de prolonger un peu l'aventure avec vous.

Je remercie l'ensemble des personnes que j'ai pu croiser au cours de ma thèse à l'Institut Cochin, ainsi qu'à l'Université Paris Descartes, dans un cadre professionnel ou non.

Je remercie mes parents Christine et Nicolas pour leur soutien pendant ces quatre ans de thèse, mon frère Samuel pour les discussions sans fin et souvent sans sens, ainsi que l'ensemble des familles Lerner et Ducoloné, avec une pensée toute particulière pour mes grands parents paternels et maternels, à qui je dédie cette thèse.

Je remercie mes amis si nombreux. Les vieux amis de Rennes : FX Jamet, Nicolas Fleury, Pierre Leblanc, Wilfrid Mazier, et tous les autres que je ne vois plus assez ; les amis de Paris et d'ailleurs : Madou B Nimaga, Andres De Luna, James Cavanagh, Mike et Jessy St Auret, Benoit Rossé, Fabien Kintzig, Sandy Laredo, Antoine Cheltiel et Solal Abeles, le clan des Triwap, Lauriane Cabon et mes autres amis de la fac. Un remerciement spécial pour les potes des Quarks de Villebon-Longjumeau : Omar, Mehdi, Brice, Paco, John, Koubiak, Nico F, les Coachs, JR (RIP), et tous les autres que je n'ai pas la place de citer, mais avec qui j'ai eu le plaisir de passer mes dimanches à gagner ou à perdre des matchs durant 7 saisons, et avec lesquels j'ai partagé mes plus belles émotions sportives (Tell the whole damn world this is Quarks Territory). Une pensée ici également pour Julie, qui partagea ma vie pendant une partie de ma thèse.

Je m'excuse d'avance auprès de ceux que j'aurais malencontreusement oubliés.

Je terminerais en remerciant tous ceux qui ont été des sources d'inspirations (scientifiques ou non) et qui m'ont transmis passion et matière à réfléchir, au cours de mon cursus universitaire, de stages, de congrès, de lectures et de discussions. Ceux qui gardent foi en ce qu'ils font, malgré les temps difficiles et le climat orageux. La science, c'est avant tout des questions qui empêchent de dormir.

INTRODUCTION	6
I) Le Bookmarking, un nouvel aspect du contrôle de l'expression des gènes.	8
A) Chromatine et régulation de l'expression des gènes	8
1) Organisation et structure de la chromatine.....	8
3) Modifications dynamiques de la structure chromatinienne et régulation de l'expression des gènes.....	10
4) Héritabilité de la structure chromatinienne et transmission épigénétique	19
B) Mitose, Expression Génique et <i>bookmarking</i>	27
1) Généralités sur la mitose et sur le cycle cellulaire.....	27
2) Construction du chromosome mitotique et inactivation transcriptionnelle globale.	29
3) Le Bookmarking et la ré-expression des gènes après la mitose.	35
II) Facteurs de transcription de la famille HNF1 et activité de Bookmarking.	46
A) La famille des facteurs de transcription Hepatocyte Nuclear Factor 1.	46
1) Gènes, identification et expression tissulaire	46
2) Structure et domaines.	46
3) Motif consensus HNF1 et liaison à l'ADN	47
4) Partenaires.....	51
B) Singularité de la régulation de l'expression génique par HNF1beta lors du développement rénal.	52
1) Réseau transcriptionnel de HNF1beta lors du développement rénal.....	52
2) Conséquence d'une inactivation post-natale précoce de HNF1beta dans le rein murin.	52
3) Inactivation tardive et importance du contexte prolifératif	54
4) HNF1beta est un facteur de Bookmarking.....	55
III) Perte de fonction des facteurs HNF1 et pathologies.	58
A) Diabète MODY3 et MODY5.	59
1) HNF1alpha et MODY3.....	59
2) HNF1beta et MODY5.....	60
B) Autres pathologies dues à des dysfonctionnements au sein de différents organes.	61
1) HNF1alpha	61
2) HNF1beta et pathologies rénales.....	62

3) Les facteurs HNF1 sont des gènes suppresseurs de tumeurs..... 63

OBJECTIFS	66
MATERIEL ET METHODES	68
RESULTATS	75
DISCUSSION	132
CONCLUSIONS	139
PERSPECTIVES	141
BIBLIOGRAPHIE	145

INTRODUCTION

« Les êtres vivants sont des objets étranges » écrit Jacques Monod dans l'introduction de son essai intitulé « Le Hasard et la nécessité ». En s'interrogeant sur ce qui distingue les objets inanimés et les êtres-vivants, il définit des caractéristiques propres à ces derniers, notamment l'invariance reproductrice. Elle peut être définie comme la capacité de se reproduire et de transmettre de façon stable à leur descendance l'information correspondant à leur identité, sous la forme de leur structure et de leur fonction. L'identité au niveau cellulaire est le résultat de l'exécution d'un programme transcriptionnel, permettant de réguler l'ensemble des constituants cellulaires (protéines, lipides, Acides nucléiques...).

Le programme transcriptionnel d'une cellule est déterminé par un ensemble de marques épigénétiques, transmises d'une génération cellulaire à l'autre, indépendamment de la séquence de l'ADN. La division cellulaire constitue un événement critique vis-à-vis de l'identité cellulaire, puisqu'à cette étape se produit une modification globale de la structure chromatinienne, une dissociation de la plupart des effecteurs et des régulateurs de l'expression génique, résultant en une inactivation du programme transcriptionnel.

Certains régulateurs transcriptionnels, en restant associés à la chromatine pendant la mitose, permettent la constitution de marques épigénétiques permettant la réactivation post-mitotique adéquate du programme transcriptionnel. On parle de facteurs marque-pages (*bookmarking factors*), qui permettent de façon métaphorique à la cellule de retrouver ses pages dans le génome après la mitose.

Le facteur de transcription HNF1beta a été récemment identifié comme un facteur marque-page. L'objectif de ma thèse était de comprendre les modalités de sa fonction de *bookmarking*, en m'intéressant aux caractéristiques biochimiques lui conférant sa capacité singulière d'interaction avec la chromatine mitotique.

Je commencerai par présenter le mécanisme de *bookmarking* et ses implications sur le contrôle de l'expression des gènes. Ensuite, j'exposerai les résultats récents concernant l'implication des facteurs de transcription HNF1 dans la ré-expression post-mitotique de leurs gènes cibles. Enfin, je terminerai en introduisant les pathologies résultant d'une perte de fonction des facteurs de transcription HNF1, qui pourraient être potentiellement liées à une altération du mécanisme de *bookmarking*.

I) Le Bookmarking, un nouvel aspect du contrôle de l'expression des gènes.

A) Chromatine et régulation de l'expression des gènes

1) Organisation et structure de la chromatine

L'ADN génomique subit un processus de compaction dans le noyau cellulaire, réalisée par le biais d'un assemblage moléculaire : la chromatine. Au sein de la chromatine, l'ADN est associé à deux grands types de protéines: les histones, et les protéines non-histones (voir Alberts et al., 2002).

a) les histones et le nucléosome

La structure fine de la chromatine a été découverte en 1974, après observation au microscope électronique de fibres de 30nm et de 11nm de diamètre. La fibre de chromatine de 11nm présente une structure en « collier de perles » (**Figure 1A**). La digestion de ces fibres par des nucléases a montré que 146 paires de bases d'ADN venaient s'enrouler autour d'une « perle », constituée de protéines-histones, définissant ainsi l'unité de base de la chromatine : le nucléosome (voir Alberts et al., 2002). Des méthodes d'études cristallographiques ont par la suite permis d'établir la structure du cœur du nucléosome (Davey et al., 2002), constitué d'un octamère de protéines-histones : deux sous-unités des histones H2A, H2B, H3 et H4 autour desquelles s'enroule l'ADN (**Figure 1B**). Les nucléosomes sont séparés par des ADN *linkers* mesurant en moyenne 200 paires de bases. La taille des ADN *linkers* est variable, de quelques paires de bases à plusieurs centaines selon l'état de compaction de la chromatine (voir Alberts et al., 2002).

b) Euchromatine et hétérochromatine

Comme l'indique l'existence des fibres de 11nm et de 30 nm, le degré de compaction de la chromatine est variable. Dans le noyau cellulaire, la chromatine peut être séparée en deux grandes classes fonctionnelles, dont les premières observations ont été réalisées en 1928 (Heitz, 1928). Un botaniste allemand, Emil Heitz, a développé une méthode d'extraction des chromosomes à partir de plusieurs espèces de mousses. Chez *Pellia epiphylla*, Heitz observa que certaines régions chromosomiques étaient compactées et denses durant l'interphase. Il qualifia ces structures d'hétérochromatine, qu'il supposait génétiquement inactives. Par opposition, il qualifia d'euchromatine les régions chromosomiques décondensées, qu'il définit comme étant actives (Passarge, 1979) (**Figures 2A et 2B**). Grâce à l'avènement de la microscopie électronique, il a été possible de transposer les structures décrites par Heitz dans le noyau des cellules

animales (voir Alberts et al., 2002). La chromatine dense aux électrons a été par analogie qualifiée d'hétérochromatine, et la chromatine faiblement dense aux électrons d'euchromatine (**Figure 2C**). Les hypothèses de Heitz se sont révélées justes, puisque l'état d'activation ou d'inactivation transcriptionnelle est lié au degré de compaction de la chromatine (voir Li et al., 2007). L'euchromatine présente un état relâché et est active transcriptionnellement. Au contraire, l'hétérochromatine présente une structure compacte et une inactivité transcriptionnelle. Une variété d'états de compaction chromatinienne existe (voir Alberts et al., 2002). La fibre de 11nm représente l'état le plus relâché de la chromatine. La fibre de 30 nm représente un état plus compacté de la chromatine, permis par la mise en place d'interactions entre les nucléosomes. Il existe ensuite un ensemble de formes intermédiaires (Woodcock and Ghosh, 2010) entre la fibre de 30nm et le degré le plus important de compaction, qui survient au moment de la mitose (**Figure 2D**) (voir Vagnarelli, 2012). Des transitions existent entre les états de compaction chromatinien, ce qui a une importance sur la régulation de l'expression des gènes.

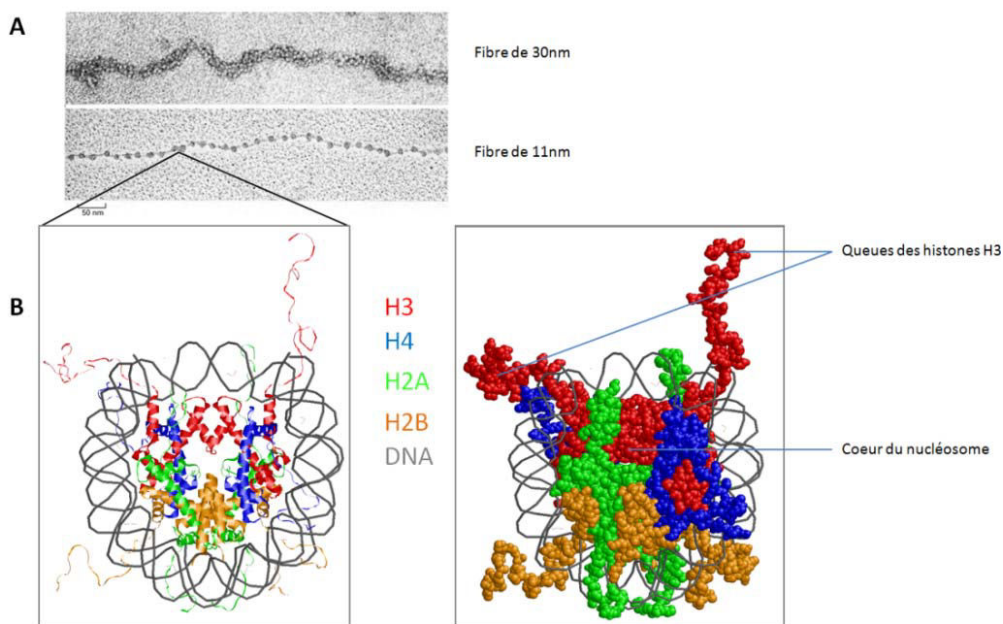


Figure 1 : Chromatine et histones

A : Fibres de chromatine 30nm et de 11nm observées en microscopie électronique.

B: Cristallographie des histones au coeur d'un nucléosome. A gauche, vue des structures secondaires. A droite vue des volumes atomiques. Les dimères des histones H3, H4, H2A et H2B forment un octamère globulaire autour duquel s'enroule 146 bp d'ADN. Les extrémités N-terminales des histones émergent de cette structure. Ces queues, non-structurées, sont difficiles à cristalliser. Pour cette raison certaines parties manquent à cette structure cristallographique.

Structure cristallographique établie par Davey et al, J Mol. Biol. 2002. Figures créés sur Rasmol.

3) Modifications dynamiques de la structure chromatinienne et régulation de l'expression des gènes.

L'état de compaction de la chromatine est dynamique et réversible. La mise en place de régulations de la compaction, à une échelle plus ou moins grande, permet d'établir une transition entre euchromatine et hétérochromatine (voir Craig, 2005). Une partie seulement de l'hétérochromatine peut subir une décompaction, et la transition vers une structure euchromatinienne. On parle alors d'hétérochromatine facultative, par opposition à l'hétérochromatine constitutive, qui présente une compaction importante et figée. L'hétérochromatine constitutive contient peu de gènes et est impliquée dans des mécanismes non liés à la transcription au sein des cellules. Par exemple, l'hétérochromatine constitutive est présente au niveau des centromères chromosomiques, qui ont un rôle essentiel lors de la mitose, en constituant les points d'accrochage des microtubules kinétochoriaux du fuseau mitotique, permettant l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. La transition dynamique entre euchromatine et hétérochromatine facultative, et vice-versa, présente une importance capitale dans la régulation de l'expression des gènes (voir Alberts et al., 2002; Li et al., 2007).

a) Modifications post traductionnelles des histones

Les histones sont des protéines globulaires. Leurs extrémités N-terminales ne sont pas structurées (elles sont qualifiées de queues d'histones), et « émergent » du nucléosome (**Figure 1B** et Davey et al., 2002)). Les queues d'histones sont la cible de plusieurs enzymes, responsables de la mise en place de modifications post-traductionnelles sur des résidus particuliers.

aa) Enzymes modifiant les histones, protéines épigénétiques d'écriture (*Epigenetic writers*)

Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent être séparées en deux grands groupes : les ajouts de groupements chimiques (Mono, di et tri méthylation, Acétylation, Phosphorylation) et les ajouts de protéines (SUMOylation, Ubiquitylation). Elles sont établies sur les chaînes latérales de résidus des histones canoniques (H2A, H2B, H3, et H4), ainsi que sur certains variants d'histones (H3.1, H3.3, HTZ.1) (Craig, 2005). Les modifications post-traductionnelles touchent principalement les résidus lysine (cibles de toutes les modifications post-traductionnelles connues à ce jour) et les arginines, mais également d'autres résidus, telles que les sérines et thréonines phosphorylables, par exemple (**Figure 3 A, B, C** et voir Berger, 2007; Zentner and Henikoff, 2013). Les enzymes modifiant la chromatine (Histone méthyl-transférases, Histone acétyl-transférases, Histone Ubiquitine-transférases...) sont qualifiées d'*epigenetic writers* (protéines épigénétiques d'écriture), et les modifications post-

traductionnelles des histones forment des marques reconnues par des *epigenetic readers* (protéines épigénétique de lecture) (**Figure 4**).

Les modifications post-traductionnelles des histones ont été classées comme des marques chromatiniennes d'activation ou de répression, en fonction de leur association avec la chromatine active ou inactive (**Figure 3D**). Dans le cas de certaines marques, la situation est claire. L'acétylation des résidus lysine et arginine, par exemple, est associée à une chromatine active transcriptionnellement (Alfrey et al., 1964; Heintzman et al., 2007; Pogo et al., 1966; Wang et al., 2008). Au contraire, les résidus d'histone SUMOylés sont plutôt associés à la chromatine réprimée (Shiio and Eisenman, 2003). Pour d'autres modifications post-traductionnelles, la situation est plus ambiguë. La méthylation et l'ubiquitinylation des acides-aminés, selon la nature des résidus modifiés et leur contexte, peuvent-être associées à de la chromatine transcriptionnellement active ou réprimée (voir Figure 5E et Berger, 2007; Zentner and Henikoff, 2013). Par exemple, la triméthylation de la quatrième lysine de l'histone H3 (H3K4me3), établie par l'Histone Méthyl-Transférase (HMT) Set1 (Figure 5A), est retrouvée en amont de gènes transcriptionnellement actifs, tandis que la triméthylation de H3K9 (H3K9me3), établie notamment par l'HMT Suv(3-9)h1, est retrouvée au sein de l'hétérochromatine, réprimée transcriptionnellement (Heintzman et al., 2007; Wang et al., 2008), ainsi qu'au niveau de l'hétérochromatine constitutive des centromères (Sullivan and Karpen, 2004). La méthylation des résidus d'arginine des queues d'histones peut également intervenir sur la régulation transcriptionnelle, notamment la di-méthylation réalisée par des Protéine Arginine-Méthyl-Transférases (PMRTs) (**Figure 3B**). De façon intéressante, selon l'asymétrie (H3R17me2a, H3R26me2a, H3R2me2a) ou la symétrie (H4R3me2s et H2AR3me2s, H3R8me2s) (**Figure 3B**) de la méthylation, les marques sont respectivement associées à de la chromatine active ou inactive du point de vue transcriptionnel (voir Di Lorenzo and Bedford, 2011). On peut également citer l'ubiquitinylation de la queue C-terminale des histones H2A et H2B, qui corrèle respectivement avec un état activé ou réprimé de la transcription (Levinger and Varshavsky, 1982; Wang et al., 2004a). L'association des phosphorylations des sérines et thréonines avec la chromatine est également ambivalente. La phosphorylation de la H3S10 (H3S10Ph), par exemple est retrouvée paradoxalement à la fois associée à une chromatine active transcriptionnellement et lors de la condensation mitotique des chromosomes (la protéine d'écriture est Aurora B) (Barratt et al., 1994; DeManno et al., 1999; Giet and Glover, 2001; Hans and Dimitrov, 2001; Hendzel et al., 1997; Van Hooser et al., 1998). Il est possible que cette modification post-traductionnelle soit ainsi associée à la dynamique des processus d'ouverture et de fermeture de la chromatine. D'autres modifications post-traductionnelles pourraient avoir un rôle sur la régulation transcriptionnelle telle la corrélation établie entre l'isomérisation d'une proline au sein de l'histone H3 et une conformation active ou inactive de l'extrémité N-terminale (Nelson et al, 2006).

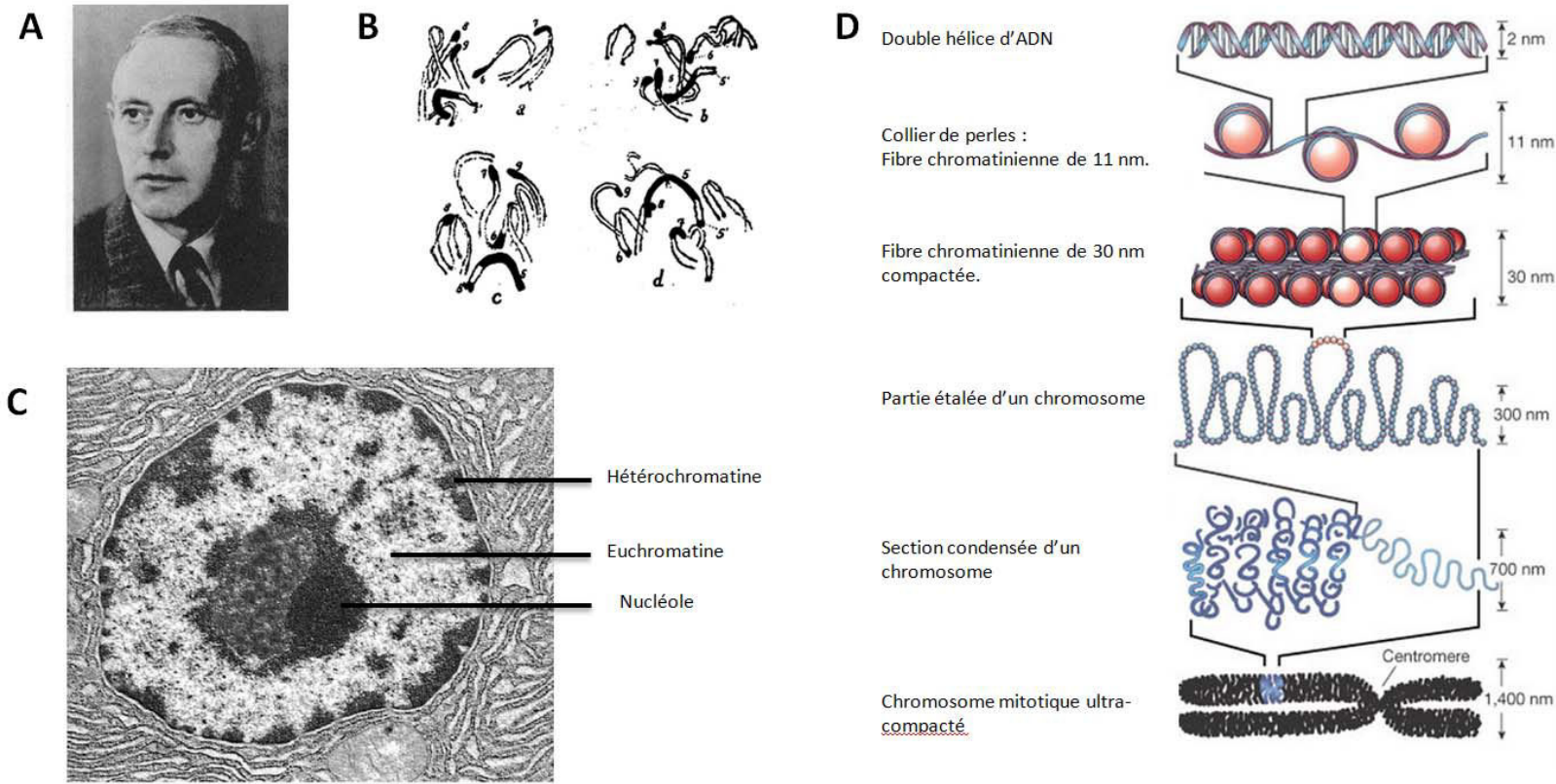


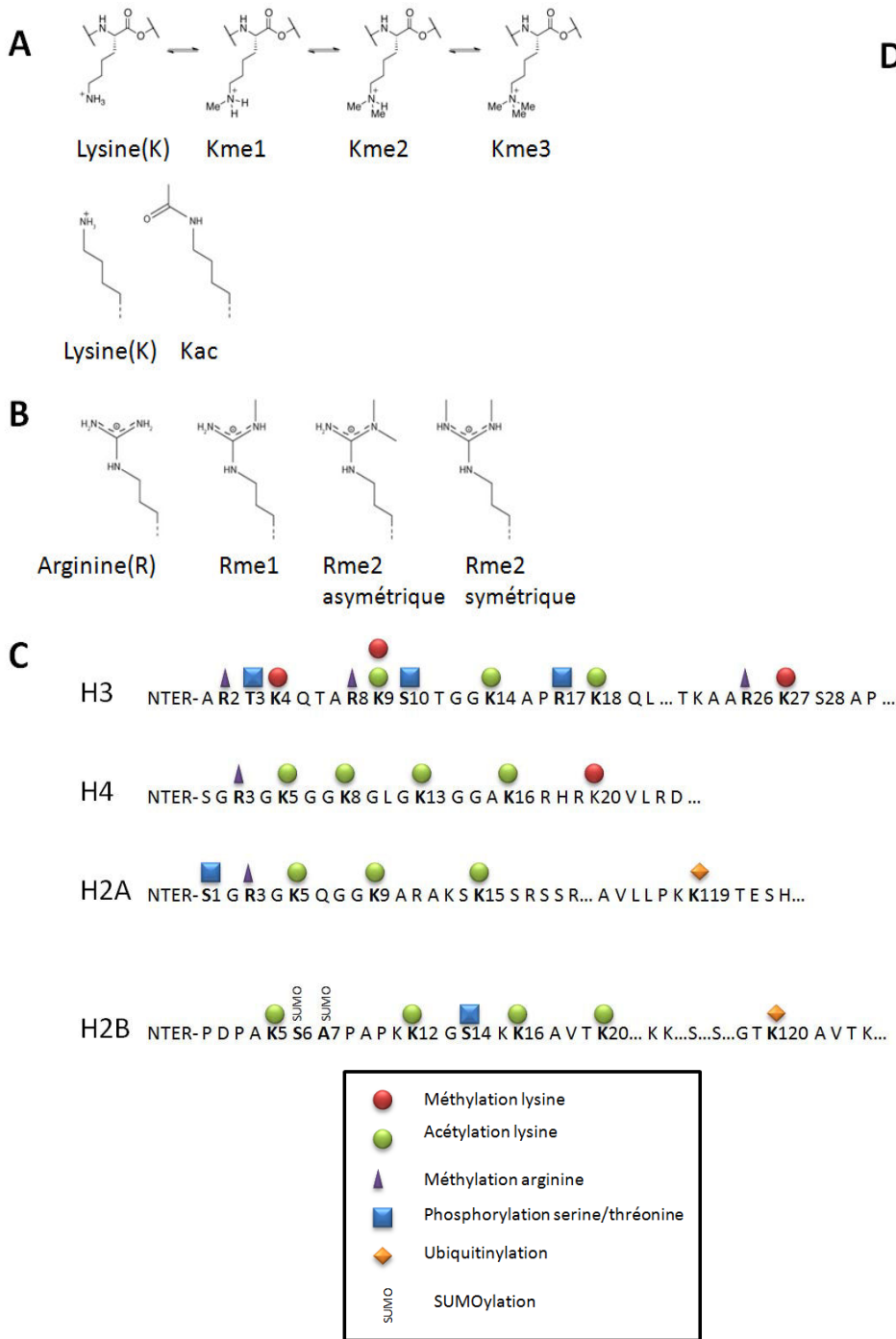
Figure 2 : Euchromatine, hétérochromatine et degrés de compaction

A: Emil Heitz (1892-1965).

B: Représentation de l'hétérochromatine sombre et de l'euchromatine claire chez *Pellia epiphylla* (Heitz, 1928).

C: Vue d'un noyau d'une cellule eucaryote en microscopie électronique. L'hétérochromatine est compacte et dense aux électrons (sombre). L'euchromatine est lâche et peu dense aux électrons (claire). (De <http://academics.hamilton.edu>).

D: Différents états de compaction de la chromatine, de la fibre chromatinienne de 11 nm au chromosome mitotique. (Traduit de Felsenfeld et Groudine, Nature 2003).



D Modifications de la chromatine

Marque	Site	Rôle transcriptionnel
Méthylation de l'ADN.		
Cytosine méthylées	Doublets CpG	REPRESSION
Modifications post-traductionnelles des histones		
Acétylation Lys	H3(9, 14, 18, 56)	ACTIVATION
	H4(5, 8, 13, 16)	ACTIVATION
	H2A, H2B	ACTIVATION
Phosphorylation Ser/Thr	H3(3, 10, 28)	ACTIVATION
	H2A, H2B	ACTIVATION
Méthylation Arg	H3(2a, 17a, 26a)	ACTIVATION
	H3(8s)	REPRESSION
	H4(3s)	REPRESSION
	H2A(3s)	REPRESSION
Méthylation Lys	H3(4, 36, 79)	ACTIVATION
	H3(9, 27)	REPRESSION
	H4(20)	REPRESSION
Ubiquitinylation Lys	H2B(123y/120h)	ACTIVATION
	H2A(119h)	REPRESSION
SUMOylation	H2B(6,7)	REPRESSION
	H2A(126)	REPRESSION
Isomérisation Pro	H3(30-38)	ACTIVATION/ REPRESSION

Figure 3 : Modifications post-traductionnelles des histones et effet transcriptionnel.

A: Mono-, di- et tri-méthylation des lysines; et acétylation des lysines (*tiré de <http://en.wikipedia.org/wiki/Histone>*).

B: Méthylation des arginines, asymétriques et symétriques (*tiré de <http://en.wikipedia.org/wiki/Histone>*).

C: Emplacement des modifications post-traductionnelles des queues d'histones (non exhaustif) (*inspiré de <https://ag.purdue.edu/biochem/Pages/default.aspx>*).

D: Effet des modifications d'histones sur la régulation transcriptionnelle. (*Inspiré de Berger Nature, 2007*). N.B. : y=chez la levure, h=chez l'homme; a=asymétrique, s=symétrique.

ab) Protéines épigénétiques de lecture (*Epigenetic readers*)

L'association des modifications post-traductionnelles des histones avec la chromatine active ou inactive est liée à leur rôle crucial dans les processus de compaction et de décompaction de la chromatine, essentiel pour la régulation de l'expression des gènes (voir Berger, 2007; Zentner and Henikoff, 2013). Il existe deux paradigmes, direct et indirect, concernant le lien mécanistique entre les marques d'histones et la régulation de la transcription (voir Berger, 2007). Le modèle direct spécifie que les modifications post-traductionnelles des histones permettent des modifications directes des charges électrostatiques et de l'encombrement stérique à l'interface de contact entre les nucléosomes, ce qui résulte en l'établissement d'une structure ouverte ou fermée de la chromatine. L'ouverture ou la fermeture de la chromatine ainsi générée permet de contrôler l'accès de protéines régulatrices reconnaissant spécifiquement l'ADN, (par exemple des facteurs de transcription). Dans le modèle indirect, les modifications post-traductionnelles des histones constituent des sites de reconnaissance pour des protéines lectrices des histones (**Figure 4**), notamment des complexes de remodelage de la chromatine. Ce modèle est appuyé par différentes observations. Par exemple, l'acétylation des lysines au niveau de la queue N-terminale de certaines histones permet la reconnaissance spécifique par une classe particulière de domaines protéiques, les bromodomains (Dhalluin et al., 1999; Jacobson et al., 2000; Zeng and Zhou, 2002). Ainsi, l'acétylation des lysines de l'histone H3 permet la stabilisation de l'interaction d'une Histone Acétyl-Transférase, GCN5, par l'intermédiaire de son bromodomaine (Dhalluin et al., 1999). Une autre observation appuyant ce modèle concerne la méthylation de la lysine, qui sert de point d'ancrage pour les chromodomains et les tudordomains (Kim et al., 2006). En plus de H3K9me3 (établie par Suv(3-9)h1), la triméthylation de H3K27, établie par l'Histone Méthyl-Transférase EZH2 (appartenant à PCR2, un complexe de la famille Polycomb) est également une marque d'histone typique de l'hétérochromatine (Wang et al., 2008). Ces deux marques sont reconnues spécifiquement par le chromodomaine de l'hétérochromatine protein-1 (HP-1), et permettent ainsi son recrutement au sein de la chromatine réprimée (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001).

L'association d'une marque d'histone avec la chromatine active ou réprimée ne définit pas forcément la nature des protéines lectrices qui la reconnaissent. Par exemple, nous avons indiqué précédemment que la marque H3K4me3 établie par Set1 était retrouvée en amont des gènes transcriptionnellement actifs. H3K4me3 est en effet un site de reconnaissance permettant le recrutement de plusieurs protéines lectrices et aboutissant à l'établissement de la structure active de la chromatine. Ainsi, chez la levure, la marque H3K4me3 est reconnue par le chromodomaine de Chd1 (*Chromodomain protein 1*) (Pray-Grant et al., 2005). Chd1 recrute alors SAGA, le complexe protéique auquel appartient l'Histone Acétyl-Transférase GCN5 citée précédemment, permettant l'établissement d'une structure chromatiniennne activée (Pray-Grant et al., 2005; Sims and Reinberg, 2006). La marque H3K4me3 est également reconnue par le biais

d'autres domaines spécialisés appartenant à des activateurs chromatinien. On peut citer le Plant HomeoDomain (PHD) de NURF et de Yng1, deux protéines appartenant au complexe NuA3, permettant l'acétylation de l'histone H3 (NuA3 : *Nucleosomal Acetyl-Transferase of Histone H3*) (Wysocka et al., 2006). Une protéine du complexe MLL1, WDR5, possédant un domaine de type *WD40* est capable d'interagir avec la marque H3K4me3 (Couture et al., 2006; Ruthenburg et al., 2006; Schuetz et al., 2006). MLL1 possède une activité Histone Méthyl-Transférase spécifique de H3K4, et permet donc le maintien et la propagation de cette marque de chromatine active (Couture et al., 2006; Steward et al., 2006).

Singulièrement, certains répresseurs chromatinien reconnaissent également spécifiquement H3K4me3: le complexe répresseur Sin3-HDAC1 (Histone-DeAcetylase1) par le biais du domaine PHD de ING2 (Peña et al., 2006; Shi et al., 2006) ; ou encore JMJD2A, la lysine-déméthylase capable de déméthyliser H3K4me3 que nous avons abordé précédemment (Huang et al., 2006). Une modification post-traductionnelle d'histone peut être reconnue par des partenaires avec des rôles contradictoires d'activation ou de répression de la chromatine. L'hypothèse d'un fonctionnement cyclique de l'activation de l'expression génique, permis par la nature bivalente des marques d'histones est émise par certains auteurs, avec une phase d'induction de l'activité transcriptionnelle suivie d'une phase de répression (voir Berger, 2007).

ac) Protéines effaçant les marques d'histones (*Epigenetic erasers*)

Les marques d'histones sont réversibles, et présentent donc un caractère dynamique. En effet, des enzymes capables d'éliminer les modifications post-traductionnelles des histones (*Epigenetic erasers*) existent : Histones déacétylases (HDACS), Phosphatases, Ubiquitine-protéases, Déiminases (ciblent les methyl-arginines) (voir Berger, 2007; Zentner and Henikoff, 2013) (**Figure 4**). La méthylation des lysines a longtemps été considérée comme irréversible, jusqu'à l'identification récente d'enzymes avec une activité Lysine-Méthylase. Elles sont réparties en deux classes : LSD1/BHC110, qui vise H3K4me1/2 (Shi et al., 2004) et JUMONJI, qui a pour cible H3K4me2/3, H3K9me2/3 et H3K6me2/3 (Agger et al., 2007; Lee et al., 2005; Shi et al., 2011).

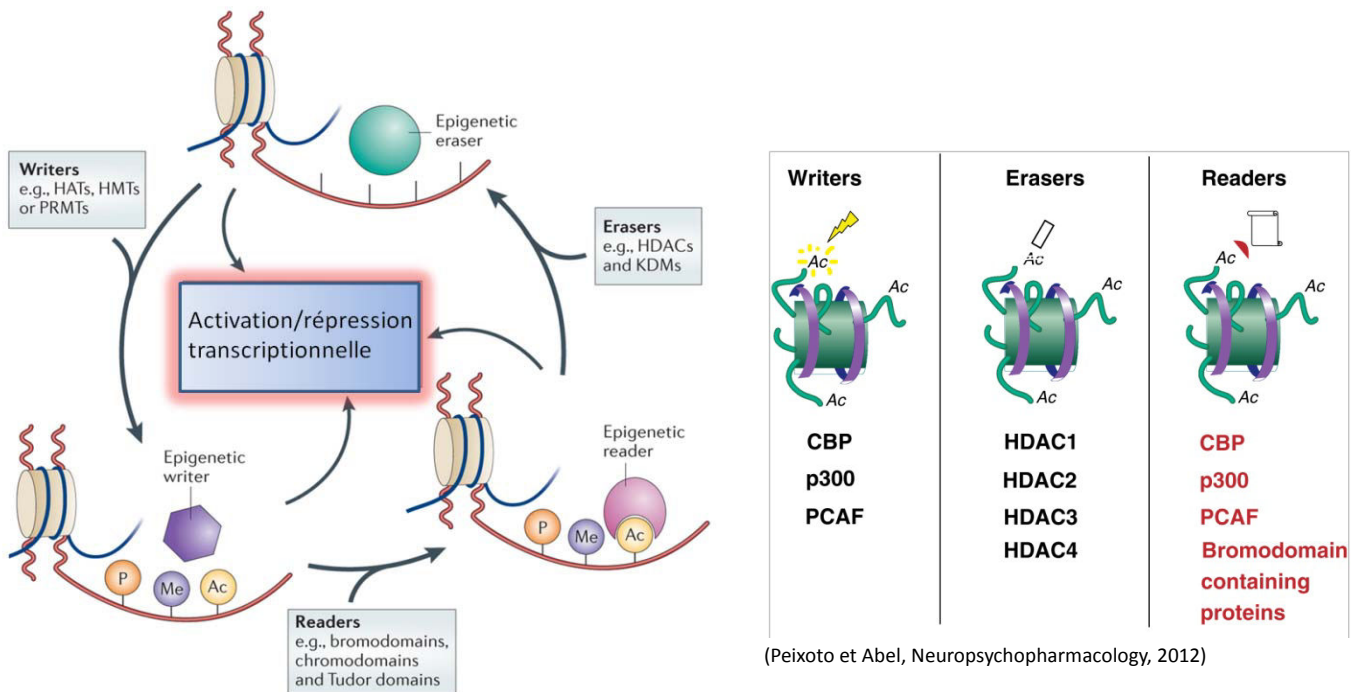


Figure 4 : writers, readers, et erasers des histones

L'établissement des marques d'histones par des enzymes *writers*, permet la reconnaissance par des protéines effectrices *readers*. Les marques d'histones sont réversibles, grâce à l'action de protéines *erasers*. La dynamique des marques d'histones permet la régulation de la structure chromatinienne et de l'activité transcriptionnelle. Tiré de *Jakovceski et Abkarian, Nature Medicine 2012*.

A droite : exemple de writers, readers et erasers épigénétiques.

b) Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN, chez les mammifères, se produit au niveau des cytosines engagées dans un doublet CpG (**Figure 5A**). De 60 à 80% des doublets CpG au sein du génome sont méthylés, aussi bien au niveau de séquences répétées, des régions intergéniques, des éléments de transposition ou encore des gènes. Une exception à cette règle concerne les îlots CpG, au sein desquels les doublets CpG sont au contraire principalement non-méthylés (voir Fournier et al., 2012). La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, étant généralement associée à un état transcriptionnel réprimé. Le lien mécanistique entre la méthylation de l'ADN, la répression de la transcription et la structure chromatinienne a été établi grâce à l'identification de protéines capables de se lier spécifiquement à l'ADN méthylé. Ces protéines sont qualifiées de Methyl (-CpG) Binding Proteins (MBPs). Il existe trois grandes familles de MBPs, définies par un domaine de liaison à l'ADN méthylé du même nom : la famille MBD, la famille Kaiso et Kaiso-like et la famille SRA domain (voir Fournier et al., 2012).

Ces trois familles de protéines présentent des différences structurales et de modalité de liaison à l'ADN méthylé.

Parmi les membres de la famille MBD, on peut citer les protéines MeCP2, MBD1, MBD2 ou MBD4. Les domaines MBD permettent la liaison à l'ADN méthylé, mais les protéines présentent des structures et des partenaires variés, suggérant leur implication dans une diversité de processus biologiques (voir Hendrich and Tweedie, 2003). Certaines protéines de la famille MBD sont même incapables de lier l'ADN méthylé (Laget et al., 2010). Les protéines de type Kaiso (Kaiso, ZBTB4, ZBTB38), présentent des domaines *Zinc finger* leur permettant d'établir des interactions de type séquence-spécifiques avec l'ADN méthylé, ou non-méthylé (Daniel et al., 2002; Prokhortchouk et al., 2001; Ruzov et al., 2009; Sasai et al., 2010). Les protéines possédant un domaine SRA (par exemple UHRF1 et UHRF2) se lient également à l'ADN méthylé (Unoki et al., 2004). Elles possèdent en outre un domaine Tudor en tandem (TTD), qui permet la reconnaissance et la liaison de la marque répressive H3K9me3 (Karagianni et al., 2008; Papait et al., 2008; Rottach et al., 2010).

Ces protéines permettent de faire le lien entre la méthylation de l'ADN et le recrutement de facteurs régulant la structure de la chromatine (voir Fournier et al., 2012). Ainsi, la méthylation de l'ADN permet la formation d'un complexe protéique répressif, dont le rôle principal est la déacétylation des histones. Les facteurs des trois familles de MBPs, grâce à leurs modalités différentes de liaison à l'ADN méthylé, permettent de réguler la structure chromatinienne à des échelles différentes. Les protéines Kaiso et Kaiso-like, par exemple, sont impliquées dans le recrutement au niveau d'un site-spécifique du complexe NCoR, au sein duquel se trouve notamment l'Histone-DeAcetylase 3 (HDAC3) (Yoon et al., 2003). Les protéines à domaine SRA agissent à une échelle chromatinienne plutôt locale, à l'inverse, des protéines MBDs, qui ont une action à grande échelle sur la chromatine (voir Fournier et al., 2012). Un des membres les plus étudiés de cette famille est MeCP2 (Methyl-CpG binding-Protein 2), qui est une protéine très abondante (même niveau d'expression que les octamères d'histones dans les neurones (Skene et al., 2010)). La régulation de la structure chromatinienne par MeCP2 implique le recrutement de facteurs répresseurs. MeCP2 recrute notamment mSin3a, complexe comprenant l'HDAC1 et l'HDAC2 (**Figure 5B, C, D et E**, et Razin, 1998). Certaines dérégulations des processus de méthylation de l'ADN ont des implications pathologiques, notamment au sein des cellules cancéreuses. Une répression aberrante de gènes suppresseurs de tumeurs peut se produire par l'intermédiaire de la méthylation des doublets CpG à proximité des promoteurs de ces gènes (Berdasco and Esteller, 2010).

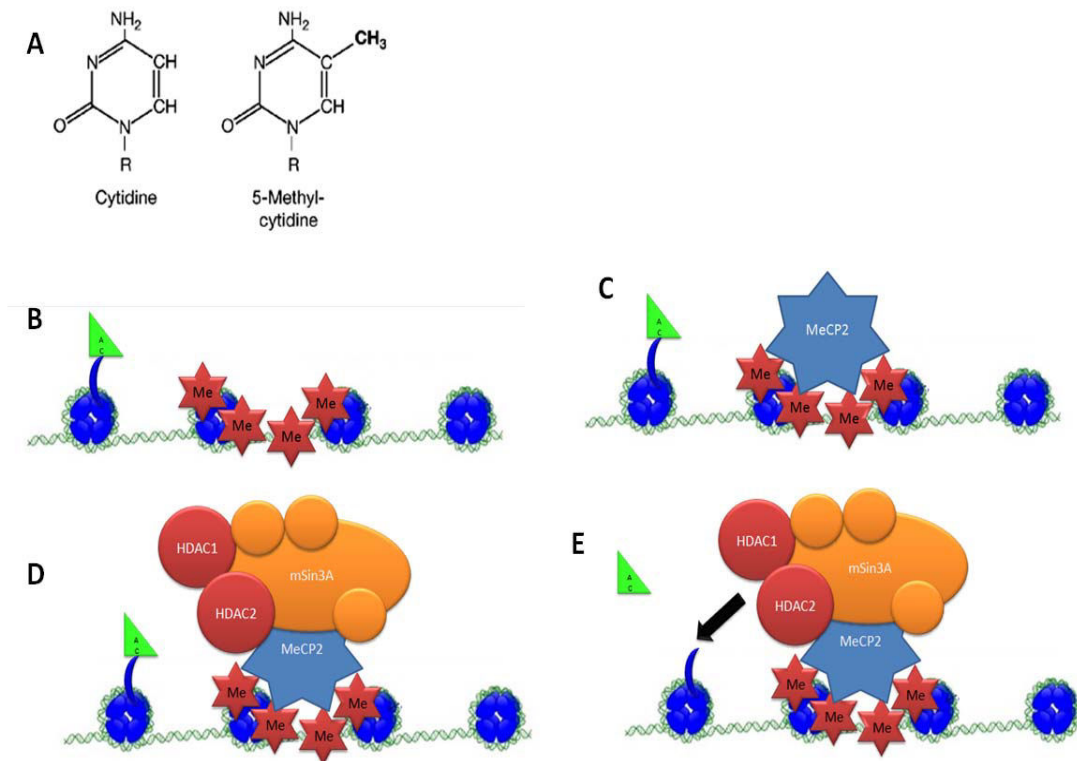


Figure 5 : Méthylation de l'ADN et structure chromatinienne

A: Méthylation des Cytidines de l'ADN. *tiré de Fenaux Nature Clinical Practice Oncology, 2005.*

B: Méthylation de l'ADN à proximité de chromatine transcriptionnellement active acétylée (AC).

C: Reconnaissance de l'ADN méthylé par la protéine MeCP2 de la famille MBD.

D: Recrutement de mSin3a et d'Histones DéACétylases (HDAC1 et HDAC2)

E: Déacétylation des histones et inactivation transcriptionnelle.

Nucléosomes tirés de <http://www.gwu.edu/~condmat/chromatin-dynamics.html>

c) Variants d'histone

Nous avons décrit jusqu'ici les histones canoniques : H2A, H2B, H3 et H4, constituant le cœur du nucléosome. Ces protéines possèdent un certain nombre d'isoformes, présentant des variations à la fois au niveau des queues N- et C- terminales et dans la partie globulaire (voir Maze et al., 2014; Sarma and Reinberg, 2005). L'histone présentant la plus grande variété d'isoformes est H2A. H2B et H3 présentent souvent quelques substitutions dans la partie globulaire. Aucun variant de l'histone H4 n'a cependant été identifié à ce jour. En remplaçant une histone canonique au sein du nucléosome, les variants d'histone permettent une modification des contacts intra- et inter-nucléosomaux, ainsi que le recrutement de protéines partenaires. La présence de variants au sein des nucléosomes permet ainsi des changements

dans la structure de la chromatine, et dans la stabilité des nucléosomes (Maze et al., 2014).

Pendant développement, la présence de variants d'histone est associée à une régulation processus de répression transcriptionnelle (Costanzi et al., 2000; Gamble et al., 2010), en particulier lors de la mise en place de l'inactivation aléatoire du chromosome X (nous reviendrons de la chromatine et de l'expression génique. Par exemple, le variant macroH2A est associé à des en détail sur ce point par la suite). Au contraire, le variant H2A.Bbd est associé à la chromatine active transcriptionnellement (Soboleva et al., 2012; Tolstorukov et al., 2012). Le rôle des variants H2A.Z (Creyghton et al., 2008; Faast et al., 2001; Hödl and Basler, 2012) et H3.3 (Bush et al., 2013; Couldrey et al., 1999; Lin et al., 2013) est moins clair, car ils sont associés à la fois à la chromatine active et à la chromatine réprimée, au point de vue transcriptionnel. D'autres variants sont impliqués dans des processus cellulaires essentiels, par exemple H2A.X est impliqué dans la réparation de l'ADN et donc le maintien de l'intégrité du génome (Fernandez-Capetillo et al., 2003). On peut également citer CENP-A, un variant de H3 présent lors de la mitose et essentiel pour la ségrégation des chromosomes (Howman et al., 2000).

4) Héritabilité de la structure chromatinienne et transmission épigénétique

a) Définition de la transmission épigénétique

La notion d'épigénétique, introduite par Conrad Waddington en 1942, désignait selon ses propres termes : "la branche de la biologie étudiant la causalité des interactions entre les gènes et leurs produits, qui donnent naissance au phénotype" (voir Waddington, 2012). La notion d'héritabilité fut ensuite ajoutée à l'idée du lien entre génotype et phénotype. En 1996, Arthur Riggs, dans *Epigenetics mechanisms of gene regulation*, donna une définition moderne de l'épigénétique, comme étant "l'étude des changements héréditaires (après la mitose ou la méiose) de l'activité d'un gène, qui ne peuvent être expliquée par des changements dans la séquence de l'ADN". La chromatine peut-être considérée comme le substrat de la transmission épigénétique, vu son importance dans la régulation de l'expression génique, et le caractère dynamique et réversible de sa structure. En effet, l'ensemble des modifications de la structure chromatinienne que nous avons décrites jusqu'ici, et permettant la régulation de l'expression génique, sont impliquées dans les processus de transmission épigénétiques. On pourrait émettre l'objection que la méthylation de l'ADN est une modification héréditable de l'ADN, et donc pas à proprement parler une marque chromatinienne. Cependant, nous avons décrit dans le chapitre précédent le lien fort entre la méthylation de l'ADN et la modification de la structure de la chromatine.

Au cours du développement se produisent des modifications épigénétique à l'échelle du génome. Les cellules souches embryonnaires (ES), issues du bourgeon embryonnaire, ont la propriété d'être pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent générer l'ensemble des types

cellulaires (à l'exception des tissus extra-embryonnaires). Les cellules ES peuvent s'engager dans une lignée et un destin cellulaire spécifique, dans un processus de différenciation. Conrad Waddington a introduit l'image du paysage épigénétique, dans lequel la cellule souche non-différenciée descend le long des aspérités d'une montagne, sculptée par l'action des gènes et de leurs effecteurs ; et en suivant un chemin s'engage dans un destin cellulaire.

b) Héritabilité de la structure de la chromatine.

ba) Modèle de transmission des patterns de méthylation de l'ADN

Les profils de méthylation des doublets CpG sont stables et maintenus au sein des cellules somatiques au cours des générations (voir (Bird, 2002)). Riggs, Holliday et Pugh ont proposé en 1975 un mécanisme épigénétique permettant d'expliquer la maintenance intergénérationnelle des profils de méthylation (Holliday and Pugh, 1975) (**Figure 6**). Le mécanisme proposé est basé sur l'idée que pendant chaque réplication du génome (lors de la phase S du cycle cellulaire), le profil de méthylation des doublets CpG du brin parental est recopié sur le brin progénique. Un corollaire de ce modèle est l'existence d'une enzyme possédant une activité méthyl-transférase reconnaissant l'ADN sous forme hémiméthylée ; et ainsi capable de mettre en place la copie du profil de méthylation sur le brin non-méthylé. La méthylation de l'ADN ainsi mise en place est qualifiée de méthylation de maintenance. L'ADN méthyl-transférase DNMT1 (DNA Méthyl-Transferase 1) a été identifiée par la suite comme ayant un tropisme particulier pour l'ADN hémiméthylé, faisant d'elle une candidate idéale pour la maintenance de la méthylation de l'ADN pendant la réplication (Jeltsch, 2006; Jurkowska et al., 2011). Certaines études récentes suggèrent l'implication dans ce processus de la Methyl (-CpG) Binding Protein UHRF1, que nous avons décrite précédemment. En effet, au cours de la phase S, en effet, UHRF1 interagit avec DNMT1 et avec la protéine PCNA qui est présente en amont de la fourche de réplication et déroulant physiquement l'ADN (Sharif et al., 2007; Uemura et al., 1987).

L'absence de méthylation *de novo* au sein de la cellule est un autre corollaire du modèle de Riggs, Holliday et Pugh (**Figure 6**). En effet, la stabilité du profil de méthylation des doublets CpG au cours des générations est essentielle. Cela implique que les profils de méthylation soient établis au cours du développement. Ce rôle est rempli par les ADN méthyl-transférases DNMT3A et DNMT3B (Hsieh, 1999; Okano et al., 1998, 1999). Au contraire de DNMT1, elles ne reconnaissent pas spécifiquement l'ADN hémiméthylé, et permettent donc potentiellement l'établissement de méthylation *de novo*. Des modèles d'inactivation des trois DNMTs chez la souris ont résulté dans une perte massive de méthylation de l'ADN et dans une létalité embryonnaire (Li et al., 1992; Okano et al., 1999). En revanche, au niveau cellulaire, la méthylation de l'ADN n'est pas toujours requise. En particulier, les cellules ES présentent de faibles taux de méthylation qui vont de paire avec leur état non-différencié (voir Fournier et al., 2012). Les cellules ES peuvent même subir un knockout des 3 DNMTs sans altération majeure (Tsumura et al., 2006). Le modèle de Riggs, Holliday et Pugh est revisité aujourd'hui. En effet,

des données récentes ont montré que la répartition des rôles de méthylation *de novo* et de méthylation de maintenance entre DNMT3A/B et DNMT1 n'était pas si cloisonnée qu'on le pensait. Des expériences suggèrent que DNMT1 pourrait jouer un rôle dans la méthylation *de novo*. En effet, les enzymes DNMT3A et B, à cause de contraintes structurales, introduisent de façon préférentielle des héli-méthylations de l'ADN, qui pourraient être des substrats pour DNMT1 (Jurkowska et al., 2011; Lin et al., 2002). De plus, l'activité de méthylation *de novo* de DNMT1 a été démontrée (Fatemi et al., 2001; Goyal et al., 2006). On peut également noter qu'en cas de double invalidation de *Dnmt3a* et de *Dnmt3b*, une méthylation résiduelle subsiste (Okano et al., 1999). Les processus de transmission de la méthylation de l'ADN sont essentiels dans un certain nombre de mécanismes de contrôle de l'expression des gènes comme l'empreinte parentale ou l'inactivation aléatoire du chromosome X.

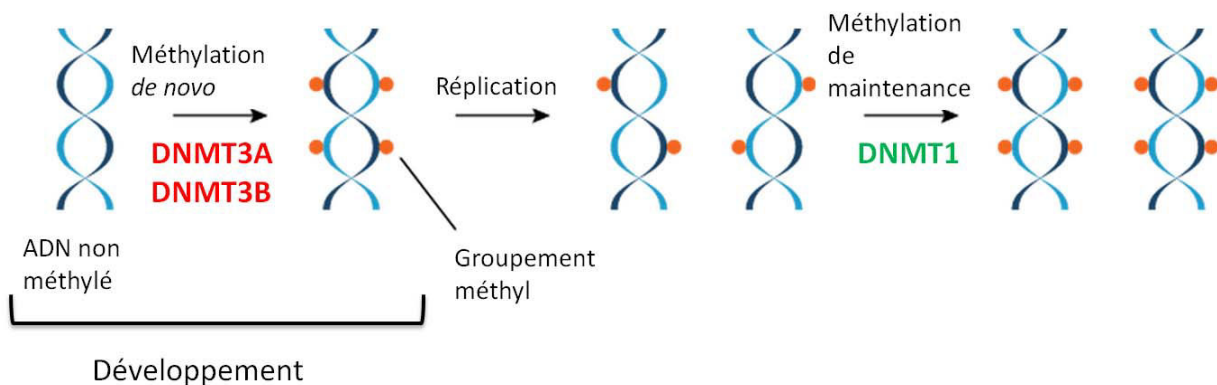


Figure 6 : Transmission épigénétique des schèmes de méthylation de l'ADN.

Les profils de méthylation des doublets CpG sont établis durant le développement par des enzymes capables d'établir des méthylations *de novo* sur les doublets CpG. Ces enzymes sont probablement DNMT3A et DNMT3b. Une fois les schèmes établis, il est nécessaire de les maintenir après chaque réplication. DNMT1, qui a une affinité pour l'ADN héli-méthylé, recopie les méthylations sur le brin progénique, assurant ainsi la transmission épigénétique des schèmes. Complété à partir de <http://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>

bb) Code histone et épigénétique

Les modifications post-traductionnelles des histones sont impliquées dans de nombreux processus épigénétiques. Une grande variété de mécanismes et d'acteurs est impliquée dans les mécanismes de transmission épigénétique liés aux histones.

L'effet de position (*position variegation effect*) fait partie des premiers phénomènes de transmission épigénétique d'états transcriptionnels observés chez la drosophile (voir Reuter and Spierer, 1992) et chez la levure *S. pombe* (Allshire et al., 1994; Thon and Klar, 1992). L'effet de position décrit le fait que l'état transcriptionnel, ON ou OFF, d'un certain nombre de gènes est dépendant de leur localisation au sein de l'euchromatine ou de l'hétérochromatine, ce qui est visible en particulier lors de translocations (**Figure 7A**). Plusieurs gènes capables d'influencer l'effet de position ont été identifiés, parmi lesquels des supprimeurs, appelés Su(var) (*Suppressors of variegation effect*) (**Figure 7B**). La famille des Su(var) comporte en particulier plusieurs répresseurs transcriptionnels, tels que des HDACs, des phosphatases, des Histone Méthyl-transférases entre autres (voir Wallrath, 1998). D'autres gènes, au contraire exacerbent l'effet de position, et sont qualifiés de E(var) (*Effectors of variegation*) (Figure 9B). La plupart des E(var) sont des complexes de remodelage, capables d'augmenter la mobilité nucléosomale et de décompacter la chromatine, grâce à une activité ATPase. Parmi les E(var), on peut notamment citer SWI/SNF (Kal et al., 2000; Tsukiyama and Wu, 1997).

L'effet de position est lié aux modifications post-traductionnelles des histones. En effet, les régulateurs Su(var) et E(var) peuvent interagir spécifiquement avec certaines marques d'histones, par le biais de domaines spécialisés tels que les chromodomaines, les bromodomaines, ou encore les domaines SET (voir Jenuwein and Allis, 2001) (van Lohuizen, 1999). Polycomb, par exemple possède un chromodomaine, et Trithorax possède un domaine SET. Ces deux protéines ont des effets antagonistes, répresseur pour Polycomb et activateur pour Trithorax, sur la structure chromatinienne et l'activation transcriptionnelle des gènes (van Lohuizen, 1999).

Les Su(var) et les E(var) sont impliqués dans plusieurs mécanismes de transmission épigénétique, par exemple l'héritabilité de l'hétérochromatine d'une génération cellulaire à l'autre (Grewal and Jia, 2007; Krauss, 2008; Richards and Elgin, 2002). Le maintien de l'état réprimé transcriptionnellement de l'hétérochromatine est essentiel. Nous avons dit précédemment que l'hétérochromatine est caractérisée par un certain nombre de marques chromatiniennes de répression, en particulier la marque H3K9me3, qui constitue un site de reconnaissance pour la protéine HP-1 (*Heterochromatin Protein-1*) (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). HP-1 permet le recrutement d'un régulateur de la famille Su(var), Suv(3-9)h1, complexe possédant notamment une activité Histone Méthyl-Transférase (HMT), spécifique notamment de H3K9 (Aagaard et al., 1999; Wreggett et al., 1994). La méthylation de H3K9 par Suv(3-9)h permet ainsi le maintien et donc la transmission épigénétique du statut réprimé de l'hétérochromatine. D'autres marques et variants d'histones sont impliqués dans ce

mécanisme. On peut citer par exemple le variant de l'histone H2A appelé macroH2A, qui est incorporé dans l'ADN destiné à être compacté sous forme d'hétérochromatine (Costanzi et al., 2000; Hoyer-Fender et al., 2004). Il est à noter que les facteurs reconnaissant l'ADN méthylé sont également impliqués dans la maintenance de l'hétérochromatine. Par exemple, la protéine MBD1 interagit avec CAF-1, qui assemble les tétramères d'histones pendant la réplication de l'ADN (Reese et al., 2003). Cette interaction permet à MBD1 de recruter SETDB1, qui porte une activité méthyl-transferase spécifique de H3K9 (Sarraf and Stancheva, 2004).

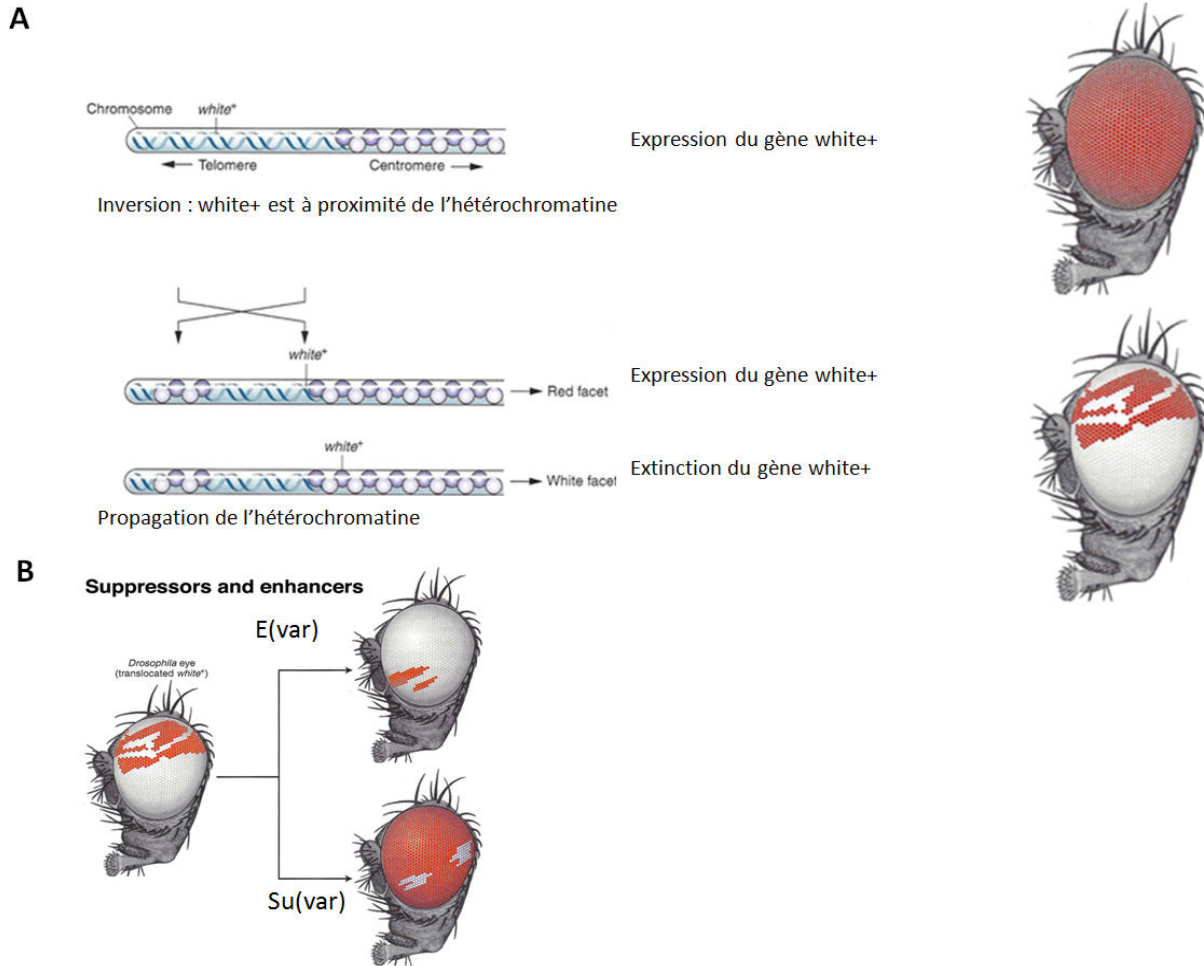


Figure 7: Effet de position chez la drosophile

A : L'effet de position décrit la différence d'expression d'un gène selon sa position génomique. Lorsque le gène *white*⁺ est exprimé, il présente au sein de régions euchromatinienne non-compactes. Le phénotype associé chez la drosophile est la couleur rouge des yeux. Certaines inversions génomiques modifient la position du gène *white*⁺ et le placent à proximité de régions d'hétérochromatine. Cela résulte en une extinction génique due à la propagation de l'hétérochromatine, et à un phénotype dit "varié" (*variegated*), un oeil majoritairement blanc.

B: Des gènes modifiant le phénomène d'effet de position ont été par la suite identifiés. Certains gènes augmentent l'effet de position (E(var)), et d'autres l'atténuent (Su(var))

Tiré de <http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture18.html>.

L'hypothèse de l'existence d'un code histone comme extension du code génétique a été émise au début des années 2000 (voir Turner, 2002) . Cette hypothèse suggère que de multiples marques d'histone agissent de façon combinatoire pour définir la structure de la chromatine. Elle repose sur trois conditions : premièrement que les modifications post-traductionnelles d'histones puissent-être un point d'ancrage spécifique pour des protéines transductrices, induisant des modifications de la structure chromatinienne (**Figure 4**). Deuxièmement que les marques d'histone puissent avoir une relation d'interdépendance et qu'il soit ainsi possible de générer une variété de combinaisons sur chaque nucléosome. Et enfin troisièmement, que l'établissement de structures globales au sein de la chromatine dépende en grande partie de la concentration locale et de la combinaison des nucléosomes modifiés (voir Turner, 2002).

L'avènement des techniques de séquençage massif après immuno-précipitation de chromatine a permis d'étudier la nature de la chromatine à l'échelle du génome. En 2007 et 2008, un laboratoire du *National Institute of Health* (Barski et al., 2007; Wang et al., 2008) a notamment réalisé une analyse de la répartition de 39 marques d'histones (acétylations, méthylation et variant H2A.Z) , sur l'intégralité du génome, à partir de cellules immunitaires humaines (cellules T CD4+). Cette étude montre que l'acétylation des histones est présente au niveau des gènes actifs, mais sur des régions génétiques différentes, selon l'acide-aminé considéré.

Par exemple, H2AK9ac et H2BK5ac sont présentes autour du site d'initiation de la transcription, tandis que H2BK120ac et H3K4ac sont présentes au niveau du promoteur et dans les régions transcrites. Ce résultat est en adéquation avec le modèle d'association spécifique des HATs avec certaines régions géniques, soutenu par plusieurs observations, par exemple que les HAT interagissent préférentiellement avec l'ARN-polymérase II à des positions données. PCAF et p300 par exemple s'associent à l'ARN-polymérase II respectivement pendant l'élongation et l'initiation transcriptionnelle (Cho et al., 1998). Des expériences de déplétion de GCN5 et de PCAF montrent également une baisse spécifique des marques H4K8ac et H3K14ac (Agalioti et al., 2002).

Wang et al. ont montré l'existence de 3 grands types de profils d'expression génique associés à des marques chromatinienne distinctes (Wang et al., 2008). Le premier profil correspond à des gènes avec un faible taux d'expression, contenant les marques de répression H3K27me3, H3K4me1/2/3, H3K9me1, et le variant H2A.Z. Les deuxième et troisième types de profil d'expression correspondent respectivement à un taux d'expression intermédiaire ou élevé. Un assemblage de 17 marques chromatinienne communes est associé à ces deux profils d'expression, en association avec des marques chromatinienne supplémentaires en fonction du taux d'expression intermédiaire ou élevé (Wang et al., 2008). La présence de cet assemblage particulier de marques chromatinienne sur un grand nombre de gènes (plus de 3000) est en adéquation avec l'idée d'un code histone (voir Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2002). En 2010, Filion et al ont également mené une étude de la chromatine à l'échelle du génome, chez la

drosophile (Filion et al., 2010). Les auteurs ont ainsi étudié la répartition génomique de 53 effecteurs chromatiniens, tels que PCAF (HAT), ASH2 (HMT), SU(VAR) 3-9 (HMT), CTCF, E(Z) ... Cette étude a été réalisée grâce à une technique originale basée sur l'utilisation d'une enzyme méthylant les adénines (*DNA adenine-methyltransferase*, Dam). La technologie utilisée, appelée DamID, consiste à générer des fusions de la Dam avec les protéines d'intérêt (Orian et al., 2009). Les sites de liaison de la protéine d'intérêt subissent ainsi une méthylation locale des adénines. L'avantage de cette technique par rapport à l'immuno-précipitation de chromatine suivie de séquençage massif (ChIPseq) est la possibilité de détecter des interactions très dynamiques, et d'éviter certains artefacts liés à la fixation (Filion et al., 2010).

Cette étude a permis la classification de la chromatine en 5 grands types, définis par des combinaisons spécifiques de protéines (**Figure 8**). Les auteurs ont donné une couleur à chaque classe. Les chromatines BLEUES et VERTES correspondent à des types connus d'hétérochromatine. La chromatine VERTE est ainsi marquée par HP-1, SU(VAR)3-9, et d'autres protéines interagissant avec HP-1. Elle correspond aux régions centromériques des chromosomes. La chromatine BLEUE correspond à la présence de protéines de la famille PcG, telles que PC, E(Z) ou SCE. La chromatine NOIRE correspond au type le plus courant de chromatine réprimée. Elles couvrent 48% du génome, il s'agit donc du type chromatiniens le plus abondant. Elle est relativement pauvre en gène et couvre de larges régions du génome. La majorité des gènes réprimés se trouvent dans la chromatine NOIRE. Enfin les chromatines JAUNE et ROUGE correspondent à deux types d'hétérochromatine. Elles sont caractérisées par la présence de protéines communes, telles que les HDACs RPD3 et SIR2, ou encore l'HMT ASH2 responsable de la méthylation de H3K4. Les gènes présents sur cette chromatine portent les marques de la chromatine active transcriptionnellement : ARN polymérase, H3K4me2, H3K79me3, et des faibles niveaux de H3K9me3 et de H3K27me3. Elles présentent cependant des différences. La chromatine ROUGE par exemple est spécifiquement marquée par des protéines qui lui sont spécifiques, tels que le remodeleur chromatiniens BRM, ou CAF1. LA chromatine JAUNE possède une protéine spécifique avec un chromodomaine lui permettant de se lier à H3K36me3, une marque enrichie au sein de ce type. Les auteurs montrent que les gènes avec un grand champ d'expression sont présents au sein de la chromatine jaune, et moins les gènes avec un profil d'expression plus restreint (Filion et al., 2010). Ce résultat appuie également l'hypothèse du code histone, car les profils de liaison des protéines sur les domaines chromatiniens fonctionnels pourraient être le résultat de combinaisons particulières de marques d'histone.

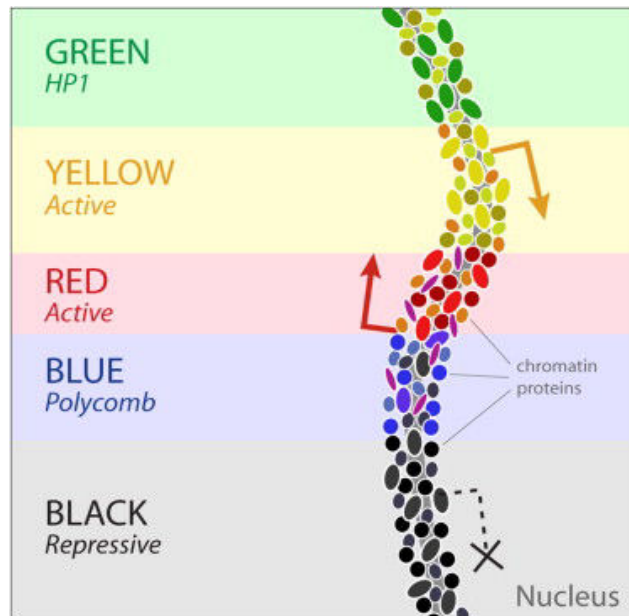


Figure 8 : Les 5 types de chromatine identifiés chez la drosophile.

Filion et al. ont étudié la composition de la chromatine au niveau génomique, et ont identifié 5 types de domaines chromatinien, avec des caractéristiques propres. *Tiré de Filion et al. Cell 2010.*

B) Mitose, Expression Génique et *bookmarking*

NB : on peut traduire *Bookmarking* par Marque-page en français, mais par mesure de simplicité, nous continuerons d'employer le terme anglais (absence de gérondif pour ce mot en français).

Au cours du cycle cellulaire, les mécanismes de transmission épigénétique décrits précédemment doivent faire face à deux événements majeurs, entraînant une modification à l'échelle du génome de la structure de la chromatine. Le premier événement est la réplication de l'intégralité du génome durant la phase S du cycle cellulaire (Probst et al., 2009). Le second événement, est la mitose, au cours de laquelle la chromatine est progressivement compactée, jusqu'à un degré extrême, les chromosomes mitotiques (voir Alberts et al., 2002; Vagnarelli, 2012) (**Figure 10A**). Nous détaillerons dans ce chapitre les changements chromatiniens aboutissant à l'inactivation générale de la transcription pendant la mitose.

1) Généralités sur la mitose et sur le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est régulé par des protéines appelées cyclines, dont l'expression est régulée en fonction du cycle cellulaire (**Figure 9A**). Elles forment un complexe actif avec des protéines kinases appelées cdk (*cyclin-dependent kinase*). L'activation du complexe cycline-cdk par phosphorylation provoque sa translocation nucléaire, et résulte en la phosphorylation activatrice de nombreuses cibles, permettant ainsi l'avancée dans le cycle cellulaire (Alberts et al., 2002). Le couple cdk1/cdc2-cycline B est le régulateur principal des événements se produisant au cours de la mitose, en entraînant la phosphorylation directe ou indirecte d'un ensemble de cibles permettant la mise en place des processus mitotiques successifs (Alberts et al., 2002). La mitose se décompose en 5 phases chez les eucaryotes pluricellulaires : (i) la prophase, au cours de laquelle la compaction de la chromatine démarre, en parallèle de la dissociation des complexes des pores nucléaires et de la lamina (**Figure 9B**); (ii) la prométaphase, pendant laquelle se produit la rupture de l'enveloppe nucléaire sous l'action des microtubules, entraînant la libération de l'ensemble des constituants solubles nucléaires dans le cytosol. Les chromosomes achèvent leur compaction, et sont progressivement liés par les microtubules kinétochoriaux du fuseau mitotique (**Figure 9B**); (iii) la métaphase, durant laquelle les chromosomes mitotiques sont alignés par l'action du fuseau mitotique sur la plaque métaphasique le long de l'équateur de la cellule (**Figure 9B**); (iv) l'anaphase, pendant laquelle les chromatides sœurs sont séparées par le fuseau mitotique vers chaque pôle cellulaire (**Figure 9B**); (v) la télophase, qui est la division cellulaire proprement dite, au cours de laquelle l'enveloppe nucléaire est reformée, ainsi que les pores nucléaires et la lamina (**Figure 9B**). Les génomes séparés sont alors répartis dans deux nouvelles cellules après séparation des membranes plasmiques par l'action d'un « collier » d'actine-myosine présent au niveau de l'équateur de la cellule. Les deux cellules nouvellement créées auront donc un génome $2n$, qui sera répliqué en phase S pour obtenir un génome $4n$ (voir Alberts et al., 2002; Güttinger et al., 2009).

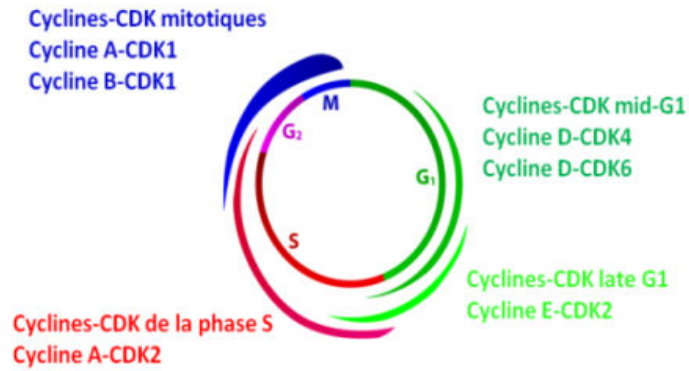
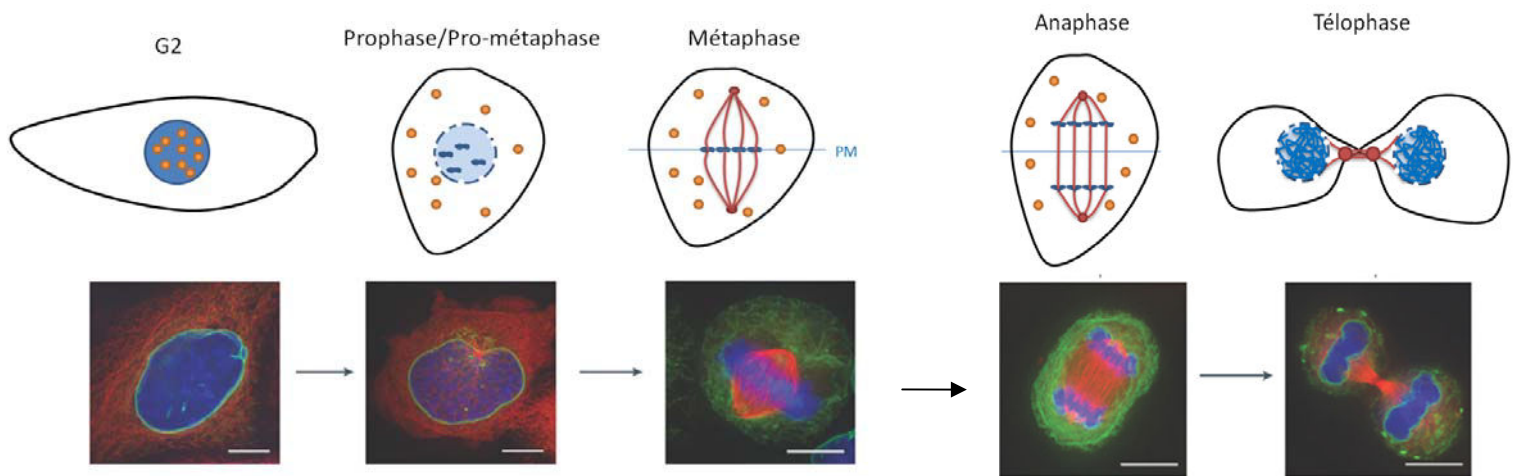
A**B**

Figure 9 : Cycle cellulaire, cyclines et mitose.

A : Les cyclines sont une famille de protéines dont l'expression est régulée en fonction du cycle cellulaire. Elles forment ainsi un complexe avec des CDKs (Cyclin-dependant kinases), permettant la phosphorylation d'un ensemble de cibles et l'avancée dans le cycle cellulaire. *Tiré de studentreader.com*

B : Schéma simplifié des événements se produisant durant la mitose. G₂: noyau interphasique en phase G₂; Prophase/Pro-métaphase : début de la condensation de la chromatine, rupture de l'enveloppe nucléaire (dissociation de la lamina et des complexes de pores nucléaires.), dispersion des constituants du nucléoplasme dans le cytoplasme; Métaphase : alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique (PM); Anaphase : séparation progressive des chromatides soeurs sous l'action des microtubules du fuseau mitotique, Téléphase : fin de la séparation des deux génomes 2n et reformation de l'enveloppe nucléaire, les microtubules forment le corps intermédiaire, à la jonction des deux nouvelles cellules. Panels du bas: marquage en immunofluorescence sur cellules Hela : en bleu ADN, en rouge microtubules, en vert LAB2β, protéine associée à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire *Barres d'échelle 10µm. Figure simplifiée à partir de Güttinger et al, Nat Rev Mol Cell Biol. 2009*

2) Construction du chromosome mitotique et inactivation transcriptionnelle globale.

Lors de la mitose se produit une inactivation générale de la transcription, qui résulte de la conjonction de deux phénomènes : la condensation extrême de la chromatine, et la rupture de l'enveloppe nucléaire, qui entraîne la dilution rapide des constituants solubles du noyau, dont la plupart des régulateurs de l'activité transcriptionnelle (Gottesfeld and Forbes, 1997).

a) L'échafaudage chromosomique.

La structure des chromosomes mitotiques obéit à une organisation stricte permettant l'établissement d'une symétrie bilatérale des chromatides sœurs (voir Vagnarelli, 2012). Le déclenchement de la compaction mitotique se produit durant la prophase. L'activation et la translocation nucléaire du complexe CyclineB1-cdk1 est suivie par les premiers signes visibles de condensation chromosomique (Gavet and Pines, 2010a, 2010b; Pagliuca et al., 2011). La condensation progressive de la chromatine entraîne alors l'apparition de fibres de 200 à 300 nm de diamètre. A la fin de la prophase, ce diamètre aura encore doublé (Kireeva et al., 2004). La composition de la chromatine subit un changement global au cours de la mitose. Un ensemble de plus de 4000 protéines non-histones joue un rôle crucial dans la construction des chromosomes mitotiques (Chen et al., 2005; Ohta et al., 2010). Parmi ces protéines non-histones, un ensemble constitue l'échafaudage chromosomique, qui représente 40% des protéines associées aux chromosomes mitotiques (Ohta et al., 2010). Après extraction des histones et digestion totale de l'ADN, elles représentent la fraction insoluble des protéines (Adolph et al., 1977; Adolphs et al., 1977). Les protéines de l'échafaudage chromosomique sont liées avec une stabilité plus ou moins grande à la chromatine mitotique. Cette dualité de comportement correspond à la nature des chromosomes mitotiques, présentant un caractère dynamique associé à une rigidité structurelle (voir Vagnarelli, 2012). Parmi les protéines constitutives de l'échafaudage chromosomique, on peut citer les condensines, la topoisomérase 2, la cohésine et KIF4A.

La phosphorylation des condensines par Cdk1-CyclineB1 est un événement précoce de la prophase, et de la compaction de la chromatine mitotique (Abe et al., 2011; Hagstrom et al., 2002; Hudson et al., 2003). Les condensines sont des complexes pentamériques, constitués de domaines SMC (*Structural Maintenance of the Chromosome*) identiques (SMC2 et 4); et de domaines non-SMC différents (CAP H, G et D pour la condensine I; CAPH, H2, G2, D3 pour la condensine II) (voir Hirano, 2005a, 2005b et **Figure 10D**). La condensine II a une localisation nucléaire au moment de la prophase, tandis que la condensine I va se lier aux chromosomes mitotiques seulement après rupture de l'enveloppe nucléaire. Les condensines occupent une position axiale sur chaque chromosome (Nishino et al., 2012) (**Figure 10B et C**). Les modalités de l'établissement de la compaction de la chromatine par les condensines demeurent encore

mal connues. La perte de fonction des condensines I et II entraîne une altération, variable selon les espèces, de la formation des chromosomes mitotiques. De façon globale, une perte de 30% de la compaction est observée, avec une perte d'organisation interne, par exemple de symétrie entre chromatides sœurs (Hudson et al., 2003).

La topoisomérase II alpha est localisée de façon alternée avec les condensines sur les chromosomes mitotiques (**Figure 10B**), avec une localisation très dynamique (Earnshaw and Heck, 1985; Maeshima and Laemmli, 2003; Saitoh and Laemmli, 1994; Tavormina et al., 2002). Plusieurs modèles d'inactivation de la topoisomérase II alpha résultent en une altération de la condensation (Holm et al., 1985; Johnson et al., 2009; Spence et al., 2007; Uemura et al., 1987). Le phénotype est cependant différent de celui de l'inactivation des *condensines I* et *II* : les chromosomes sont plus allongés, mais sont alignés normalement sur la plaque métaphasique, et leur intégrité structurale est normale (Baxter and Aragón, 2012; Chang et al., 2003).

La cohésine présente une structure très proche de celle des condensines. Il s'agit d'une protéine pentamérique, constituée de trois sous-unités SMC (1, 2 et 3) et de deux sous-unités non-SMC, SA1 et SA2 (voir (Vagnarelli, 2012) et **Figure 10D**). La cohésine a un rôle essentiel dans la cohésion entre chromatides sœurs à partir de la fin de la réplication jusqu'à l'anaphase (voir Nasmyth, 2011; Shintomi and Hirano, 2010). La Cohésine a également des rôles variés dépassant sa fonction mitotique. Elle est notamment impliquée dans la réparation de l'ADN à partir de la phase S, et il a récemment été montré qu'elle intervenait également dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes, en permettant des interactions à longue distance entre des éléments régulateurs et leurs promoteurs cibles (Merkenschlager and Odom, 2013).

KIF4A, ou Chromokinésine, est une protéine motrice associée aux microtubules (Aizawa et al., 1992; Lee et al., 2001; Oh et al., 2000). Pendant la mitose, KIF4A est associé aux chromosomes le long de l'axe des chromosomes, d'une manière similaire aux condensines (Mazumdar et al., 2004) (**Figure 10B**). Le recrutement mitotique de KIF4A est lié à un rôle non-catalytique mal caractérisé de la phosphatase PP2A (Takemoto et al., 2009). La déplétion de KIF4A affecte la distribution des condensines sur les chromosomes mitotiques, et *vice-et-versa*. KIF4A joue plusieurs rôles pendant la mitose, notamment dans la condensation chromosomique, même si son action n'est pas très bien caractérisée.

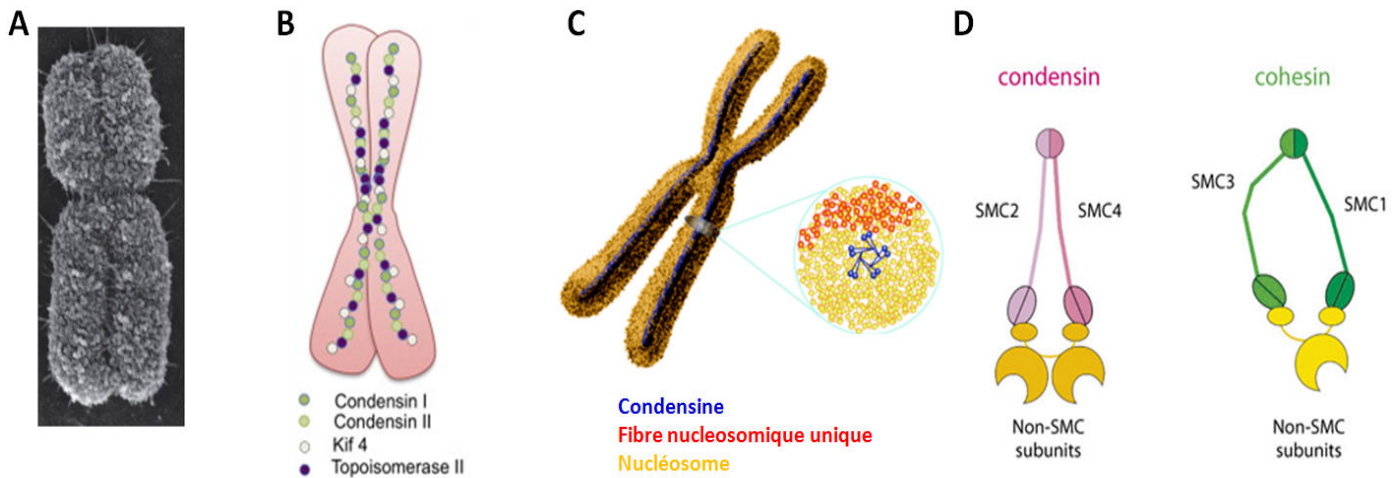


Figure 10 : Chromosomes mitotiques et échafaudage chromosomique

A : Chromosome mitotique ultra-compact vu en microscopie électronique à balayage. *Tiré de Molecular Biology of the Cell.*

B : Répartition des constituants de l'échafaudage chromosomique sur un chromosome pendant la mitose. *(Tiré de Vagnarelli et al. Chromosome Biology, 2012)*

C : Localisation des sous-unités de Condensine le long de l'axe des chromosomes mitotique. *Tiré de Nishino et al., EMBO 2012.*

D : Structure comparative des Condensines et de la cohésine. *Tiré de Vagnarelli et al. Chromosome Biology, 2012.*

b) Marques d'histones et dispersion des régulateurs transcriptionnels.

Des modifications dynamiques des marques et des variants d'histones interviennent également au cours de la condensation mitotique de la chromatine, permettant le recrutement ou l'exclusion de nombreuses protéines de la chromatine (voir Wang and Higgins, 2013). Cela entraîne un changement global dans la structure et la composition de la chromatine, aboutissant à la condensation extrême. De façon générale, la phosphorylation des résidus d'histone augmente, tandis que l'acétylation et l'ubiquitinylation et l'acétylation diminue. La méthylation des lysines est en revanche globalement stable (**Figure 11E**).

La marque d'histone mitotique la plus étudiée est la phosphorylation de la H3S10 par la protéine kinase Aurora B, un événement corrélant avec la mitose dans tous les organismes (Hendzel et al., 1997). H3S10ph est notamment indispensable à l'hypercondensation de chromosomes pendant l'anaphase, chez la levure *S.cerevisiae*, (Neurohr et al., 2011) et chez *Tetrahymena* (Wei et al., 1999).

Au moment de l'entrée en mitose, certaines modifications se comportent comme des contremarques, contrebalançant l'effet de marques présentes, et entraînant le départ de protéines de la chromatine (**Figure 11 A et B**). Par exemple, la présence de H3S10ph affaiblit la liaison de la protéine HP-1 à la marque H3K9me2/me3, ce qui entraîne la perte de son interaction avec la chromatine mitotique. L'inhibition de Aurora B résulte en la rétention mitotique de HP-1 (Hirota et al., 2005). Le rôle de l'exclusion de HP-1 de la chromatine mitotique n'est pas très bien compris, mais une hypothèse est que ce mécanisme faciliterait la condensation de la chromatine mitotique. H3S10ph provoque également la dissociation d'autres facteurs, comme SRp20 et ASF/SF2 (Loomis et al., 2009). D'autres marques se comportent comme des contremarques, à l'image de H3S28ph vis-à-vis de H3K27me3, provoquant l'exclusion mitotique de PRC1 et PRC2 (Fonseca et al., 2012; Lau and Cheung, 2011), ou encore de H3T3ph vis-à-vis des modifications de H3K4, provoquant la dissociation de TAF3 (du complexe TFIID) notamment (Chignola et al., 2009; Couture et al., 2006; Flanagan et al., 2005; Garske et al., 2010). Il faut cependant noter que les contremarques sont nécessaires mais pas suffisantes à la dissociation des protéines des marques ciblées. Ainsi, *in vitro*, les contremarques H3S10Ph et H3S28Ph ne provoquent pas la dissociation de HP-1 et de PRC1 de peptides contenant H3K9me3 ou H3K27me3 respectivement (Mateescu et al., 2004; Vermeulen et al., 2010).

Certaines marques, au contraire, permettent la définition de points de repère sur la chromatine mitotique, permettant le recrutement de protéines. En plus de H3S10, d'autres résidus subissent une phosphorylation spécifique de la mitose. Au niveau du centromère, par exemple, H2AT120ph et H3T3ph, déposées respectivement par les kinases Bub1 et Haspin, permettent de l'accrochage du complexe chromosomique *passenger* (CPC), constituée de la protéine kinase Aurora B, et de facteurs régulant son activité, tels que la survivine, la boréoline et INCENP (voir Wang and Higgins, 2013). L'organisation du centromère en territoires distincts de marques d'histones est également nécessaire à l'accrochage correct des microtubules kinétochoriaux (**Figure 11C**). On peut de plus citer la marque H4K20me1, établie par PRSet7, qui constitue un site d'interaction potentielle avec la condensine II, par le biais des sous-unités CAPD3 et CAPG2 (Liu et al., 2010) (**FIGURE 11D**). Wilkins *et al* ont également démontré récemment l'importance du statut de l'acétylation de H4K16 chez la levure sur la condensation (Wilkins et al., 2014). Des mutations de H3K4 entraînent en effet un défaut de condensation des chromosomes mitotiques (Johnson et al., 1990; Park and Szostak, 1990). Le mécanisme décrit implique le recrutement de l'Histone DéACetylase (HDAC) Hst2p, qui a notamment pour cible H4K16. La perte de l'acétylation de H4K16 entraîne ainsi la création d'un contact entre la queue N terminale de l'histone H4 et l'interface négativement chargée entre les histones H2A et H2B à la surface du nucléosome voisin (Wilkins et al., 2014). Cette interaction est critique pour la formation de structures chromatiniennes d'ordre supérieur, et donc pour la condensation du chromosome mitotique (Gordon et al., 2005; Robinson et al., 2008).

c) Inactivation transcriptionnelle globale

La condensation extrême de la chromatine rend probablement inaccessible le brin d'ADN pour les activateurs et la machinerie transcriptionnelle, qui sont, de plus, dispersés dans le cytoplasme après rupture de l'enveloppe nucléaire (voir Kadauke and Blobel, 2013). Au cours de la condensation, la rétention de l'histone H2A.Z sur la chromatine mitotique, sa relocalisation au niveau du site de démarrage de la transcription permet la compaction du promoteur, et possiblement le déplacement de facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle (Kelly et al., 2010).

Ainsi, pendant la mitose, la quasi-intégralité des régulateurs de l'expression génique sont dissociés (voir (Egli et al., 2008)): la machinerie basale de transcription, l'ARN polymérase II, la plupart des facteurs de transcription généraux et spécifiques (par exemple CMYC, OCT1, MYOD, HNF4alpha...) ainsi que les co-activateurs transcriptionnels (EED, FOG1...), les complexes de remodelage de la chromatine (CAF1 par exemple), et les *epigenetic writers* et les *epigenetic erasers* (les HDACs, CBP, PCAF par exemple) (**Figure 13 Tableau 1**).

Une étude récente suggère en complément l'existence d'un mécanisme actif de répression de la transcription pendant la mitose. Spencer et al. ont étudié l'expression de gènes du virus HSV-1 dans des cellules infectées. L'ADN viral est incorporé au génome, demeure pauvre en nucléosome et ne subit pas de compaction au cours de la mitose. Les auteurs proposent donc que les gènes viraux soient accessibles à l'ARN polymérase 2 pendant la mitose, mais ne sont pas transcrits à cause de la répression par un mécanisme actif (Spencer et al., 2000).

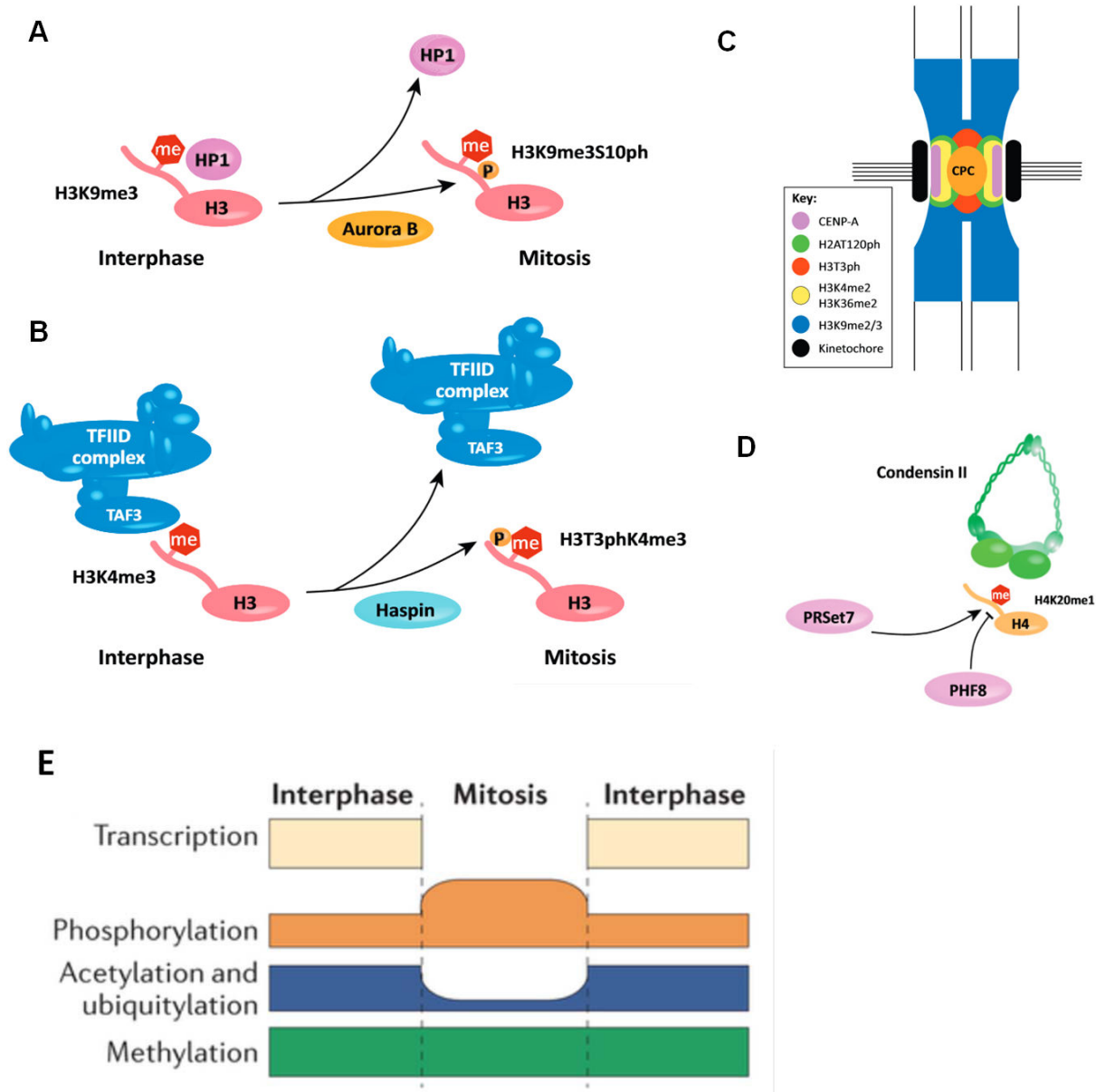


Figure 11 : Modifications des marques d'histones pendant la mitose.

A : H3S10ph, établie par la kinase Aurora B, se comporte comme une contre-marque vis-à-vis de H3K9me3, entraînant la dissociation d'une partie des protéines HP-1.

B : H3T3ph a le même effet vis-à-vis de H3K4me3, provoquant la dissociation partielle des complexes TFIID.

C : Les centromères des chromosomes mitotiques sont organisés en territoires de marques d'histones, permettant l'accrochage correct des microtubules et la séparation correcte des chromatides sœurs.

D : La marque H4K20me1 constitue un site de reconnaissance pour la Condensine II.

E : La transcription est inactivée pendant la mitose. De façon globale, il y a une augmentation de la phosphorylation des histones, une diminution de l'acétylation et d'ubiquitylation des histones, et un maintien de la méthylation des histones.

A-D : Tiré de Wang and Higgins, *Trend Cell Biol* 2013; E : Tiré de Steffen and Ringrose, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014.

3) Le Bookmarking et la ré-expression des gènes après la mitose.

a) *Hsp70* et rétention mitotique du facteur de transcription HSF2.

La dissociation des régulateurs transcriptionnels et chromatinien, associée au changement global de la structure de la chromatine pendant la mitose entraîne une inactivation de l'expression génique pendant la mitose. Cela soulève la question du maintien du programme transcriptionnel spécifique de la cellule à travers les divisions cellulaires, autrement dit de la mémoire épigénétique des états transcriptionnels. Il s'agit d'un enjeu important, car le programme transcriptionnel d'une cellule lui confère son identité au sein d'un tissu, définie comme la somme de ses constituants propres (protéines, ARN, lipides ...). Un des mécanismes identifiés permettant la réactivation spécifique du programme transcriptionnel après la mitose est le *bookmarking* (John and Workman, 1998; Kadauke and Blobel, 2013; Sarge and Park-Sarge, 2005; Zaidi et al., 2014). Une des premières observations de ce mécanisme a été réalisée en 1997, Michelotti et al. ont utilisé la méthode de *footprinting* au permanganate de potassium sur le promoteur de *hsp70*, gène impliqué dans la réponse au stress thermique, et de *c-myc*, un gène impliqué dans la prolifération cellulaire (Michelotti et al., 1997). Les auteurs ont démontré qu'au niveau du promoteur de ces gènes, au moment de la mitose, se trouve un *footprint*, correspondant à un état de condensation local différent du reste de la chromatine mitotique (Michelotti et al., 1997). L'existence de ce microenvironnement est liée à l'activité transcriptionnelle du locus, puisque la même expérience dans des cellules n'exprimant pas le gène *cmyc* n'a pas permis de retrouver un *footprint* pendant la mitose. En revanche, dans cette lignée cellulaire, *Hsp70* est actif transcriptionnellement, et le *footprint* mitotique est bien présent au niveau de son promoteur (Michelotti et al., 1997). Il est à noter que les gènes *Hsp70* et *c-myc* ont la particularité d'avoir une cinétique de ré-expression rapide après la mitose. La marque épigénétique permettant la conservation d'un micro-environnement décondensé et accessible à différents facteurs au sein de la chromatine mitotique, a été qualifiée de *Bookmark*, suivant l'idée d'un marque-page au sein de la chromatine mitotique fermée. Le *Bookmark* permet une ré-activation transcriptionnelle post-mitotique rapide (**Figure 12A**). Une étude postérieure a montré que le *Bookmarking* du gène *hsp70* était liée au maintien du facteur de transcription HSF2 à ce locus pendant la mitose (Xing et al., 2005). HSF2 permet ainsi le recrutement de la phosphatase PP2A au locus *hsp70* durant la mitose. De façon intéressante, les phosphatases PP1 et PP2A sont des régulateurs négatifs de la compaction chromosomique. En effet, il est possible d'induire une condensation des chromosomes proche de celle de la mitose dans des cellules en interphase (non-quiescentes). Ce processus artificiel porte le nom de Condensation Prématuration de Chromosomes (CPC) (Gotoh and Durante, 2006; Johnson and Rao, 1970). La CPC peut-être notamment être déclenchée par l'inhibition des Phosphatases 1 et 2A (PP1 et PP2A) (voir Vagnarelli, 2012). Cela suggère donc que PP1 et PP2A permettent le maintien de la chromatine dans un état non-condensé au cours de l'interphase (Llères et al.,

2009). Xing et al ont ainsi proposé un mécanisme de *bookmarking*, mis en place par l'inhibition des condensines par PP2A qui résulte en une inactivation locale de la condensation mitotique. Cela créerait ainsi un microenvironnement accessible (**Figure 12B**), permettant la ré-expression post-mitotique rapide du gène hsp70 (Xing et al., 2005).

b) D'autres facteurs de transcription sont capables de lier la chromatine mitotique.

Nous avons précisé dans un chapitre précédent que l'étude de la localisation mitotique des facteurs de transcription montre que leur comportement le plus fréquent pendant la mitose est la dispersion dans le cytoplasme suite à la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'exclusion de la chromatine mitotique (**Figure 13 Tableau 1**) (voir Kadauke and Blobel, 2013). Plusieurs études ont montré que d'autres facteurs de transcription, à la manière de HSF2, possèdent la capacité particulière de pouvoir rester associés à la chromatine mitotique (**Figure 13 Tableau 2**). Au cours des dernières années, RUNX2 (Ali et al., 2010; Young et al., 2007a, 2007b), FOXA1 (**Figure 14A**) (Caravaca et al., 2013), GATA1 (**Figure 14B**) (Kadauke et al., 2012), ou encore CEBPalpha et beta (Caravaca et al., 2013; Martínez-Balbás et al., 1995; Tang and Lane, 1999) ont ainsi été caractérisés comme localisés sur la chromatine pendant la mitose. D'autres facteurs de régulation transcriptionnelle sont retenus sur la chromatine mitotique (**Figure 13 Tableau 2**), notamment des membres de la machinerie basale de transcription, tels que la TATA Binding Protein (Chen et al., 2002; Christova and Oelgeschläger, 2002; Kieffer-Kwon et al., 2004; Segil et al., 1996; Xing et al., 2008), BRF1 (qui appartient au complexe du facteur général de transcription TFIIIB) ou encore TFIIIC2 (Fairley et al., 2003). Certains co-régulateurs transcriptionnels ont également été identifiés sur la chromatine mitotique, tels que Menin, BMI1 et RBP5 (Blobel et al., 2009; Mishra et al., 2009).

Des membres des familles Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) ont également la propriété de rester associés à la chromatine mitotique après rupture de l'enveloppe nucléaire. En ce qui concerne PcG, des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont montré qu'une faible fraction du facteur Pc, appartenant au complexe PRC1, était retenue sur la chromatine mitotique, avec un temps de résidence supérieur à celui constaté sur la chromatine interphasique (Fonseca et al., 2012). Des études par ChIPseq ont montré qu'un autre membre de PRC1, Psc, était retenu sur la chromatine mitotique, sur une partie seulement des sites interphasiques, en particulier dans des régions flankantes des gènes Hox (Follmer et al., 2012). Beaucoup de membres de la famille TrxG sont également retenus sur la chromatine pendant la mitose, par exemple des *epigenetic writers* comme les HMTs ASH1, ASH2L, et MLL (Blobel et al., 2009; Steffen et al., 2013), des *epigenetic readers* comme les protéines à bromodomaine Brpf1 (Laue et al., 2008) et BRD4, qui possède deux bromodomains lui permettant de lier les queues d'histones acétylées (Dey et al., 2009; Yang et al., 2008; Zhao et al., 2011) (**Figure 13 Tableau 2**).

Nous avons précisé précédemment que les facteurs de la famille PcG entraînaient une répression de l'activité transcriptionnelle, tandis que les facteurs de la famille TrxG régulent positivement l'expression des gènes. On peut émettre l'hypothèse que l'interaction des complexes PcG et TrxG avec la chromatine mitotique résulte dans des effets différents. Les PcG pourraient être nécessaires au maintien d'états transcriptionnels silencieux à travers la mitose, tandis que les PcG seraient impliqués dans la réactivation post-mitotique de l'expression des gènes.

Un rôle de la cohésine dans la mémoire épigénétique des états transcriptionnels a été récemment suggéré par une étude récente. Yan et al. ont analysé la localisation génomique de la liaison de plus de cent facteurs de transcriptions par séquençage massif après immuno-précipitation de chromatine (ChIPseq) (Yan et al., 2013). Ils ont montré que les facteurs de transcription se lient au génome de façon regroupée au sein d'agrégats, ou *clusters*. Ainsi, les trois-quarts des pics de liaison identifiés sont regroupés dans moins de 1% du génome, et sont associés à l'expression des gènes. Les clusters de facteurs de transcription sont associés à la présence de la Cohésine, que nous avons présenté précédemment. Les auteurs montrent que la cohésine facilite la liaison des facteurs de transcription. En effet, l'inactivation de la cohésine par ARN-interférence réduit l'accessibilité de la chromatine autour des sites de fixation des facteurs de transcription, et à une diminution de leur liaison au sein des *clusters* qui résulte en une baisse d'expression de leurs gènes cibles. Il apparaît que la localisation de la cohésine est stable le long du cycle cellulaire, et reste notamment associée aux *clusters* durant la mitose. La cohésine pourrait ainsi constituer une marque épigénétique permettant la ré-expression post-mitotique des gènes du programme transcriptionnel spécifique de la cellule.

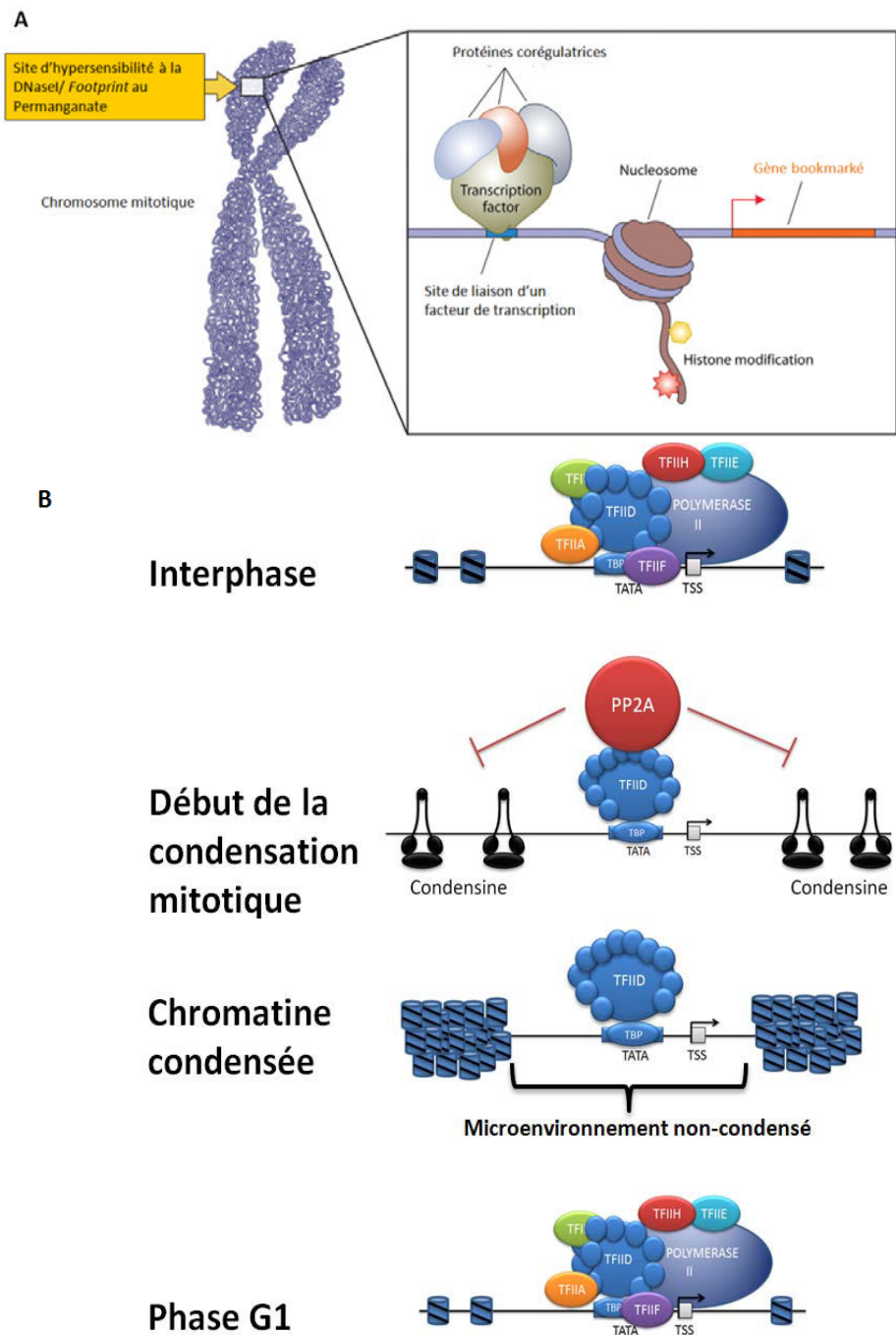


Figure 12 : *Bookmarking* et modèle du gène *hsp70*.

A : *Footprint* au permanganate de potassium et zone d'hypersensibilité à la Dnase I : indices d'un microenvironnement particulier sur la chromatine mitotique ultra-condensée. Au niveau de ces microenvironnement : rétention facteurs de transcription et corégulateurs transcriptionnels responsables du *Bookmarking* d'un gène Tiré de Zaidi et al Mol Cell Biol. 2010.

B : Mécanisme de *Bookmarking* décrit au niveau du promoteur du gène *hsp70* : transcription active du gène en interphase; TFIID reste accroché au début de la mitose et interagit avec PP2A, qui inactive localement la condensine pour prévenir la compaction, ce qui résulte en un microenvironnement non condensé au sein de la chromatine. Au début de la phase G1, le reste de la machinerie transcriptionnelle est ré-assemblé et l'ensemble de la région est décompacté. Tiré de Sarge et Park-Sarge, Cell cycle 2009

b) D'autres facteurs de transcription sont capables de lier la chromatine mitotique.

Nous avons précisé dans un chapitre précédent que l'étude de la localisation mitotique des facteurs de transcription montre que leur comportement le plus fréquent pendant la mitose est la dispersion dans le cytoplasme suite à la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'exclusion de la chromatine mitotique (**Figure 13 Tableau 1**) (voir Kadauke and Blobel, 2013). Plusieurs études ont montré que d'autres facteurs de transcription, à la manière de HSF2, possèdent la capacité particulière de pouvoir rester associés à la chromatine mitotique (**Figure 13 Tableau 2**). Au cours des dernières années, RUNX2 (Ali et al., 2010; Young et al., 2007a, 2007b), FOXA1 (**Figure 14A**) (Caravaca et al., 2013), GATA1 (**Figure 14B**) (Kadauke et al., 2012), ou encore CEBPalpha et beta (Caravaca et al., 2013; Martínez-Balbás et al., 1995; Tang and Lane, 1999) ont ainsi été caractérisés comme localisés sur la chromatine pendant la mitose. D'autres facteurs de régulation transcriptionnelle sont retenus sur la chromatine mitotique (**Figure 13 Tableau 2**), notamment des membres de la machinerie basale de transcription, tels que la TATA Binding Protein (Chen et al., 2002; Christova and Oelgeschläger, 2002; Kieffer-Kwon et al., 2004; Segil et al., 1996; Xing et al., 2008), BRF1 (qui appartient au complexe du facteur général de transcription TFIIIB) ou encore TFIIIC2 (Fairley et al., 2003). Certains co-régulateurs transcriptionnels ont également été identifiés sur la chromatine mitotique, tels que Menin, BMI1 et RBP5 (Blobel et al., 2009; Mishra et al., 2009).

Des membres des familles Polycomb (PcG) et Trithorax (TrxG) ont également la propriété de rester associés à la chromatine mitotique après rupture de l'enveloppe nucléaire. En ce qui concerne PcG, des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont montré qu'une faible fraction du facteur Pc, appartenant au complexe PRC1, était retenue sur la chromatine mitotique, avec un temps de résidence supérieur à celui constaté sur la chromatine interphasique (Fonseca et al., 2012). Des études par ChIPseq ont montré qu'un autre membre de PRC1, Psc, était retenu sur la chromatine mitotique, sur une partie seulement des sites interphasiques, en particulier dans des régions flankantes des gènes Hox (Follmer et al., 2012). Beaucoup de membres de la famille TrxG sont également retenus sur la chromatine pendant la mitose, par exemple des *epigenetic writers* comme les HMTs ASH1, ASH2L, et MLL (Blobel et al., 2009; Steffen et al., 2013), des *epigenetic readers* comme les protéines à bromodomaine Brpf1 (Laue et al., 2008) et BRD4, qui possède deux bromodomains lui permettant de lier les queues d'histones acétylées (Dey et al., 2009; Yang et al., 2008; Zhao et al., 2011) (**Figure 13 Tableau 2**). Nous avons précisé précédemment que les facteurs de la famille PcG entraînaient une répression de l'activité transcriptionnelle, tandis que les facteurs de la famille TrxG régulent positivement l'expression des gènes. On peut émettre l'hypothèse que l'interaction des complexes PcG et TrxG avec la chromatine mitotique résulte dans des effets différents. Les PcG pourraient être nécessaires au maintien d'états transcriptionnels silencieux à travers la mitose,

tandis que les PcG seraient impliqués dans la réactivation post-mitotique de l'expression des gènes.

Un rôle de la cohésine dans la mémoire épigénétique des états transcriptionnels a été récemment suggéré par une étude récente. Yan et al. ont analysé la localisation génomique de la liaison de plus de cent facteurs de transcriptions par séquençage massif après immuno-précipitation de chromatine (ChIPseq) (Yan et al., 2013). Ils ont montré que les facteurs de transcription se lient au génome de façon regroupée au sein d'agrégats, ou *clusters*. Ainsi, les trois-quarts des pics de liaison identifiés sont regroupés dans moins de 1% du génome, et sont associés à l'expression des gènes. Les clusters de facteurs de transcription sont associés à la présence de la Cohésine, que nous avons présenté précédemment. Les auteurs montrent que la cohésine facilite la liaison des facteurs de transcription. En effet, l'inactivation de la cohésine par ARN-interférence réduit l'accessibilité de la chromatine autour des sites de fixation des facteurs de transcription, et à une diminution de leur liaison au sein des *clusters* qui résulte en une baisse d'expression de leurs gènes cibles. Il apparaît que la localisation de la cohésine est stable le long du cycle cellulaire, et reste notamment associée aux *clusters* durant la mitose. La cohésine pourrait ainsi constituer une marque épigénétique permettant la ré-expression post-mitotique des gènes du programme transcriptionnel spécifique de la cellule.

En résumé, si la majorité des facteurs de la régulation transcriptionnelle sont dispersés dans le cytoplasme pendant la mitose, on peut donc constater qu'un certain nombre d'entre eux sont retenus sur la chromatine mitotique. L'ensemble de ces facteurs présents sur la chromatine mitotique joue un rôle potentiel dans la mise en place du *Bookmarking*.

TABLEAU 1 : Facteurs ayant tendance à se dissocier de la chromatine mitotique

Machinerie transcriptionnelle basale	Facteurs de transcription séquence-spécifiques	Cofacteurs transcriptionnels	Remodeleurs de chromatine	Modificateurs post-traductionnels des histones	Protéines se liant aux MPTs d'histones	Autres protéines chromatiniennes
ARN polymérase I ARN polymérase III TFIIA TFIIB TAF1, TAF3, TAF4, TAF5 ¶, TAF12 TFII E p56 TFIIF TFIIH XPD TFIIH XPE TFIIB ¶ TRF2 DRIP150, DRIP130 CDK9 Cyclin-T1 FACT	MYC MYB FOS OCT1 OCT2 MyoD1 ¶ HSF1 E2F1 BCL6 ETS1 SP1 SP3 IKZF1 ¶ PAX3 PAX5 HNF4A TBX2 ESR1 TAL1 CTCF ¶	EED PHC1 MBLR FOG1 LMO2 LDB1	BRM BRG1 SNF2 CAF-1 HIRA	CBP p300 ¶ PCAF MYST1 ACTR ELP3 HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC7 SETD1A MLL2 ASH1L DOT1L KDM1A RING1B	HP1alpha ¶ HP1beta ¶ HP1gamma ¶	ORC1 SC-35 Cohésine (SMC3, SCC1)

TABLEAU 2 : Facteurs ayant tendance à rester associés à la chromatine mitotique

Machinerie transcriptionnelle basale	Facteurs de transcription séquence-spécifiques	Cofacteurs transcriptionnels	Remodeleurs de chromatine	Modificateurs post-traductionnels des histones	Protéines se liant aux MPTs d'histones	Autres protéines chromatiniennes
TBP ¶ TFIIB TFII C2	SRF AP-2 HSF2 NFE2 RUNX2 HNF1B FOXI1 FOXA1 GATA1 ¶ GATA4 C/EBPα ¶ C/EBPβ UBF-1	Menin RBBP5 BMI1 ¶ TLE1 ¶ HMGB1 ¶		MLL ¶ ASH2L RING1 SUV39H1 ¶	L3MBTL1 BRD2 BRD4 ¶ CBX8 (Polycomb)¶ Pc2	

Figure 13 : Comportements mitotiques de différents facteurs

Les facteurs du tableau 1, en rouge, ont tendance à se dissocier des chromosomes au cours de la mitose.

Au contraire, les facteurs du tableau 2, en vert, sont plutôt retenus sur la chromatine mitotique.

N.B. : Le symbole ¶ indique la présence de rapports conflictuels sur la protéine en question.

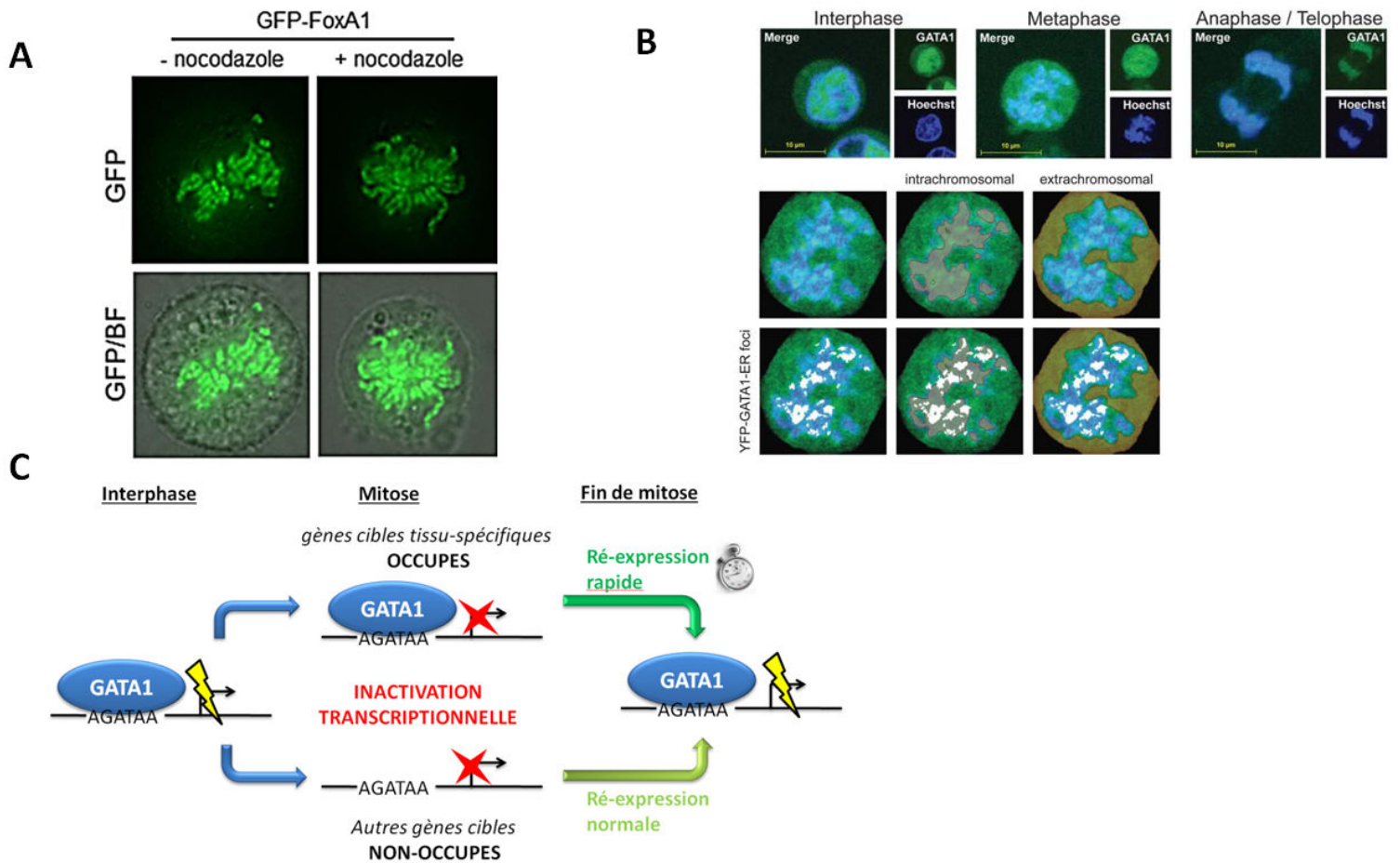


Figure 14 : Rétention de FOXA1 et GATA1 sur la chromatine mitotique

A : Localisation par vidéomicroscopie sur cellules vivantes du facteur FoxA1 en fusion avec la GFP pendant la mitose. Le facteur de transcription est localisé sur la chromatine mitotique en présence et en absence de Nocodazole, suggérant son implication dans un mécanisme de Bookmarking. *Tiré de Caravaca et al. Genes Dev. 2013.*

B : Images en microscopie confocale de la liaison partielle de GATA1 avec la chromatine mitotique. Le panel du bas est une analyse montrant la présence d'YFP-GATA1 dans le territoire intrachromosomique (zones blanches). *Tiré de Kadauke et al. Cell 2012.*

C : Mécanisme de Bookmarking induit par GATA1. Certains sites sont liés en interphase uniquement, et ne bénéficient pas du mécanisme de Bookmarking. Leur ré-activation post-mitotique est lente. Au contraire, les sites liés en interphase et en mitose sont bookmarkés par GATA1 pendant la mitose et sont ainsi ré-exprimés de façon rapide après la mitose. Un ChIPseq a montré que les gènes bookmarkés étaient seulement une partie des cibles de GATA1, en particulier impliqués dans la régulation de la tissu-spécificité. *Tiré de Kadauke et al. Cell 2012.* Ce schéma s'applique également au facteur de transcription FoxA1.

c) Nature des gènes concernés par le Bookmarking.

Des études récentes en ChIPseq sur les facteurs de transcription FOXA1 et GATA1 pendant la mitose et l'interphase, ont permis d'appréhender la nature des sites liés par des facteurs de transcription pendant la mitose. Pour GATA1 comme pour FOXA1, trois types de sites liés par le facteur de transcription ont été identifiés : des sites liés en interphase et en mitose, des sites liés en interphase seulement, et des sites liés en mitose seulement. L'analyse du ChIPseq mitotique montre que le *Bookmarking* concerne principalement des gènes impliqués dans les voies de régulation de processus essentiels pour la cellule, tels que la croissance, la prolifération ou encore la différenciation, et dans des fonctions tissus spécifiques (Caravaca et al., 2013; Kadauke et al., 2012). Ainsi, les sites liés par FOXA1 pendant la mitose concernent des gènes impliqués dans la fonction hépatique (*Hnf4a, Rarb, Klf4, FoxA1* lui même...), et les loci liés par GATA1 pendant la mitose des gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique, dont certains facteurs de transcription (*Gata1* lui même, *Gata2, Klf1, Runx1...*) (Caravaca et al., 2013; Kadauke et al., 2012). De façon intéressante, Caravaca et al. ont montré par FRAP que FOXA1 avait une mobilité accrue sur la chromatine mitotique, en comparaison avec la chromatine interphasique. De plus, le bruit de fond associé à la liaison de FOXA1 à la chromatine augmente dans la condition de ChIP mitotique. Pour comprendre le lien entre ces phénomènes, les auteurs ont étudié la liaison d'un mutant de FOXA1, capable de lier l'ADN non-spécifique normalement, mais ayant perdu la capacité de reconnaissance spécifique du motif consensus. Leurs résultats montrent que le mutant est normalement retenu sur la chromatine mitotique. Le modèle proposé est que FOXA1 serait capable de lier la chromatine mitotique selon deux modalités : une liaison séquence-spécifique sur certains gènes cibles, et une liaison non site-spécifique globale avec la chromatine. Les deux types de liaison sont nécessaires à la cinétique correcte de réexpression post-mitotique des gènes cibles de FOXA1. Dans ce modèle, la décoration non-spécifique des chromosomes par FOXA1 constituerait un réservoir du facteur de transcription permettant la réexpression rapide de certains gènes cibles après la mitose (Caravaca et al., 2013; Kadauke et al., 2012).

d) Caractéristiques de la chromatine mitotique liée par un facteur de Bookmarking, et conséquences de la perte de fonction de bookmarking.

Il ne semble pas y avoir de motifs d'ADN particuliers associés à la rétention mitotique des facteurs de transcription, bien qu'il ait été montré que RUNX2 soit présent à haute concentration sur des séquences répétées des gènes d'ARNr (Young et al., 2007b). En revanche, comme le suggère la décondensation locale de la chromatine dans le modèle du gène *hsp70* (Xing et al., 2005), un certain nombre de modifications post-traductionnelles et de variants d'histones pourraient être associés à la présence mitotique des facteurs de transcription, bien qu'il n'ait pas encore été possible de caractériser une marque épigénétique claire. Les sites liés

par les facteurs de transcription en mitose présentent dans la plupart des cas étudiés un microenvironnement particulier au sein de la chromatine mitotique (Kadauke et al., 2012). Par exemple, FOXA1 se lie préférentiellement à des sites hypersensibles à la DNase I, contenant son motif consensus et présentant une forte concentration en nucléosomes (Caravaca et al., 2013). Les marques associées à la présence de GATA1 sur la chromatine mitotique ont été caractérisées plus en détail. Il s'avère qu'au niveau des sites de liés par GATA1 en interphase et pendant la mitose se trouvent des marques de chromatine active, par exemple H3K4me1/3, ou encore la di-acétylation de l'histone H3. La méthylation des histones, en particulier celle de H3K4, pourrait avoir une importance particulière dans les mécanismes de *bookmarking*. Un noyau somatique peut-être reprogrammé par transplantation dans un ovocyte énucléé. Mais il se produit une conservation de l'expression de certains gènes, même après plusieurs divisions cellulaires (Ng and Gurdon, 2005). Ng et Gurdon ont montré qu'une mutation de la 4^e lysine de du variant mitotique de l'histone H3 (H3.3) chez *Xenopus laevis* entraînait l'effacement de cette mémoire épigénétique persistante lors d'expériences de transfert nucléaire (Ng and Gurdon, 2008). Il est cependant possible que la mutation perturbe d'autres marques, donc le lien direct entre H3K4me3 et la mémoire épigénétique n'est pas établi. Cette observation est renforcée par des expériences d'imagerie permettant l'analyse d'évènements transcriptionnels concernant un gène unique, menées chez des cellules de l'amibe *Dictyostelium discoïdeum*. Cette étude a montré que la délétion de l'histone metyhl-transférase Set1, spécifique de H3K4, entraîne la perte de la transmission d'états transcriptionnels à travers la mitose. Le même effet est observé en cas de mutations de H3K4 en H3A4 (Muramoto et al., 2010). Il faut noter que la mutation H3A4 entraîne un effet minime sur l'activité transcriptionnelle des gènes, ce qui suggère que la marque H3K4me3 n'est pas essentielle pour l'établissement des états transcriptionnels actifs, mais plutôt pour la mémoire épigénétique de ces états (Hödl and Basler, 2012). Certains *epigenetic readers* reconnaissant H3K4me3 sont retenus sur la chromatine mitotique, dont TFIID (même si la majorité de la protéine est dissociée à cause de la contremarque H3T3ph) (Chen et al., 2002; Christova and Oelgeschläger, 2002; Segil et al., 1996). La sélectivité de la rétention de TFIID sur certains sites seulement pourrait s'expliquer par une densité plus importante de H3K4me3 au niveau de promoteurs actifs. En effet, la phosphorylation de H3T3ph est inhibée par une forte concentration de méthylation de H3K4 (Eswaran et al., 2009). L'acétylation de H4K5 est préservée au niveau de certains promoteurs durant la mitose, permettant la reconnaissance par le bromodomaine de la protéine BRD4 (Dey et al., 2009; Zhao et al., 2011). D'autres marques de chromatine actives sont maintenues durant la mitose, par exemple l'acétylation de H3K4 et H3K14 (Wang and Higgins, 2013). Les expériences mettant en place une perte de fonction des facteurs de *bookmarking* pendant la mitose entraîne principalement une perturbation de la cinétique de ré-expression des gènes cible après la mitose (Caravaca et al., 2013; Kadauke et al., 2012; Xing et al., 2008; Zhao et al., 2011). Le modèle global proposé précise qu'au moment de la mitose, le facteur de *bookmarking* (facteur

de transcription ou autre, comme BRD4 ou MLL) reste présent sur une partie seulement de ses loci cibles, en général liés à des gènes impliqués dans des fonctions essentielles pour la cellule, ainsi que dans le destin cellulaire. Cela permet leur ré-expression rapide en sortie de mitose (**Figure 14C**).

II) Facteurs de transcription de la famille HNF1 et activité de Bookmarking.

A) La famille des facteurs de transcription Hepatocyte Nuclear Factor 1.

1) Gènes, identification et expression tissulaire

Hnf1alpha et *Hnf1beta* constituent la famille digénique de facteurs de transcription Hepatocyte Nuclear Factor 1. *Hnf1alpha* a été identifié à la fin des années 1980 (Courtois et al., 1987), et est également connu sous les noms de *Apf* (Cereghini et al., 1988) et *Lfb1* (Hardon et al., 1988). Il a été identifié comme un facteur de 88kDa indispensable pour l'expression des gènes de lignage hépatique. Au sein de lignées hépatiques déficientes pour *HNF1alpha* a été mis en évidence une espèce moléculaire de 68kDa, qui fut considérée comme un variant de *HNF1alpha*, *vHNF1* (Baumhueter et al., 1988; Cereghini et al., 1988). *vHnf1* fut ensuite reconnu comme un gène à part entière, *Hnf1beta*, de la même famille que *Hnf1alpha*. Les gènes *Hnf1alpha* et *Hnf1beta* sont présents respectivement sur les chromosomes 12 et 17 chez l'homme, et leur expression spatio-temporelle est distincte (Lu et al., 2007). Ils sont co-exprimés dans plusieurs tissus, comme le foie, l'intestin, l'estomac et le rein. *HNF1beta* est également exprimé dans le pancréas, le rein, les ovaires, les testicules et les poumons (Lu et al., 2007).

2) Structure et domaines.

HNF1alpha et beta sont constitués de trois domaines, de N-terminal en C-terminal : un domaine de dimérisation, un domaine de liaison à l'ADN, et un domaine d'activation transcriptionnelle (**Figure 15A**). La dimérisation des facteurs de transcription HNF1 est constitutive, et préalable à sa fixation à l'ADN. In vitro, la formation d'hétéro-dimères alpha/beta est possible (Mendel et al., 1991a). HNF1alpha et HNF1beta appartient à la famille des facteurs de transcription POU, dont les premiers membres identifiés sont Pit1, Oct1 et Unc (Clerc et al., 1988; Finney et al., 1988; Herr et al., 1988; Sturm and Herr, 1988). Ces facteurs de transcription ont la particularité d'avoir un domaine de liaison à l'ADN divisé en deux domaines structuraux : un homéodomaine (POUh), et un domaine POU proprement dit (POUs) (voir Sturm and Herr, 1988). Le domaine POUh présente l'architecture classique des homéo-domaines, constitué de 60 acides aminés organisé en 3 hélices alpha, la troisième hélice étant impliquée dans la reconnaissance des bases en s'insérant dans le grand sillon de l'ADN (Lu et al., 2007). Le domaine POU est constitué de 75 acides aminés, et est organisé en 5 hélices alpha. POUh et POU sont séparés par un fragment peptidique appelé *linker*, non structuré, de longueur variable selon les facteurs de la famille POU (voir Sturm and Herr, 1988). Les propriétés du peptide *linker* ont été la base de la répartition des facteurs POU en 7 sous-familles (He et al.,

1989; Ryan and Rosenfeld, 1997; Wegner et al., 1993). Au sein du peptide *linker*, on trouve notamment le signal de localisation nucléaire (KKMRRNRFK) permettant l'importation de HNF1alpha et de HNF1beta à travers l'enveloppe nucléaire (Chi et al., 2002; Lu et al., 2007). HNF1alpha et HNF1beta partagent une homologie relativement importante dans leur séquence d'acides aminés, quasi 60% de leurs résidus sont identiques (Mendel et al., 1991b). Au sein de la partie N-terminale de HNF1alpha et de HNF1beta, le taux d'homologie est plus important : 72% dans le domaine de dimérisation, 66% au sein du domaine POU et 92% d'homologie dans le domaine POUh (**Figure 15A**). On peut d'ailleurs relativiser la baisse d'homologie, dans le domaine de dimérisation et dans le domaine POU, par les faibles variations de nature acido-basique des acides aminés concernés (Mendel et al., 1991b). La structure cristallographique des deux protéines est remarquablement similaire (**Figure 15B**), (à l'exception d'une petite hélice alpha supplémentaire dans le domaine POU de HNF1beta) ((Lu et al., 2007). Le domaine de liaison à l'ADN (POU+POUh) est également très conservé au cours de l'évolution, chez les vertébrés supérieurs. Les acides-aminés du domaine d'activation transcriptionnelle partagent moins d'homologie (47%), et la cristallisation de cette partie de la protéine n'a jamais été réalisée. Le domaine C-terminal est significativement plus long chez HNF1alpha concernés (Mendel et al., 1991b).

3) Motif consensus HNF1 et liaison à l'ADN

Le motif consensus d'ADN reconnu par HNF1alpha et de HNF1beta est apparemment identique, bien que les deux protéines aient des gènes cibles distincts (Senkel et al., 2005). Lors de la liaison au motif consensus, les domaines POUh et POU de chaque monomère se lient du même côté de la double hélice (Chi et al., 2002; Lu et al., 2007). La liaison des facteurs HNF1 sous forme de dimères détermine la nature palindromique de leur motif de reconnaissance. La séquence minimale reconnue est la suivante GTTAAT(N)ATTAAC. Comme la plupart des séquences consensus reconnues par des facteurs de transcription, ce motif est dégénéré, et la présence de certaines bases est plus ou moins indispensable à la reconnaissance (**Figure 15C**).

HNF1alpha et HNF1beta ont été classés dans la famille des facteurs de transcription POU que tardivement, une fois la cristallographie de HNF1alpha réalisée (**Figure 16A**) (Chi et al., 2002). En effet, il s'agit de facteurs de transcription POU atypiques. Ils possèdent notamment au moins une hélice alpha supplémentaire dans la partie N-terminale du domaine POU, et dans le domaine POUh, la seconde hélice alpha ainsi que sa boucle adjacente sont plus longues. Ces caractéristiques permettent une interface d'interaction étendue entre POU et POUh, et donc une flexibilité réduite lors de la reconnaissance de l'ADN par rapport à d'autres membres de la famille POU (Chi et al., 2002). L'interface étendue est importante dans la reconnaissance optimale du motif consensus (Chi et al., 2002). La troisième hélice de l'homéodomaine est indispensable à l'interaction avec l'ADN. Elle s'insère dans le grand sillon de l'ADN,

perpendiculairement à l'axe de la double hélice, et établit des interactions base-spécifique et avec le squelette phospho-carboné. Au sein du domaine POU, des interactions avec l'ADN sont également observées, à la fois avec les bases et le squelette phosphocarboné (**Figure 17** et Chi et al., 2002; Lu et al., 2007). La dimérisation de HNF1alpha et HNF1beta est réalisée par le biais d'une architecture en quatre tonneaux (*four bundles*), et est indispensable à la liaison avec une haute affinité ($K_d=1,6.10^{-11}M$) au motif consensus (Tomei et al., 1992). La dimérisation est stabilisée par le facteur DcoH (Dimerization cofactor of HNF1) (**Figure 16B**) (Mendel et al., 1991a; Nicosia et al., 1992).

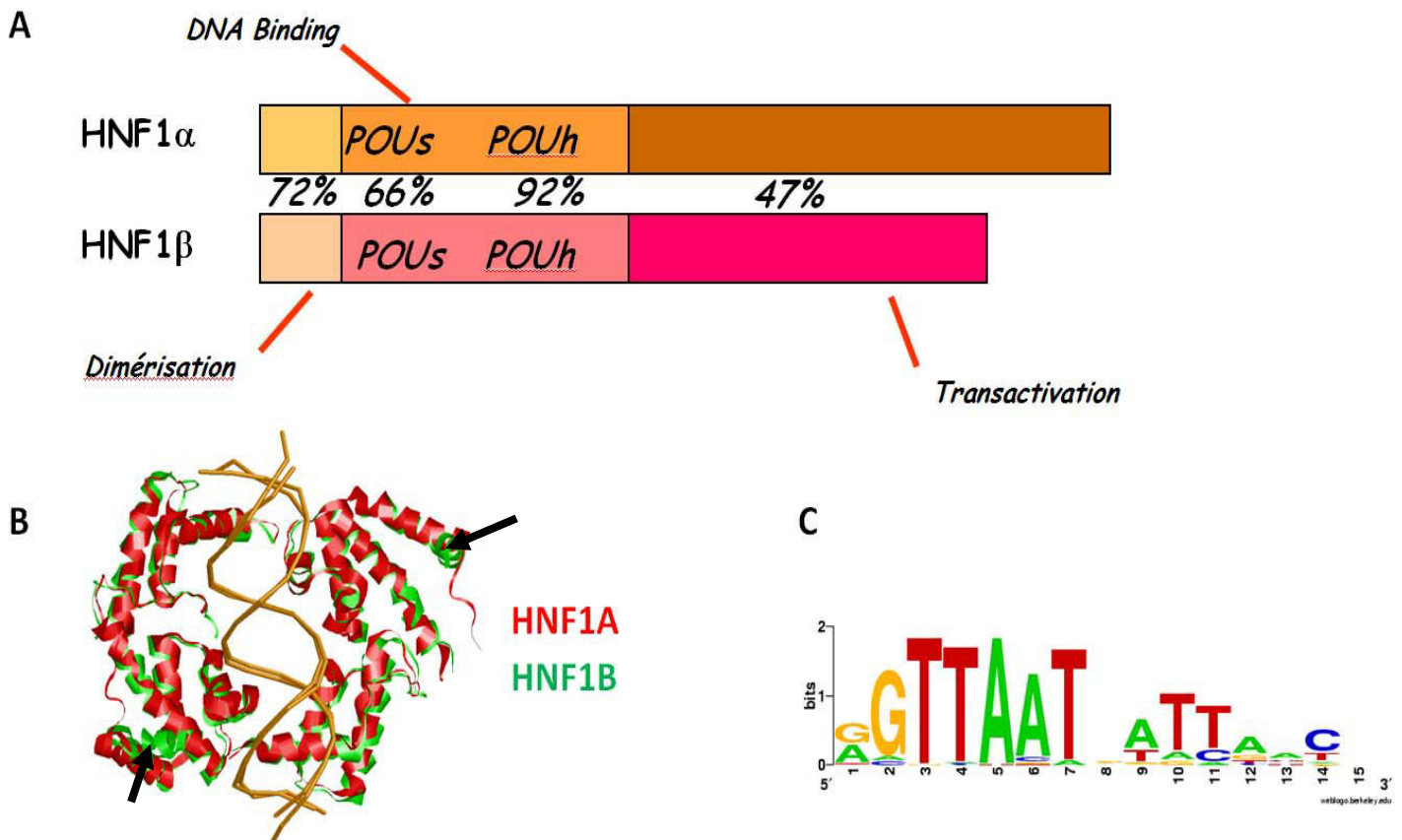


Figure 15: la famille digénique des facteurs Hepatocyte Nuclear Factor 1

A: La famille HNF1 est constituée de deux facteurs de transcription, HNF1alpha et HNF1beta, composés de trois domaines assurant trois fonctions : dimérisation, liaison à l'ADN, transactivation. Ils partagent une forte homologie dans le domaine de liaison à l'ADN.

B: Superposition des structures cristallographiques de HNF1alpha (en rouge) et de HNF1beta (en vert). Les flèches indiquent la petite hélice supplémentaire chez HNF1beta. *Structures moléculaires établies par Chi et al Mol. Cell 2002 (HNF1A) et Lu et al. Biochemistry 2007 (HNF1B). Vue sur Rasmol.*

C : Motif consensus de liaison palindromique des facteurs HNF1.

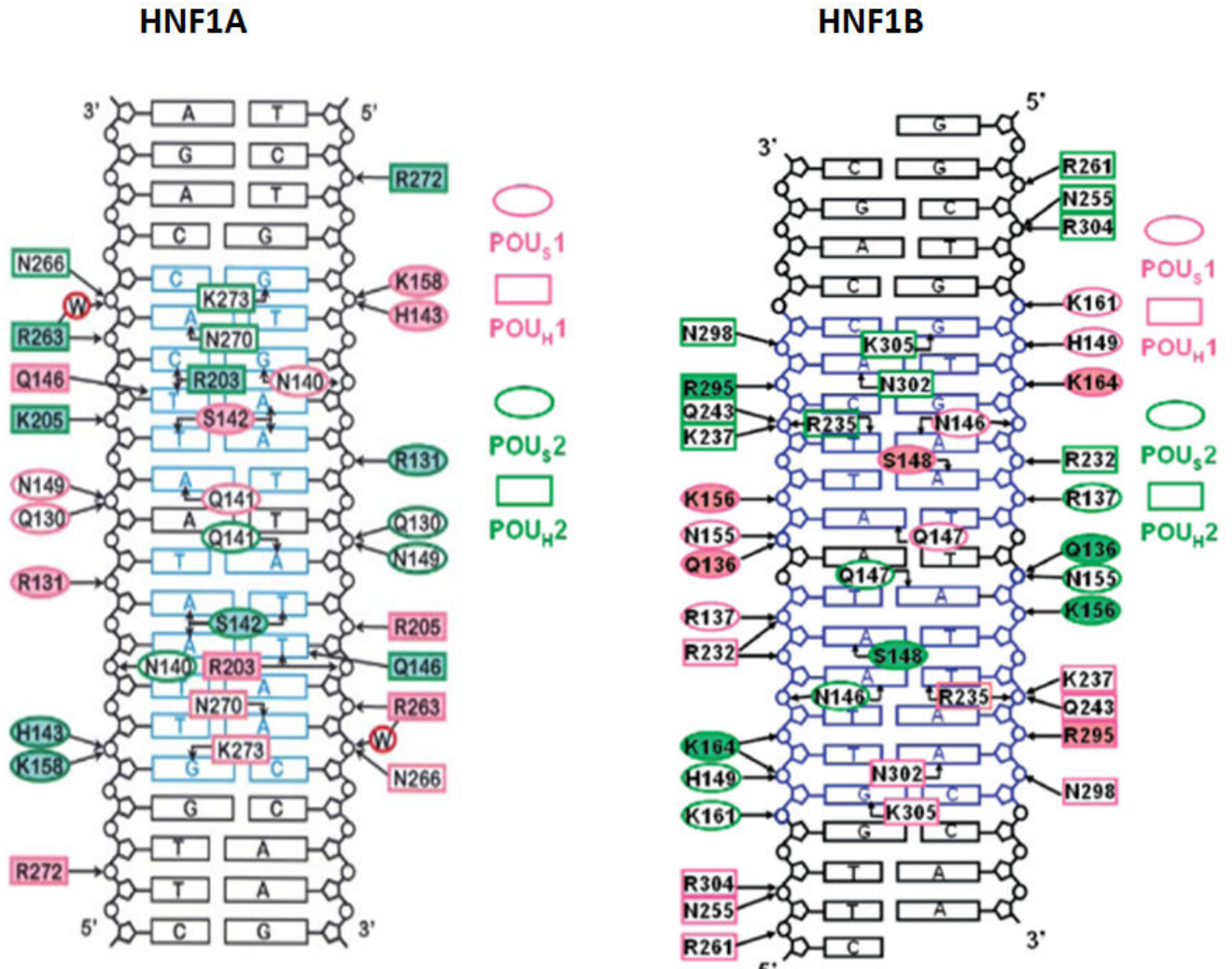


Figure 17 : Liaison des facteurs de transcription de la famille HNF1 à l'ADN

HNF1alpha et HNF1beta se lient de façon dimérique à un motif consensus palindromique. Les ovales roses et verts représentent respectivement des acides aminés des domaines POU_S du monomère 1 et 2. Les carrés roses et verts représentent respectivement les acides aminés des domaines POU_H du monomère 1 et 2. L'ensemble des résidus impliqués dans la liaison avec l'ADN sont représentés sur cette figure. Ils interagissent soit avec les bases nucléotidiques, soit avec le squelette phosphocarboné.

A gauche : tiré de Chi et al Mol. Cell 2002 (HNF1A), à droite : tiré de Lu et al. Biochemistry 2007.

4) Partenaires

HNF1alpha et HNF1beta interagissent avec un certain nombre de partenaires. En adéquation avec leur activité de facteur de transcription, ils ont comme partenaires des coactivateurs transcriptionnels tels que CBP/p300 et PCAF (Histone Acetyl-Transferase). Une action synergique de ces co-activateurs est d'ailleurs requise pour l'induction de la transcription par HNF1alpha et HNF1beta (Dohda et al., 2004; Soutoglou, 2001; Soutoglou et al., 2000). HNF1alpha interagit également avec deux autres co-activateurs, SRC1 et RAC3 (Soutoglou et al., 2000), ainsi qu'avec la protéine HMGB1, qui rend la chromatine plus accessible, d'une façon encore mal comprise.

DcoH, le cofacteur de dimérisation que nous avons évoqué précédemment, a été identifié comme partenaire de HNF1alpha et HNF1beta en 1991. Il permet une augmentation de l'induction de la transcription par les des deux facteurs de transcription en stabilisant les dimères (Mendel et al., 1991a; Nicosia et al., 1992). Un dimère DcoH interagit avec un dimère HNF1 (**Figure 16B** et Endrizzi et al., 1995; Rose et al., 2000). De façon remarquable, DCoH présente également une activité enzymatique, connue sous le nom de Pterin-4alpha-Carbinolamine Dehydratase, ou PCD. La PCD possède un rôle important dans le catabolisme de la phénylalanine (Johnen et al., 1995; Lazarus et al., 1981; Rebrin et al., 1995a, 1995b), et certaines mutations de DCoH causent une hyperphényalaninémie chez l'homme (Citron et al., 1993; Thöny et al., 1998). Cette double activité est fonction de sa localisation subcellulaire. Dans le cytoplasme DCoH est présente sous forme tétramérique et enzymatiquement active (Citron et al., 1993; Cronk et al., 1996). Dans le noyau, la protéine est dimérique et interagit avec les facteurs HNF1 (Mendel et al., 1991a; Nicosia et al., 1992).

HNF1beta et HNF1alpha interagissent également avec HDAC1 (Barbacci et al., 2004; Soutoglou, 2001). Un crible double hybride a montré l'interaction de HNF1beta avec E4F1 et ZFP36L1. E4F1 est un facteur de transcription capable d'induire des modifications de la chromatine, en association avec p53, et ZFP36L1 est impliqué dans la régulation de la dégradation de certains ARNm (Dudziak et al., 2008).

Plus récemment, une autre étude par crible double hybride a permis d'identifier la zyxine comme étant un partenaire de HNF1beta, confirmée par co-immunoprécipitation (Choi et al., 2013). La zyxine a été initialement décrite comme une protéine impliquée dans les jonctions adhérentes. Il a été montré que la zyxine peut subir une translocation nucléaire, et se comporter comme un co-activateur transcriptionnel. De façon intéressante, l'étude de Choi et al. a montré que la translocation nucléaire de la zyxine se produisait par une phosphorylation dépendante de la voie Akt, et que la zyxine, en se complexant avec HNF1beta, permettait une potentialisation de l'activation de la transcription des gènes cibles (Choi et al., 2013).

B) Singularité de la régulation de l'expression génique par HNF1beta lors du développement rénal.

1) Réseau transcriptionnel de HNF1beta lors du développement rénal

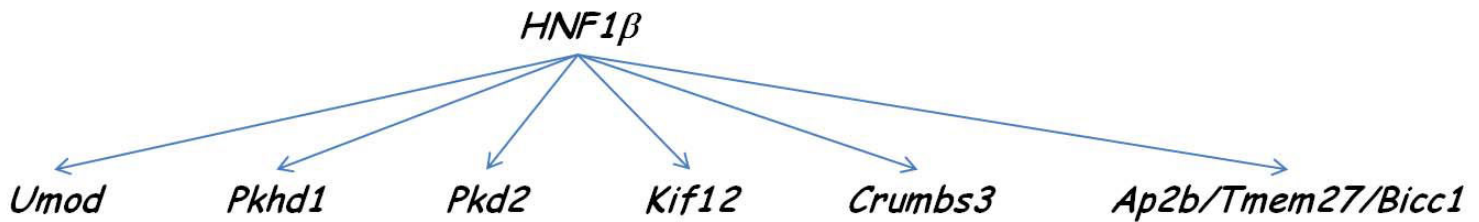
HNF1beta est un facteur de transcription clé dans le développement et la physiologie du rein. Il est exprimé dès les premiers stades du développement de l'organe (Coffinier et al., 1999), et contrôle l'expression d'un certain nombre de gènes dans le rein, et notamment les gènes dits kystiques (**Figure 18A** et Gresh et al., 2004). Des mutations affectant de ces gènes sont la cause la plus commune d'insuffisance rénale chez enfants et adultes (Igarashi and Somlo, 2002). Malgré une grande hétérogénéité, ces pathologies sont caractérisées par des dilatations des tubules rénaux et une kystogénèse. Chez la souris, l'inactivation bi-allélique des gènes kystiques résulte en général en un phénotype de Polykystose rénale (Polycystic Renal Disease PKD) (Fischer et al., 2004; Guay-Woodford, 2003). On peut citer parmi les gènes kystiques : *Pkhd1*, *Pkd2*, *Umod* (Gresh et al., 2004). Par extension, des mutations de HNF1beta sont fréquemment retrouvées chez des patients souffrant de kystes et de dysplasie rénale (Lindner et al., 1999; Ulinski et al., 2006).

2) Conséquence d'une inactivation post-natale précoce de HNF1beta dans le rein murin.

L'inactivation de HNF1beta résulte en une létalité embryonnaire très précoce, intervenant au cours de l'implantation de l'embryon (à E7,5) (Barbacci et al., 2004; Coffinier et al., 1999), et donc en un phénotype trop drastique pour permettre l'analyse de la fonction de HNF1beta au sein de tubules rénaux déjà formés. Afin d'étudier le rôle de HNF1beta dans l'apparition des kystes rénaux dérivés des tubules, Verdeguer et al ont donc mis en place un protocole d'inactivation post-natale inductible de HNF1beta, spécifiquement au sein du rein murin (Verdeguer et al., 2010). Le protocole utilisé est basé sur l'utilisation d'une Cre recombinase inductible (MxCre), et d'un allèle floxé de *Hnf1beta*.

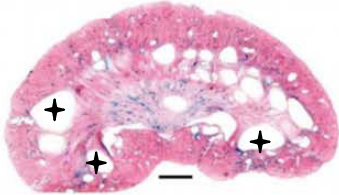
L'inactivation de HNF1beta au stade P0 entraîne l'apparition d'un phénotype polykystique, aboutissant à une augmentation très importante de la taille du rein. Il se produit une perte d'expression de la plupart des gènes cibles de HNF1beta, dont les gènes kystiques (*Umod*, *Pkhd1* et *Pkd2*), ainsi que d'autres gènes impliqués dans la kystogénèse (*Kif12*, *Crb3*, *Tcfap2b*, *Tmem27*, *Bicc1*). Cela aboutit à une kystogénèse, liée à une perte de l'orientation de la division cellulaire au sein des tubules rénaux, transformant la croissance verticale permettant l'élongation tubulaire en croissance non-orientée (**Figure 18B**) (Verdeguer et al., 2010).

A

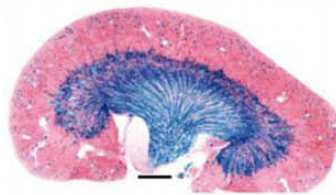


B

a Inactivation à P1



b Inactivation à P10



C

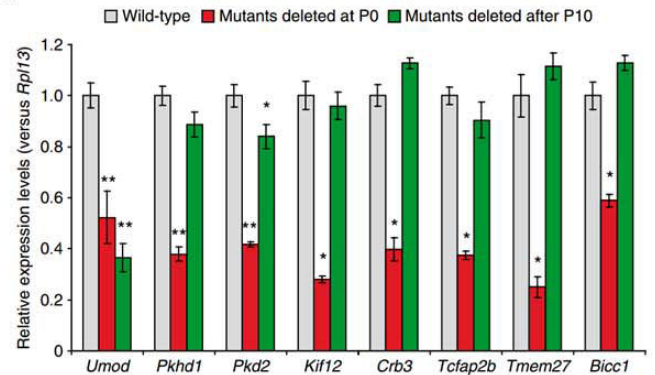


Figure 18 : Régulation de l'expression génique par HNF1beta lors du développement rénal.

A : HNF1beta contrôle l'expression des gènes kystiques et de gènes impliqués dans la kystogénèse pendant le développement du rein.

B: L'inactivation inducible de HNF1beta a des effets phénotypiques différents selon le stade auquel elle se produit. (a) Coupe de rein 30 jours après inactivation HNF1beta dans le tissu rénal au stade P1. L'inactivation induit la présence d'un phénotype polykystique (quelques exemples de dilatations kystiques sont marqués par une croix noire) (b) Coupe de rein 30 jours après inactivation HNF1beta dans le tissu rénal au stade P10. Le rein ne présente pas de dilatations kystiques, et une apparence physiologique (contrôle) Barre d'échelle : 1mm. Tiré de Verdeguer et al, *Nature Medicine* 2009.

C: L'inactivation de HNF1beta à P0 ou à P10 produit un effet différent sur la régulation de ses gènes cibles. A P0, l'inactivation de HNF1beta résulte en une extinction transcriptionnelle des gènes cibles (barres rouges). A P10, l'inactivation de HNF1beta a peu d'effet sur l'expression de ses cibles, à l'exception d'*Umod* dont le taux de transcription diminue fortement (barres vertes). Tiré de Verdeguer et al, *Nature Medicine* 2009

3) Inactivation tardive et importance du contexte prolifératif

Verdeguer et al ont montré que l'apparition du phénotype polykystique est dépendante du stade d'inactivation de HNF1beta. En effet, dix jours après la naissance (stade P10), l'inactivation de HNF1beta n'entraîne pas de kystogénèse (**Figure 18B**). Il existe une différence dans le contexte prolifératif entre le stade P0 et le stade P10. En effet, la prolifération rénale diminue après la naissance, particulièrement à partir du stade P10, pour atteindre un niveau très faible pendant la vie adulte, où le rein est dans un état de quiescence (Verdeguer et al., 2010). Il est possible de déclencher artificiellement une prolifération proche de celle survenant au stade P0, au sein des tubules rénaux adultes grâce à un protocole d'ischémie-reperfusion (Verdeguer et al., 2010). Verdeguer et al ont montré que l'ischémie-reperfusion chez des souris adultes entraîne l'apparition de dilatations kystiques dans un contexte où HNF1beta est inactivé (Verdeguer et al., 2010).

Cela démontre le rôle de la prolifération cellulaire dans l'apparition du phénotype polykystique lié à l'inactivation de HNF1beta. L'étude de l'expression des gènes cibles de HNF1beta, par RT-qPCR et par immunohistochimie a permis de confirmer l'importance du contexte prolifératif sur les conséquences de l'inactivation de *Hnf1beta*. Au sein de tubules rénaux prolifératifs chez le souriceau nouveau-né, l'inactivation de *Hnf1beta* provoque la perte de l'expression des gènes cibles, aboutissant à la formation de kystes. En revanche, dans les tubules adultes quiescents, seule une partie des gènes cibles subit une inactivation transcriptionnelle suite à l'inactivation de *Hnf1beta*, tandis que le reste des gènes cibles conservent au contraire un taux d'expression normale (**Figure 18C**). On peut donc répartir les gènes cibles de HNF1beta en deux classes. La classe de gènes cibles de catégorie 1, dont l'uromoduline *Umod* est l'unique représentant (identifié à ce jour), subit une perte d'expression importante lorsque HNF1beta est inactivé dans un contexte quiescent. Les gènes cibles de catégorie 2 identifiés (*Pkhd1*, *Pkd2*, *Kif12*, *Crb3*, *Tcfap2b*, *Tmem27* et *Bicc1*) conservent en revanche un taux d'expression normal après inactivation de *Hnf1beta* en quiescence. Cela suggère l'existence d'une fonction redondante de *Hnf1beta* dans l'induction ou dans le maintien de la transcription de ces gènes (Verdeguer et al., 2010). Dès qu'un événement prolifératif intervient, en l'absence de HNF1beta, l'ensemble des gènes cibles sont inactivés, conduisant au développement d'un phénotype polykystique. Cela suggère l'existence d'un défaut dans la transmission épigénétique de l'expression des gènes cibles à travers la mitose, et donc potentiellement une altération d'un mécanisme de *Bookmarking*.

Figure 19 : Etude des marques chromatiennes au niveau du gène cible pkhd1, en présence ou en absence de HNF1beta, dans un contexte prolifératif.

L'étude est réalisée par immuno-précipitation de chromatine avec des anticorps spécifiques des modifications post-traductionnelles d'histones, ou de l'histone H3.

A : Inactivation de HNF1beta par expression inductible d'une version dominante négative (Domaine de dimérisation+ domaine POU) en fusion avec la GFP. On observe une diminution de l'acétylation de H3K9, marque de chromatine active, et une augmentation des marques de chromatine inactive H3K9me3 et H3K27me3. *Tiré de Verdeguer et al, Nature Medicine 2009.*

B: Inactivation de HNF1beta par Knockout induit chez des souris nouveaux-nés. On observe une diminution des marques actives de chromatine H3K9ac et H3K4me3. Le niveau d'histone H3 ne varie pas, ce qui signifie que les variations observées sont bien des changements dans le niveau des marques chromatiennes *Tiré de Verdeguer et al, Nature Medicine 2009.*

4) HNF1beta est un facteur de Bookmarking.

Verdeguer et al ont ensuite voulu comprendre si l'inactivation de HNF1beta dans un contexte prolifératif avait un effet sur la structure de la chromatine. Une analyse des marques d'histones H3K9ac (chromatine active), H3K9me3 et H3K27me3 (chromatine inactive) au niveau du locus

du gène cible *pkhd1* a été menée par ChIP, dans une condition où HNF1beta est activé ou inactivé par l'expression d'un dominant négatif (HNF1beta délété du domaine de transactivation, et en fusion avec la GFP) (Verdeguer et al., 2010). En présence de HNF1beta, le taux de H3K9ac est relativement élevé au niveau du locus *pkhd1*, reflétant une chromatine active transcriptionnellement. Au contraire, le taux des marques de chromatine réprimée, H3K9me3 et H3K27me3 sont réduites au même locus. L'inactivation de HNF1beta, dans un contexte prolifératif, provoque une baisse drastique de la marque active H3K9ac, et une augmentation des taux de marques inactives H3K9me3 et H3K27me3. Ainsi, la perte de l'activité de HNF1beta dans un contexte prolifératif provoque un changement de la nature de chromatinienne au niveau du gène cible *pkhd1*, passant d'un statut actif (H3K9ac) à un statut réprimé (H3K9me3 et de H3K27me3) (**Figure 19**). Ce changement de statut de la chromatine, d'actif à réprimé, a été également démontré par ChIP chez les souris subissant l'inactivation de *Hnf1beta* dans un contexte prolifératif (P0), au locus *pkhd1*. Cela montre que HNF1beta semble donc nécessaire au maintien à travers la mitose d'une structure chromatinienne permettant l'activité transcriptionnelle au niveau de ses gènes cibles (Verdeguer et al., 2010).

Verdeguer et al ont ensuite étudié la localisation mitotique de HNF1beta pendant la mitose. L'expression d'une fusion de la partie N-terminale de la protéine (Domaine de dimérisation-POUs-POUh) avec la GFP a révélé que HNF1beta était associé aux chromosomes mitotiques durant de la prophase à la télophase (**Figure 20A**). Comme nous l'avons précisé auparavant, la rétention mitotique n'est pas partagée par tous les facteurs de transcription. Ainsi, HNF4alpha en fusion avec la GFP est dispersé dans le cytoplasme après rupture de l'enveloppe nucléaire (**Figure 20B**) (Verdeguer et al., 2010). HNF1beta est donc un facteur de transcription capable de jouer une double fonction: (i) la fonction d'activateur transcriptionnel (ii) l'activité de *Bookmarking* permettant la ré-activation de l'expression de ses gènes cibles après la mitose, en maintenant la structure de la chromatine. Dans un contexte quiescent, la fonction d'activateur transcriptionnel uniquement intervient, et l'inactivation de HNF1beta entraîne ainsi la perte de l'expression de certains gènes cibles uniquement (Umod). Le maintien de l'expression des gènes cibles de classe 2 pourrait s'expliquer par une activité d'induction transcriptionnelle redondante (des expériences ont montré que le taux de nouveaux transcrits était maintenu même en l'absence de HNF1beta, ce qui exclut l'hypothèse d'une plus grande stabilité des ARNm). Quand une division cellulaire intervient, en l'absence de HNF1beta, la fonction de *Bookmarking* ne peut plus être mise en place, entraînant une perte de l'expression des gènes cibles après la mitose (**Figure 20C**). En l'absence de HNF1beta, la chromatine post-mitotique présente une structure inactive au niveau des gènes cibles, notamment des gènes cystiques et associés, ce qui provoque la perte de leur expression, et la mise en place de la kystogénèse (Verdeguer et al., 2010).

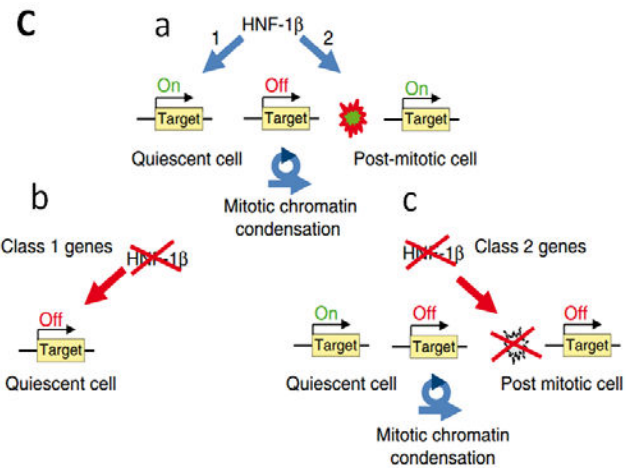
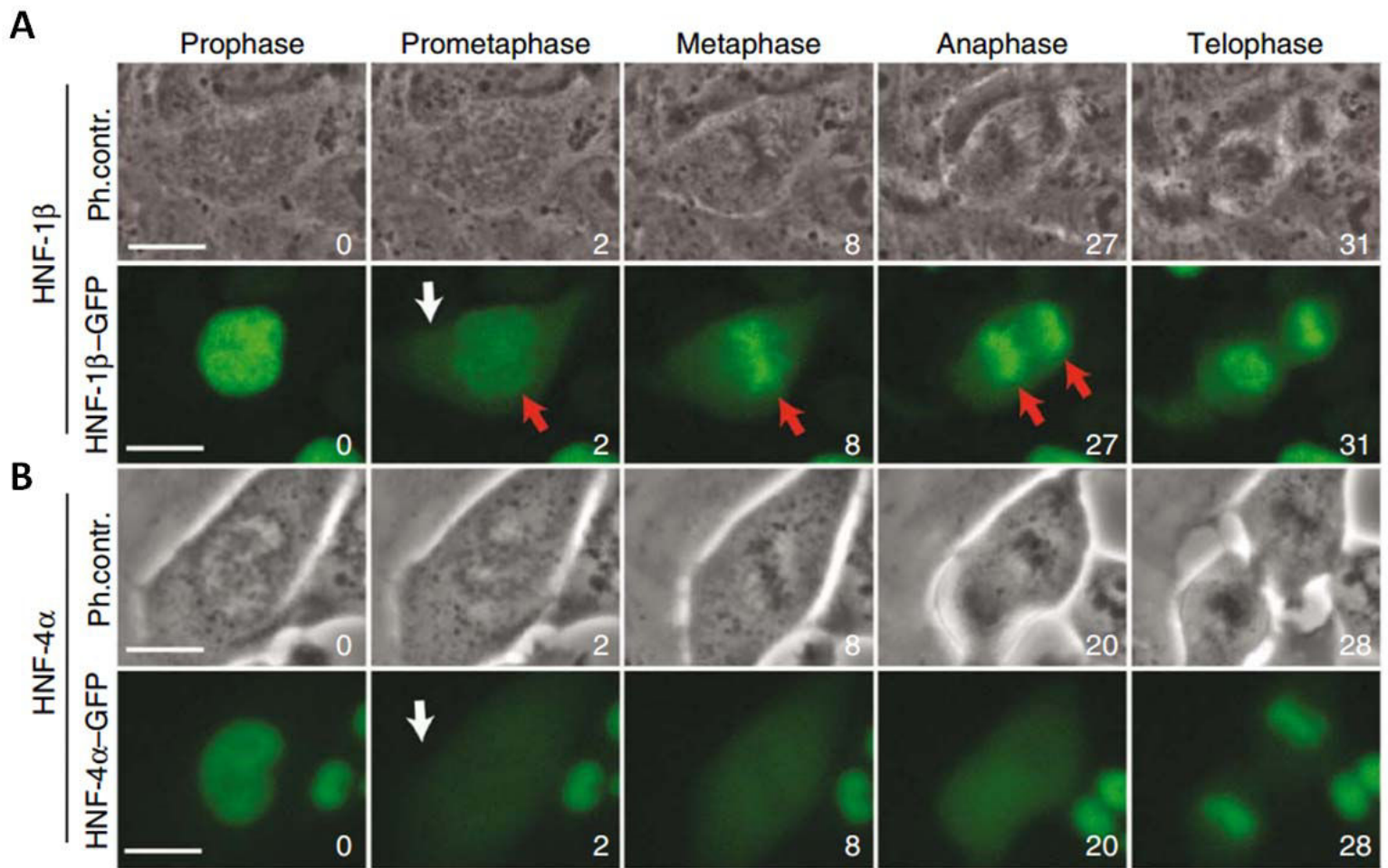


Figure 20 : HNF1beta est un facteur de Bookmarking

A Time-lapse en vidéomicroscopie sur des cellules mIMCD3 exprimant le domaine de dimérisation et le domaine POU de HNF1beta en fusion avec la GFP. HNF1beta est lié à la chromatine au cours de toutes les phases de la mitose. *Tiré de Verdeguer et al, Nature Medicine 2009.*

B: Time-lapse en vidéomicroscopie sur des cellules transfectées de façon transitoire avec HNF4alpha en fusion avec la GFP. Au contraire de HNF1beta, le facteur de transcription HNF4alpha est dispersé dans le cytosol après rûpture de l'enveloppe nucléaire.

C: Résumé de la fonction de Bookmarking de HNF1beta. (a): HNF1beta est nécessaire à la ré-activation de ses gènes cibles, après l'inactivation mitotique de l'expression génique; (b): l'inactivation de HNF1beta en quiescence résulte en l'inactivation de certains gènes (classe 1); (c): l'inactivation de HNF1beta en quiescence n'a pas d'effet sur le taux transcriptionnel d'autres gènes cibles (classe 2). En revanche, dès qu'un événement prolifératif intervient, les gènes cibles ne sont pas ré-activés après la condensation mitotique de la chromatine. *Tiré de Verdeguer et al, Nature Medicine 2009.*

III) Perte de fonction des facteurs HNF1 et pathologies.

Des mutations des gènes *HNF1alpha* et *HNF1beta* sont impliquées dans un ensemble de pathologies humaines, parmi lesquelles des diabètes chez l'enfant et le jeune adulte (*Maturity Onset Diabetes of the Young*, MODY) (**Figure 21**), des maladies rénales et hépatiques, et certains cancers. Il serait intéressant de revisiter les conséquences de la perte de fonction de HNF1beta dans certaines pathologies en envisageant un rôle de sa fonction de *Bookmarking* dans l'apparition de la maladie, comme dans le cas de la Polykystose rénale exposé auparavant. Chez la souris, la perte biallélique de *Hnf1b* entraîne une léthalité embryonnaire. Ce n'est pas le cas pour *Hnf1a*. Vu le fort taux d'homologie entre HNF1beta et HNF1alpha, et leur structure quasiment similaire, on peut émettre l'hypothèse raisonnable que HNF1alpha également puisse être impliqué dans le *Bookmarking* de certains gènes cibles au sein des tissus dans lesquels il est exprimé

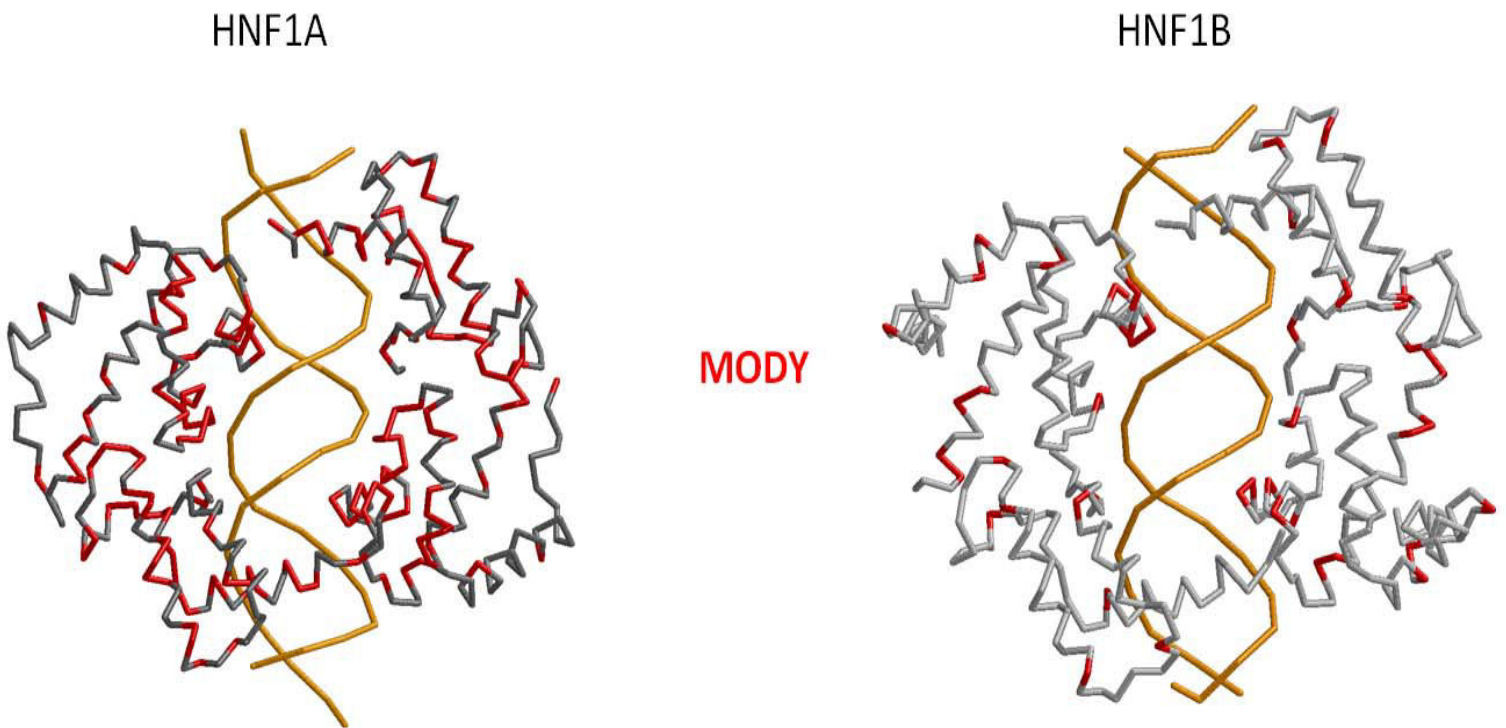


Figure 21: Localisation de mutations MODY faux-sens sur le cristal de HNF1alpha et de HNF1beta.

En rouge : positions d'un ensemble de mutations faux-sens MODY sur la chaîne peptidique de HNF1alpha (à gauche, en gris foncé) et sur la chaîne peptidique de HNF1beta (à droite, en gris clair).

A) Diabètes MODY3 et MODY5.

Le terme MODY ou *Maturity Diabetes Onset of the Young* se réfère à plusieurs formes de diabète héréditaires causés par une mutation dans un gène autosomique dominant (maladie monogénique), survenant avant l'âge de 25 ans (**Figure 22**). Ils représentent entre 2 et 5% des diabètes de type 2. Les patients souffrant de diabète MODY présentent en général des mutations touchant un gène spécifique. Les mutations de *HNF1alpha* et dans *HNF1beta* entraînent respectivement l'apparition d'un diabète MODY3 ou MODY5.

Classe	Gène responsable
MODY1	HNF4 α
MODY2	Glucokinase
MODY3	HNF1 α
MODY4	IPF1
MODY5	HNF1 β
MODY6	Neuro D1 ou β 2
MODY7-9	CEL, Isl1, KLF11, autres

Figure 22 : Classification des *Mature Onset Diabetes of the Young (MODY)*

Les MODYs sont des diabètes monogéniques apparaissant de façon précoce (avant 25 ans).

1) *HNF1alpha* et MODY3.

Des mutations de *HNF1alpha* sont la cause la plus commune de survenue d'un diabète de type MODY au Royaume-Uni (ou 1% des patients suivis médicalement pour un diabète présentent des mutations dans le gène *HNF1alpha*). Dans d'autres pays, tels que l'Allemagne, le Danemark, l'Italie, la Finlande, en Amérique du Nord et le Japon, c'est une cause fréquente de la survenue d'un diabète MODY (Ellard, 2000). La perte de fonction de *HNF1alpha* résulte dans l'apparition du diabète MODY3, à cause d'une altération progressive du fonctionnement des cellules beta pancréatiques (Servitja et al., 2009), plus particulièrement concernant la sécrétion d'insuline stimulée par l'augmentation de la glycémie (Wang et al., 2004b). Une analyse transcriptomique à grande échelle a montré que la perte de *Hnf1a* chez la souris entraîne des changements dans l'expression de gènes impliqués dans des fonctions diverses : métabolisme glucidique, transfert d'électron et phosphorylation oxydative, métabolisme et transport des acides aminés et des lipides, adhésion cellulaires et communication intercellulaires, cytosquelette, transport ioniques, protéolyse... (Servitja et al., 2009). Les mutations identifiées de *HNF1alpha* chez des

familles de patients MODY3 ont été retrouvées à la fois dans les parties régulatrices du gène (promoteur, 5'UTR), mais également sur les 10 exons de *HNF1alpha*. Certaines mutations touchent des sites d'épissage. Dans les exons on retrouve des mutations faux-sens, non-sens, et des mutations entraînant un changement de cadre de lecture (Chi et al., 2002). Une partie des mutations faux-sens sont présentes sur les domaines POU5 et POUh, et touchent parfois des résidus impliqués dans l'interaction avec les bases ou le squelette phosphocarboné de l'ADN. Ces mutations entraînent ainsi en général une perte d'interaction avec l'ADN. D'autres mutations perturbent potentiellement la stabilité de la protéine, l'interaction entre POU5 et POUh, ou encore la localisation nucléaire (celles situées dans le NLS). Certaines mutations faux-sens pourraient également perturber l'interaction avec des partenaires protéiques, par exemple des co-régulateurs transcriptionnels (Chi et al., 2002).

2) *HNF1beta* et MODY5

Des mutations hétérozygotes de *HNF1beta* entraînent l'apparition du diabète MODY5 (Horikawa et al., 1997). Wang et al ont montré que l'inactivation sélective de *Hnf1b* dans le pancréas chez la souris provoquait une altération de la sécrétion d'insuline en réponse à la stimulation par le glucose (Wang et al., 2004b). A l'instar des mutations MODY3, une variété importante de mutations MODY5 est retrouvée sur le gène *HNF1beta*, incluant des mutations faux-sens, non-sens, des insertions/délétions, des mutations entraînant un changement de phase ou touchant un site d'épissage. De larges délétions génomiques supprimant le gène *HNF1beta* (sur un allèle) sont également impliquées dans la survenue de ce diabète (Bellanné-Chantelot et al., 2005). Ainsi, à cause de ces délétions, on ne détecte ainsi pas de mutations ponctuelles sur *HNF1beta* chez 60% des patients avec un phénotype suggérant un diabète MODY5, (Bellanné-Chantelot et al., 2005). Comme pour *HNF1alpha*, des mutations faux-sens sont retrouvées le domaine de liaison à l'ADN, sur les domaines POU5 et POUh. Une grande partie de ces mutations sont situées sur l'interface d'interaction avec l'ADN, permettant la reconnaissance base-spécifique ou celle du squelette phosphocarboné (Lu et al., 2007). Ces mutations, de même que celles perturbant l'interaction entre POU5 et POUh, entraînent en général une baisse de l'affinité pour l'ADN. D'autres mutations entraînent une perte de stabilité de la protéine, sans doute en affectant le repliement global de la protéine. Des mutations au sein du signal de localisation nucléaire affectent l'import nucléaire de *HNF1beta* (Lu et al., 2007). Une étude fonctionnelle a montré que malgré une liaison normale à l'ADN, certains mutants avaient un potentiel d'activation transcriptionnelle très réduit, lié à la perte de l'interaction avec les co-activateurs transcriptionnels CBP et p300 (qui ont tous deux une activité d'Histone Acétyl-Transférase) (Barbacci et al., 1999). D'autres mutations, en particulier à l'interface extérieure de la protéine, pourraient être impliquées de la même manière que pour *HNF1alpha* dans la perte d'interactions avec des partenaires (Lu et al., 2007).

B) Autres pathologies dues à des dysfonctionnements au sein de différents organes.

Des modèles d'inactivation de *Hnf1a* et *Hnf1b* chez la souris ont permis de récapituler les symptômes d'un certain nombre de pathologies humaines, permettant ainsi l'étude de mécanismes moléculaires d'apparition de ces maladies.

1) HNF1alpha

L'inactivation bi-allélique de *Hnf1a* dans la lignée germinale n'entraîne pas de létalité embryonnaire, ou de perturbation majeure du développement embryonnaire. Les souris *Hnf1a* *-/-* présentent cependant des problèmes de croissance et une espérance de vie réduite due à des dysfonctionnements hépatiques, pancréatiques, rénaux et intestinaux. Les souris meurent généralement autour de la période du sevrage, après un affaiblissement profond de l'organisme (cachexie) à partir de la deuxième semaine de vie post-natale. HNF1alpha est exprimé dans le foie, le rein, le pancréas et le tractus gastro-intestinal (Pontoglio et al., 1996).

a) Pathologies hépatiques et hyperphénylalaninémie.

Les souris *Hnf1a* *-/-* présentent une hépatomégalie, survenant à partir de la deuxième semaine. 20% des foies sont stéatotiques (Pontoglio et al., 1996). Plusieurs dysfonctionnements hépatiques interviennent chez ces souris, entraînant notamment la mise en place d'une hyperphénylalaninémie, avec des niveaux comparables à ceux retrouvés chez des patients souffrant de phénylcétonurie (Pontoglio et al., 1996). Une étape clé dans le métabolisme de la phénylalanine est sa conversion en tyrosine par hydroxylation (ajout d'une fonction -OH), réalisée principalement dans le foie par la Phényl-Alanine-Hydroxylase (PAH). Pontoglio et al ont montré que l'hyper-phénylalaninémie chez les souris *Hnf1a* *-/-* était liée à une perte d'expression de la PAH dans le foie. De façon intéressante, cette perte d'expression est liée à des modifications de la chromatine des régions régulatrices du gène de la PAH. En effet, il se produit une disparition de sites hypersensibles à la Dnase I, qui sont caractéristiques d'une chromatine accessible aux facteurs de régulation de la transcription. La perte des sites hypersensibles est associée à la méthylation du promoteur du gène PAH (Pontoglio et al., 1997). L'expression du gène de la PAH peut être rétablie par la ré-expression de *Hnf1a* pendant le développement embryonnaire, mais pas après la naissance. HNF1alpha ne peut ainsi remodeler la chromatine des régions régulatrices de PAH que pendant une fenêtre temporelle réduite après laquelle l'inactivation devient irréversible. La PAH est également présente dans le rein, à un niveau plus

faible. Son expression est normale dans les souris inactivées pour *Hnf1a*, ce qui est sans doute permis par l'expression résiduelle de *Hnf1b* (Pontoglio et al., 1997).

b) Dysfonctionnements rénaux et syndrome rénal de Fanconi.

Les souris *Hnf1a* *-/-* présentent les symptômes correspondant à une pathologie humaine appelée syndrome rénal de Fanconi (Pontoglio et al., 1996). Ce syndrome est caractérisé par une polyurie, et la présence dans les urines de taux anormalement élevés de glucose (glycosurie), d'acides aminés et de phosphate, ainsi que par une déminéralisation osseuse. Cela résulte d'une altération des transports transmembranaires dans le tubule rénal proximal, dont la fonction primaire est la réabsorption des petites molécules du plasma (en particulier glucose et acides aminés), qui passent librement à travers le filtre glomérulaire. Une perte d'expression de HNF1alpha entraîne une perte de l'expression de certains transports actifs impliqués dans ce phénomène (Pontoglio et al., 2000). Il est probable que la forte glycosurie liée à la perte de fonction de *Hnf1a* ait un rôle atténuateur dans les symptômes du diabète MODY3.

2) HNF1beta et pathologies rénales.

Les mutations MODY5 provoquent également des néphropathies, des défauts du tractus urogénital (Horikawa et al., 1997; Lindner et al., 1999; Nishigori et al., 1998) et également l'apparition de kystes issus des tubules rénaux et des glomérules (Bingham et al., 2001). L'ensemble des tissus dans lesquels *HNF1beta* est exprimé est affecté, mais la gravité est extrêmement variable d'un patient à l'autre.

a) CAKUT

Des mutations de *HNF1beta* sont la cause la plus fréquente de survenue d'anomalies congénitales du rein et du tractus urogénital (CAKUT) (Decramer et al., 2007; Ulinski et al., 2006). Ces anomalies ont une prévalence de 1/500 naissances et constituent quasiment un tiers des anomalies identifiées avant la naissance (Schedl, 2007). Les CAKUT sont de nature variable, incluant l'agénésie rénale (absence de reins), des uretères multiples, une hypoplasie rénale (taille réduite), ou encore une dysplasie (présence de structures anormales).

b) Dérèglements homéostatiques.

L'acide urique est le produit métabolique final de la dégradation des purines chez l'homme. Une dérégulation congénitale de son transport aboutissant à une hyperurémie est observée chez des jeunes patients souffrant de maladies rénales. Le gène de l'uromoduline (UMOD) est

associé à cette hyperurémie chez ces patients (Hart et al., 2002). HNF1beta a donc deux rôles potentiels dans la survenue d'une hyperurémie: il contrôle l'expression de transporteurs transmembranaires impliqués dans la voie d'excrétion du phosphate (NPT1 et NPT4) (Cheret et al., 2002), et il contrôle l'expression de l'uromoduline. Des mutations de *HNF1beta* sont également associées à un taux réduit de magnésium dans le sang. Cela est probablement lié à une altération de l'expression d'un régulateur de la pompe Na/K/ATPase du tubule distal, *FXRD2*, sans doute impliquée dans l'homéostasie du magnésium et dont l'expression est contrôlée par HNF1beta (Adalat et al., 2009).

c) Polykystose rénale.

Ce sujet a été abordé dans la deuxième partie de cette thèse. HNF1beta contrôle l'expression de gènes impliqués dans la kystogénèse, tels que *Pkhd1*, *Pkd2*, l'*uromoduline* et le gène *Polaris* (Gresh et al., 2004). Une perte d'expression de *HNF1beta* entraîne l'apparition de kystes issus des tubules rénaux, qui aboutissent à une insuffisance rénale.

3) Les facteurs HNF1 sont des gènes suppresseurs de tumeurs.

a) HNF1alpha, adénomes hépato-cellulaires et autres cancers.

Le premier gène de la famille à être lié à l'apparition de cancers est HNF1alpha. Les adénomes hépato-cellulaires (HCA) sont des tumeurs hépatiques bénignes, uniques (le plus souvent) ou multiples. Elles sont souvent associées à l'usage de la pilule contraceptive, et sont donc retrouvées surtout chez les femmes. Elles présentent un risque de dégénérescence et d'évolution en carcinomes hépato-cellulaires (HCC), qui est estimé entre 5 et 7%. Cette évaluation est cependant biaisée, car elle ne concerne que les patients opérés, qui ont des adénomes d'un diamètre supérieur à 5cm. Une étude sur dix HCA a montré qu'une inactivation de HNF1alpha liée à une délétion était retrouvée dans la moitié d'entre elles (Bluteau et al., 2002). Cela souligne le rôle de HNF1alpha comme gène suppresseur de tumeur, régulant l'expression de nombreux gènes tissus-spécifiques et donc indispensable aux processus de différenciation des cellules hépatiques. En cohérence avec les critères génétiques définissant un gène suppresseur de tumeur, l'inactivation des deux allèles de HNF1alpha est nécessaire au développement tumoral (Rebouissou et al., 2005). Un sous groupe d'HCA (H-HCA) est caractérisé par une inactivation bi-allélique de HNF1alpha. Ils représentent 35 à 45% des HCA. Dans 90% des H-HCA, les mutations sur les deux allèles sont d'origine somatique. Dans les autres cas, correspondant à des patients MODY3, la mutation sur un allèle est issue de la lignée germinale, et sur l'autre allèle la mutation est d'origine somatique (Bacq et al., 2003; Bluteau et al., 2002; Reznik et al., 2004). Les H-HCA sont marqués par une stéatose importante (on les

appelle également adénomes stéatotiques), et par l'absence d'anomalies cytologiques et d'infiltrats inflammatoires (Bioulac-Sage et al., 2007; Bluteau et al., 2002; Zucman-Rossi et al., 2006). La stéatose pourrait être liée à l'inactivation d'un gène cible hépatique de HNF1alpha, L-FABP, qui joue un rôle dans le métabolisme des acides gras (Pelletier et al., 2011). Il a été montré que l'inhibition de *HNF1A* favorisait la transition épithélio-mésenchymateuse dans ces cancers (Pelletier et al., 2011).

Deux études d'association à l'échelle du génome (Genome-Wide Association Study GWAS) suggèrent une association de *HNF1A* avec des cancers pancréatiques. Les auteurs ont réalisé une étude des voies de signalisation à partir de données de GWAS concernant des tumeurs pancréatiques, qui leur a permis de mettre en évidence l'importance de gènes impliqués dans le développement pancréatique, dont HNF1alpha (Li et al., 2012; Wei et al., 2012). Des mutations mono-allélique de HNF1alpha sont observées dans 23% des cancers du colon associés à une instabilité des microsatellites. Cela suggère un éventuel mécanisme d'haplo-insuffisance dans le développement tumoral.

b) HNF1beta, cancers du rein, de la prostate, et de l'ovaire

HNF1beta est également impliqué dans des cancers touchant les tissus dans lesquels il est exprimé. Dans certains carcinomes rénaux à cellules claires, le gène est inactivé par l'association d'une mutation germinale et d'une mutation somatique sur les deux allèles. L'expression des gènes cibles PKHD1 et UMOD est fortement réduite au sein de ces tumeurs (Rebouissou et al., 2005). L'inactivation de HNF1beta est d'ailleurs un marqueur diagnostique indiquant un mauvais pronostic de l'évolution des carcinomes rénaux (Buchner et al., 2010). Plusieurs GWAS ont montré un lien entre HNF1B et des cancers de la prostate (Grisanzio et al., 2012; Gudmundsson et al., 2007; Sun et al., 2008; Thomas et al., 2008).

Récemment, Grisanzio et al ont effectué une étude fonctionnelle de l'effet de la suppression par RNAi de HNF1beta dans trois lignées cellulaires LNCaP (sensible aux androgènes), LHSAR et RWPE1 (lignées immortalisées de cellules épithéliales de la prostate). Ils ont montré que la suppression de HNF1beta résulte en une baisse importante de la prolifération et de la viabilité cellulaire (de 60 à 70%). Cela suggère que des changements dans l'expression de HNF1beta pourraient influencer le phénotype lié aux tumeurs de la prostate (Grisanzio et al., 2012).

Une étude récente a montré que HNF1beta était impliqué les carcinomes ovariens sévères, et à cellules claires. C'est d'ailleurs le premier gène de susceptibilité identifié pour ces derniers. Le Cancer Genome Atlas (TCGA) est une banque de données dans laquelle sont caractérisés notamment plus de 500 carcinomes ovariens en terme de mutations (somatiques et dans la lignée germinale), d'expression d'ARNm et de méthylation de l'ADN. L'analyse de ces données a permis de mettre en évidence des dérégulations dans l'expression de HNF1beta et

dans son profil de méthylation. Selon le type de carcinome ovarien considéré, l'expression de HNF1beta est soit éteinte (type séreux) ou augmentée (type cellules claires). Shen et al ont montré que ces dérégulations étaient liées à un mécanisme épigénétique. En effet, dans 50% carcnomes ovariens séreux, l'extinction de HNF1beta est liée à une augmentation de la méthylation du gène. Dans le cas des carcinomes à cellules claires, la sur-expression est liée à une baisse de la méthylation du gène (Shen et al., 2013).

OBJECTIFS

Le *Bookmarking* est un mécanisme épigénétique permettant la transmission de l'identité cellulaire (sous la forme d'un programme transcriptionnel spécifique) d'une génération cellulaire à l'autre. Ce processus implique l'acquisition de marques épigénétiques en cis par les gènes cibles, qui persistent à travers la mitose et permettent la réactivation transcriptionnelle après la mitose. Les mutations de *HNF1beta* sont la première cause génétique d'anomalies congénitales du rein et du tractus urinaires (CAKUT : « *Congenital Abnormalities of the Kidney and Urinary Tract* »). Elles sont également fréquemment retrouvées chez des patients souffrant d'une forme diabète monogénique de type 2 d'apparition précoce (*Maturity Onset Diabetes of the Young 5* : MODY5), souvent associé à une dysplasie et des kystes rénaux. Comme explicité précédemment, le laboratoire d'accueil a montré que HNF1beta était un facteur avec une activité de *Bookmarking*, contrôlant l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la kystogénèse. En particulier, HNF1beta est capable de rester associé à la chromatine pendant la mitose, à l'inverse de la majorité des facteurs de transcription qui sont dispersés dans le cytoplasme après la rupture de l'enveloppe nucléaire. La liaison de HNF1beta à la chromatine mitotique pourrait permettre la mise en place d'une marque épigénétique permettant la réactivation post-mitotique des gènes cibles. Le mécanisme conférant à certains facteurs de transcription spécifiques la capacité d'être présents sur la chromatine mitotique n'est pas encore très bien compris. L'affinité de la liaison de ces facteurs à l'ADN n'est pas particulièrement plus importante que celle d'autres facteurs de transcription. Il est donc possible que la capacité de lier la chromatine mitotique indispensable au *Bookmarking* soit codée dans la séquence primaire de ces protéines particulières.

L'objectif principal de ma thèse était ainsi de comprendre les mécanismes permettant l'établissement de l'activité de *Bookmarking* de HNF1beta, en caractérisant sa liaison à la chromatine mitotique. La question sous-jacente était l'importance de la localisation mitotique de HNF1beta pour l'établissement de sa fonction de *Bookmarking*. Pour étudier cette problématique, j'ai analysé l'effet de plusieurs mutations, retrouvées chez des patients MODY, sur la capacité de protéine à lier la chromatine mitotique.

MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire :

Les mIMCD3 ont été cultivées dans du milieu DMEM (Life Technologies), supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (Life Technologies) et 1% de Penicilline/Streptomycine (Life Technologies), et transfectées avec du JetPei (Polyplus Transfection). Les cellules MDCK exprimant de façon stable les protéines de fusion HNF1beta sauvage et mutantes ont été générées en utilisant le système Tet-ON T-Rex (Life Technologies). Les cellules exprimant le répresseur pcDNA6/TR, nous ont été fournies par Yasuyuki Fujita (University College, London, Royaume-Uni), et sont cultivées dans du milieu DMEM avec 10% de sérum de veau foetal et 1% de Penicilline/Streptomycine. Les constructions pcDNA4/TO/HNF1b-GFP ont été transfectées dans les MDCK-pcDNA6/TR cells en utilisant du JetPei. Après une sélection avec de la blasticidine (à 5 µg/ml) (Sigma) et de la zéocine (à 400 µg/ml) (Life Technologies), les clones ont été isolés grâce à des cylindres à clones (Fisher Scientific). L'expression des protéines de fusion avec la GFP ont été induites par addition de doxycycline (Sigma) dans le milieu de culture aux concentrations indiquées.

Plasmides:

- HNF1beta et HNF1alpha complets en fusion avec la GFP

pEGFP-HNF1alpha complet : Une PCR a été réalisée sur le plasmid HA (REFERENCE) avec les primers o5 et o6 (codons 1-628).

pEGFP-HNF1betacomplet : Une PCR a été réalisée sur le plasmid HA (REFERENCE) avec les primers o7 and o8 (codons 1-628).

Après digestion par Asp718 et NheI, les amplicons et le plasmide pEGFP-N1 (Roche), une réaction de ligation a été mise en place, avec la T4 DNA ligase (NEB).

-Fusion du domaine N-terminal de HNF1beta avec la GFP

pEGFP-HNF1beta : La partie N-terminale de HNF1beta (codon 1-313) a été amplifiée par PCR sur le plasmide VHA (REFERENCE) avec les primers o1 and o2.

pEGFP-DeltaHom: Une PCR a été réalisée sur le plasmid VHA (REFERENCE) avec les primers o1 et o3 (codon 1-236).

pEGFP-DeltaH3: Une PCR a été réalisée sur le plasmid VHA (REFERENCE) avec les primers o1 et o3 (codon 1-291).

Après digestion par Asp718 et NheI, les amplicons et le plasmide pEGFP-N1 (Roche), une réaction de ligation a été mise en place, avec la T4 DNA ligase (NEB).

-Pcdna4/TO/HNF1beta-GFP

pEGFP-HNF1beta a été digéré par NheI et NsiI et des bouts francs ont été générés par la Klenow polymérase. pcDNA4/TO a été digéré par HindIII and ApaI, et des bouts francs ont été générés par la Klenow polymérase par la T4 polymérase. A After ligation and transformation in DH5alpha cells, clones were tested by PCR. Une réaction de ligation a été mise en place, avec la T4 DNA ligase (NEB).

Primers utilisés pour le clonage

o1	GGGTCCTGCTAGCCACCATGGTGTCCAAGCTCACGTCG
o2	CCGCGGTACCAGCTTTTGCCGGAATGCCTCCTC
o3	CCGCGGTACCCCGAACCGGTTGCGGCGCATCTTCTT
o4	ACCTCAGGTACCAAGTTGGAGCCCAGGCCGTG
o5	CTGGCCATGGACACGTACAGC
o6	TGCTGGATCCTGGGAGGAAGAGGCCATCTG
o7	CGAACCACTGAATCCGCAT
o8	TAGCGGATCCCCCAGGCTTGTAGAGGACTG

-Mutagenèse dirigée

Les réactions de mutagenèse dirigée ont été réalisées avec le *QuickChange Site-directed Mutagenesis kit*. En résumé, une réaction de PCR a été réalisée sur pEGFP/HNF1beta avec les primers indiqués. Les amplicons ont été précipités en ethanol puis digérés par 1 unité de DpnI sur la nuit à 37°C, puis transformés dans des bactéries compétentes DH5alpha (Life technologies).

Primers for mutagenesis

K123E	F	CCTTGGAGGGCAGCTGAAATGATCAAGGGTTAC
	R	GTAACCCTTGATCATTTTCAGCTGCCCTCCAAGG

P256S	F	ACGATCGGCAAAGAACTCGAGCAAGGAAGAGAGAGAGG
	R	CCTCTCTCTTCTTCTGCTCGAGTTCTTTTGCCGATCGT
V265L	F	GAGAGAGAGGCCTTACTCGAGGAATGCAACAGG
	R	CCTGTTGCATTCTCGAGTAAGGCCTCTCTCTC
A271T	F	GAGGAATGCAACCGCACAGAATGTCTGCAGCGAGGGGTG
	R	CACCCCTCGCTGCAGACATTCTGTGCGGTTGCATTCCTC
C273Y	F	AATGCAACCGCGCAGAGTACTTGCAGCGAGGGGTGTCCA
	R	TGGACACCCCTCGCTGCAAGTACTCTGCGCGGTTGCATT
V278G	F	TGTTTGCAGCGAGGGGGTCCCCCTCAAAGCC
	R	GGCTTTGGAGGGGGACCCCTCGCTGCAAACA
G287S	F	TCCAAAGCCCACGGCCTGAGCTCCAAGTTGGTCACTGAG
	R	CTCAGTGACCAAAGTTGGAGCTCAGGCCGTGGGCTTTGGA

Immunofluorescence

Les cellules mIMCD3 ont été fixées dans 4% formaldéhyde (Electron Microscopy Sciences) à température ambiante pendant 15 minutes ou avec du méthanol froid à -20°C pendant 15 minutes. Après la fixation, les cellules ont été lavées 3 fois en PBS, puis perméabilisées dans du Triton-X à 0.2% pendant 5 minutes, bloquées avec du PBS 3% BSA pendant 1h à température ambiante, puis avec les anticorps anti-HNF1beta (s22840 Santa Cruz, ou v1/6-2, described in (Chouard et al., 1997)) dans la solution de blocage sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages en PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire (Alexa Fluor donkey anti-rabbit 488, Life Technologies) pendant 1h à température ambiante, et marquées avec du DAPI (Life Technologies) et les lamelles ont été montées avec du Fluoromount G (Interchim).

Videomicroscopie

Pour les expériences d'imagerie cellulaire en temps-réel, les cellules ont été cultivées dans des plaques IBIDI de 35mm, après marquage par le Hoechst 33342 (Life Technologies). Les images ont été réalisées avec un microscope Zeiss Axiovert 200M à 37°C avec 5% de CO₂. Pour les expériences de choc thermique, du milieu de culture à 4°C a été ajouté dans la plaque IBIDI pour atteindre une température d'environ 25°C. La mesure de la température a été réalisée en temps réel avec des sondes thermiques plongées au sein du milieu cellulaire. Pour les expériences de déplétion d'énergie, les cellules ont été incubées dans du DMEM sans glucose (Life Technologies) avec 10% de sérum de veau foetal, 1% de penicilline/streptomycine, 10mM

de sodium-azide (Sigma) et 6mM de 2-Deoxy-D-glucose (Sigma) pendant 30 minutes avant d'être soumises au choc thermique. L'importazole(Sigma), dilué à 100 µM dans le milieu de culture habituel, a été ajouté au milieu de culture de 5 à 10 minutes avant le choc thermique.

Immuno-précipitation de chromatine.

Les cellules ont été fixées (ou non selon les conditions) dans du méthanol froid à -20°C pendant 15 minutes, puis par du formaldéhyde à 1% dans du PBS., à température ambiante pendant 10 minutes. La réaction de fixation est quenchée par l'addition de glycine à 125mM, pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées à trois reprises dans du PBS froid, puis une fois (rapide) dans 1mL de tampon de lyse (25mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X100, 0.3% SDS, 2.5mM PMSF, Cocktail of Protease inhibitors (Roche complete) 1X). Les cellules ont ensuite été collectées par grattage, dans 250µL de tampon de lyse. Le volume de chaque lysat a été ajusté à 1mL, puis passés dans un potter dix fois, à vitesse moyenne. La sonication est effectuée dans des aliquots de 300µL, avec un sonicateur Pico Diagenode, jusqu'à une taille comprise entre 100 et 500bp. Après sonication, la chromatine a été centrifugée pendant 15 minutes à 13000 rpm. La concentration chromatinienne a été évaluée à partir d'un aliquot de 50µL, traité pendant 30minutes avec de la RNase A à 20µg/mL, puis dilué dans 200µL de tampon de *decrosslinking* (1% SDS, 0.1M NaHCO₃, 200mM NaCl), et incubé sur la nuit à 65°C. Après ajout d'EDTA à 2mM, de Tris-HCl pH6.8 à 80mM, et de protéinase K à 100µg/mL, la chromatine a été incubée pendant au moins 1 heure à 55°C. L'ADN a été collecté grâce au kit de QIAGEN *PCR purification kit*, et sa concentration a été lue au nanodrop. L'efficacité de sonication a été évaluée en soumettant 2µg d'ADN à une électrophorèse en gel d'agarose.

Après la dilution au 1/3 de la chromatine dans le tampon d'immunoprécipitation (25mM Tris-HCl pH 8.0, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X100, 0.1% SDS, 2.5mM PMSF, Cocktail of Protease inhibitors (Roche complete) 1X), entre 10 et 20 µg d'équivalents ADN ont été utilisés pour chaque CHIP, dans un volume total de 500 µl de tampon d'immunoprécipitation. Les extraits ont été pré-incubés avec 30µL de dynabeads coatées par la protéine A (Life technologies), pendant au moins 1h à 4°C sous agitation. 50µl (1/10 du volume d'immunoprécipitation) ont été mis de côté à cette étape pour servir d'INPUTS. Les extraits ont

ensuite été incubés sur la nuit à 4°C avec 4µg d'anticorps anti-HNF1beta (Santa Cruz 22840). En parallèle, les dynabeads ont été coatées sur la nuit à 4°C avec 1mg/mL de BSA dans le tampon d'immunoprécipitation, puis lavées 3 fois dans 1mL de tampon d'immunoprécipitation. 60µL de dynabeads ont ensuite été incubés avec chaque extrait pour réaliser l'immunoprécipitation, pour au moins 2h à 4°C sous agitation. Les billes ont ensuite été lavées par 5 tampons successifs, tous complétés par le Cocktail of Protease inhibitors (Roche complete) 1X : washing Buffer I (1% TRITON, 0.1% NaDOC, 150 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl pH8f), II (1% NP-40, 1% NaDOC, 150 mM KCl, 10 mM TRIS-HCl pH8), III (0.5% TRITON, 0.1% NaDOC, 500 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl pH8), IV (0.5% NP-40, 0.5% NaDOC, 250 mM LiCl, 20 mM TRIS-HCl pH8, 1 mM EDTA), V (0.1% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM TRIS-HCl pH8, 1 mM EDTA), puis une dernière fois en Tris-EDTA. Les billes (ainsi que les INPUTS) ont ensuite été éluées dans 200µL de tampon de decrosslinking avec 20µg/mL de RNase A.

Les INPUTS et les extraits ont ensuite été decrosslinkés comme décrit précédemment, mais extraits par du phénol-chloroforme, et précipités par l'éthanol. Les culots obtenus ont été resuspendus dans 50µL d'eau. L'analyse par qPCR a été réalisée en mesurant le ratio de la quantité la quantité absolue de copies, en unités arbitraires d'un site HNF1 en amont de Pkhd1 (primers: forward: AAATCCCAAACATTCTTCCAGTG, reverse: CCCTTTGAAAACAAATCACCAGAT), en comparaison avec la beta-globine (référence) primers: forward: TGCCTCCCCATATTCCCATC, reverse: GAGGGGAGGAGAGATGCAAA)

Nuclear protein extraction for EMSA:

L'expression de HNF1beta-GFP sauvage et mutants a été induite dans les cellules MDCK avec le système Tet-ON, par ajout de doxycycline dans le milieu de culture. Les cellules ont été lavées trois fois dans du PBS, puis grattées dans 1mL de PBS et centrifugées pendant 5minutes à 1500g. Le culot a été resuspendu dans 400µL de tampon A (10 mM HEPES pH 7.9; 10mM KCl; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0.5 mM PMSF, Cocktail of Protease inhibitors (Roche complete) 1X), et incubé à 4°C pendant au moins 15 minutes. 25µL de NP-40 à 10% a été ensuite ajouté à la suspension cellulaire, puis les lysats ont été centrifugés rapidement à 13,000 rpm à 4°C. Le culot de noyaux a ensuite été re-suspendu dans 50µL de tampon C (20mM HEPES

pH 7.9; 0.4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF, Cocktail of Protease inhibitors (Roche complete) 1X) à 4°, puis soumis à une forte agitation pendant 30 minutes à 4°C. La suspension a ensuite été centrifugée pendant 5 minutes à 13000 rpm, et le surnageant contenant les protéines solubles congelé à -80°C. La concentration des extraits nucléaires a été mesurée grâce au kit Biorad *DC protein assay kit*.

EMSA :

La sonde HNF1 utilisée pour étudier la liaison des protéines de liaison à l'ADN est: CTTTAGTTAATATTTGACAGTTT²³, phosphorylé avec de l'ATP-gamma-32P, grâce à la T4 Polynucléotide kinase (Promega). 2µg d'extraits nucléaire préparés comme décrit précédemment ont été utilisés pour chaque réaction de liaison, dans un tampon de liaison (HEPES 10mM, KCl 30mM, DTT 5mM, Glycerol 10%, Spermidine 9mM, MgCl₂ 9mM), avec une quantité variable de sonde HNF1, complétée par un excès entre 3 et 5 fois de sonde HNF1froide pour faciliter la saturation des protéines, dans un volume final de 20µL. Les réactions de compétition spécifiques et non-spécifiques ont été réalisées respectivement par l'ajout d'un excès de 30 fois de sonde froide HNF1, ou d'une sonde de même taille avec une séquence aléatoire (GGCTGAAGTCCAAAGTTCAGTCCCTTCGCTA). Les réactions de liaison ont été incubées sur glace ou à 40°C pendant 20minutes, puis déposées dans un gel d'acrylamide à 6%-TBE 0.25X. Les gels ont été soumis a un voltage de 130V pendant ce temps, avant le dépôt des réactions de liaison, et l'électrophorèse pendant 1h à 130V. Les gels ont été fixés dans une solution à 10% Ethanol et 10% d'acide acétique. Après séchage, les gels ont été exposés dans une cassette Amersham avec un écran *storage Phospho screen*, et révélés avec un phosphoimager de type Typhoon.

RESULTATS

1) Liaison de HNF1beta à la chromatine mitotique.

Le laboratoire d'accueil a montré précédemment, dans une lignée de cellules rénales (mIMCD3), que la partie N-terminale de HNF1beta, contenant le domaine de dimérisation et le domaine de liaison à l'ADN, en fusion avec la GFP (qui sera notée HNF1beta-GFP) était la partie minimale permettant la localisation de la protéine sur la chromatine pendant la mitose (Verdeguer et al., 2010). Le degré de localisation mitotique de HNF1beta-GFP est comparable à celui de la protéine intégrale en fusion avec la GFP (HNF1betaFL-GFP), indiquant que la rétention mitotique est codée dans la partie N-terminale de HNF1beta. HNF1alpha et HNF1beta présentent un fort taux d'homologie, notamment en termes de structure. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que HNF1alpha pourrait partager la fonction de *Bookmarking* avec HNF1beta. Nous avons donc vérifié la localisation subcellulaire de HNF1alpha pendant la mitose. La délétion du domaine C-terminal de HNF1alpha entraîne une perte partielle de la localisation nucléaire de la protéine dans les cellules interphasiques (Sourdive et al., 1993), rendant difficile l'étude de la localisation mitotique de cette partie de la protéine, à cause d'un bruit de fond important. Nous avons cependant montré que la protéine était capable, au moins partiellement, d'être localisée sur la chromatine mitotique (**Figure 23**).

HNF1beta et HNF1alpha appartiennent à la famille des facteurs de transcription POU. La superposition des structures de Pit-1, Oct-1 et HNF1alpha montre une conservation très importante de la structure tridimensionnelle, au niveau de POU comme de POUh (Chi et al., 2002). Nous avons construit des vecteurs permettant l'expression des protéines de fusion de Pit1 et d'Oct1. Pit1-GFP et Oct1-GFP présentaient une localisation nucléaire dans les cellules interphasiques. Lors de la mitose, nous avons montré que les deux protéines de fusion étaient localisées sur la chromatine mitotique (**Figure 24**). Ce résultat suggère que la fonction de *Bookmarking* semble être une caractéristique partagée par les facteurs de transcription de la famille POU.

Nous avons ensuite voulu vérifier que la localisation mitotique observée n'était pas un artefact lié à la sur-expression des protéines de fusion avec la GFP. Nous avons ainsi étudié la localisation mitotique de la version endogène de HNF1beta par immunofluorescence à la fois au sein de lignées de cellules rénales (murine : mIMCD3 et canine : MDCK) ainsi que *in vivo* au sein des reins de souris. De façon surprenante, le signal de HNF1beta, détecté, avec deux anticorps différents, était exclu de la chromatine mitotique, et dispersé dans le cytoplasme (**Figure 25B et 26**). Nous avons alors étudié l'effet des conditions de fixation sur la localisation de HNF1beta-GFP en immunofluorescence, en utilisant le même protocole de fixation que pour la détection de la protéine endogène (formaldéhyde 1% ou 4%, 15 minutes à température ambiante). Dans ces conditions, le signal GFP détecté était systématiquement exclu de la chromatine mitotique, dispersé dans le cytoplasme (ou dans un territoire péri-chromatinien) (**Figure 25A**). Cela indique que la fixation par le formaldéhyde sur des cellules mitotiques entraîne une délocalisation artéfactuelle de HNF1beta. Nous avons alors analysé l'effet d'autres types de fixation sur la

localisation mitotique de HNF1beta-GFP. Nous avons montré que la fixation en méthanol (et pas en éthanol), à -20°C pendant 15 minutes ou à température ambiante pendant 30 minutes, permettait la localisation mitotique de HNF1beta-GFP ainsi que de la protéine endogène, à la fois *in vitro* dans des lignées de cellules rénales et *in vivo* au sein de sections histologiques de rein (**Figure 28A et 28B**).

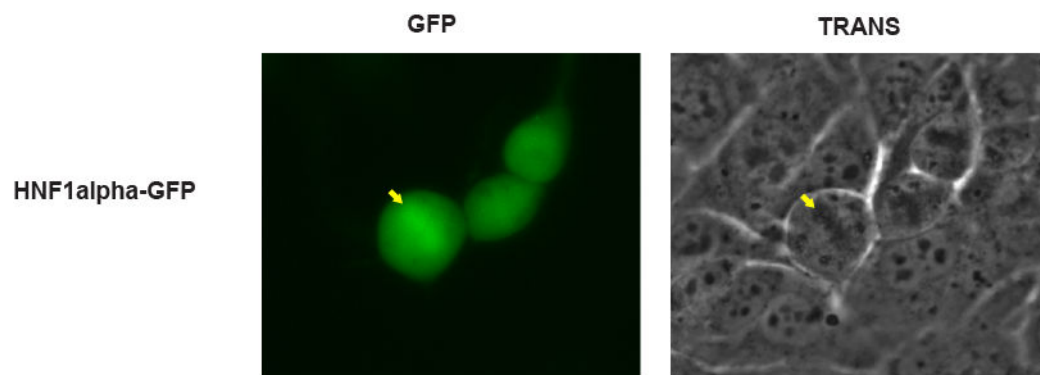


Figure 23: Liaison de HNF1alpha à la chromatine mitotique

Cellules IMCD3 vivantes transfectées avec HNF1alpha-GFP. A gauche, fluorescence verte, à droite contraste de phase. La flèche jaune indique la position de la plaque métaphasique.

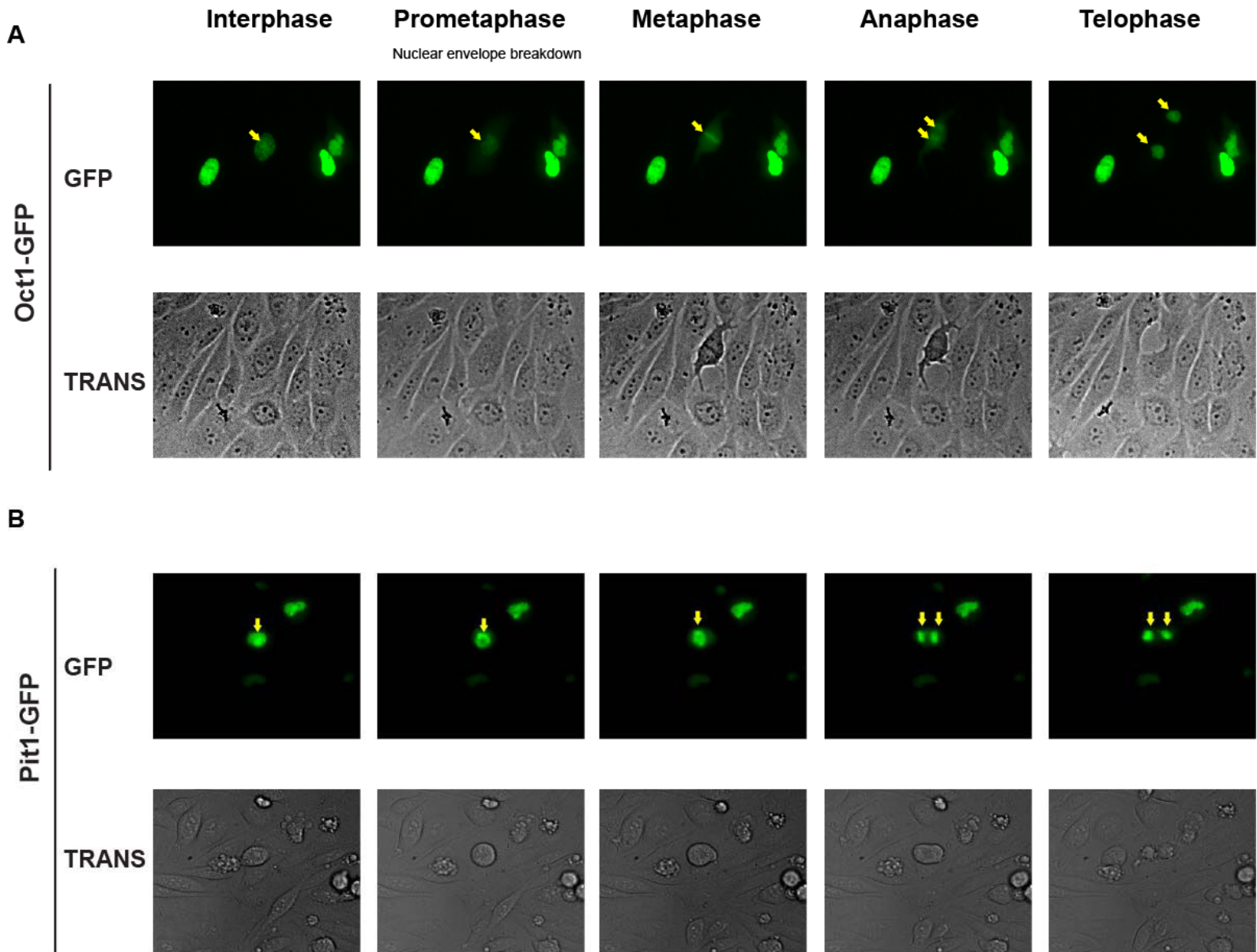


Figure 24 : Localisation de Oct-1 et de Pit-1 lors de la mitose

Cellules mitotiques IMCD3 vivantes, en fluorescence verte (GFP), et en contraste de phase (TRANS).

A: Cellules transfectées avec Oct-1-GFP

B Cellules transfectées avec Pit-1-GFP

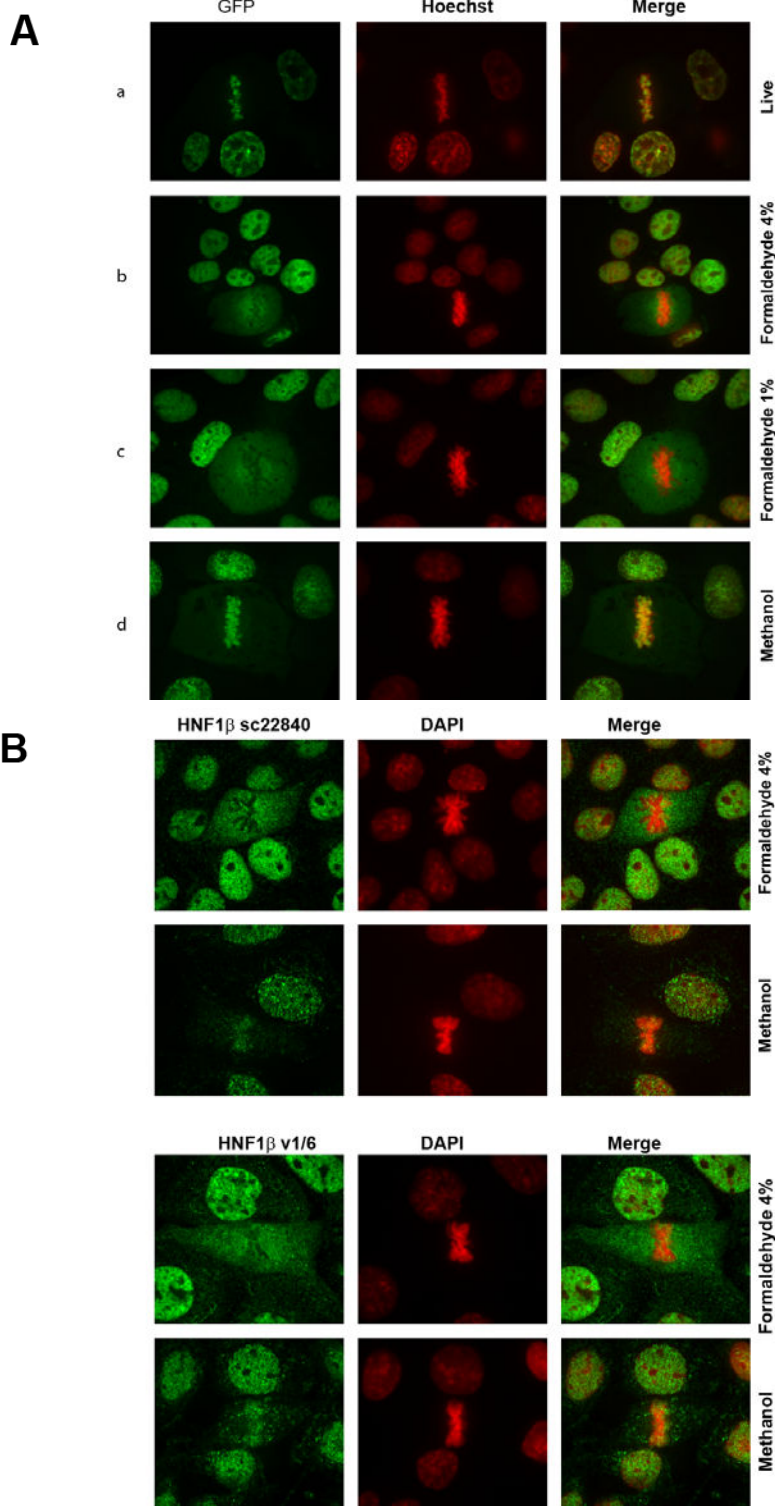


Figure 25 : Effet de la fixation sur la localisation mitotique de HNF1beta *in vitro*.

A: Cellules MDCK transfectées stables exprimant HNF1beta-GFP (en vert) sous induction par la doxycycline, et marquées par le Hoechst (en rouge) a : MDCK vivantes ; b : Cellules MDCK fixées avec 4% de formaldéhyde ; c : Cellules MDCK fixées avec 1% de formaldéhyde ; d : Cellules MDCK fixées en méthanol.

B: Cellules MDCK après immunodétection de HNF1beta endogène avec deux anticorps différents (en vert) (Santa Cruz sc22840, et v1/6 (Chouard et al., 1997)), et marquées par le Hoechst (en rouge), fixées soit en formaldéhyde 4%, soit en méthanol, comme indiqué.

Formaldehyde fixation Methanol fixation

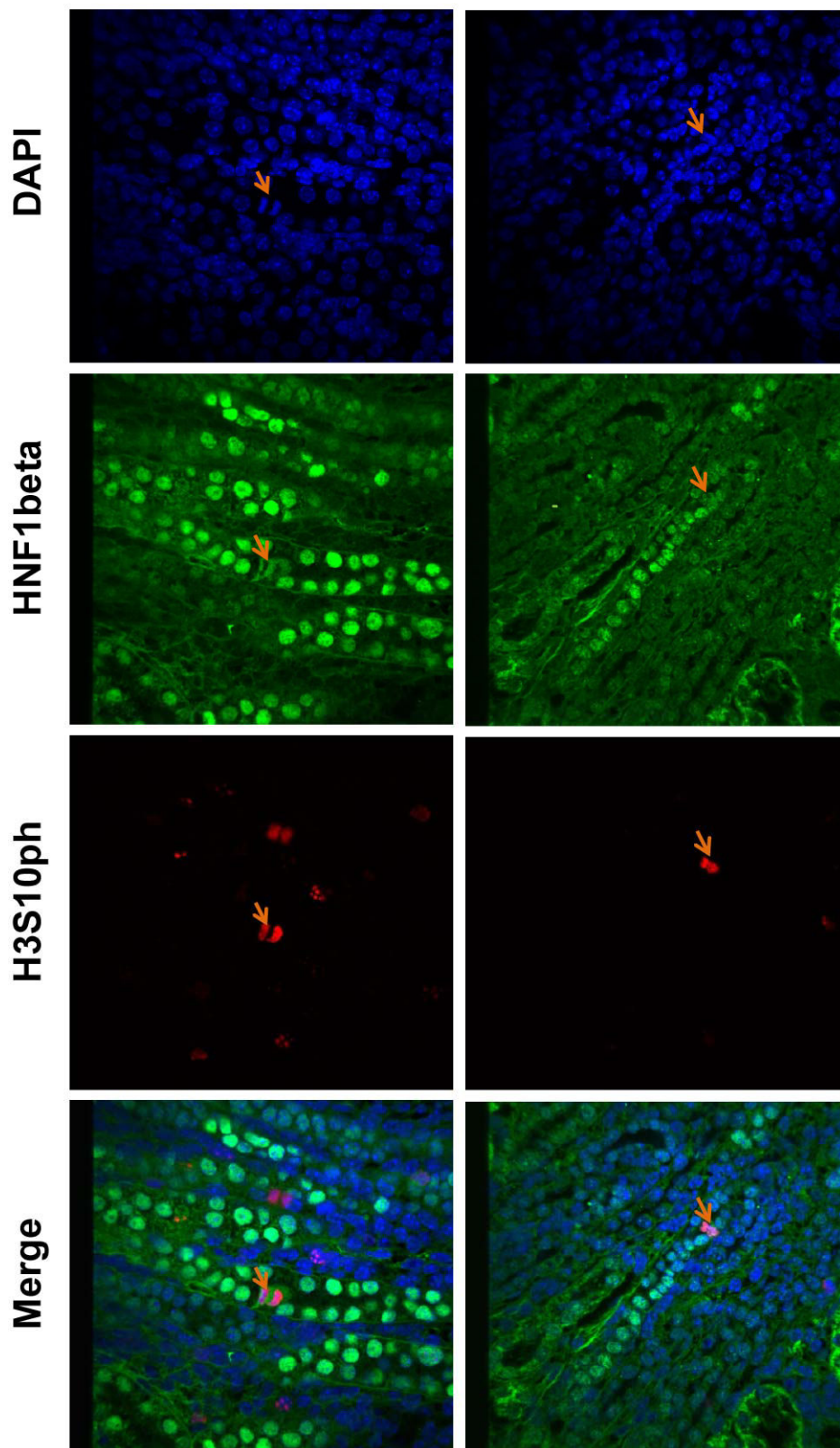


Figure 26 : Effet de la fixation sur la localisation mitotique de HNF1beta *in vivo*.

Coupe de reins murins fixés, soit en formaldéhyde (à gauche), soit en méthanol (à droite), avec immunodetection de HNF1beta (signal vert), et de la Serine 10 Phosphorylée de Histone H3 (H3S10ph, signal rouge), ainsi qu'un marquage au DAPI (signal bleu). Les flèches orange indiquent les cellules mitotiques. Vue en microscopie confocale pour toutes les images.

La localisation mitotique observée aurait pu être liée soit à une interaction directe et séquence-spécifique avec la molécule ADN, soit au contraire il s'agit d'une association globale non séquence-spécifique avec la chromatine. Afin de discriminer ces possibilités, nous avons étudié l'effet sur la localisation mitotique de mutations supprimant la capacité de HNF1beta à lier l'ADN. La première mutation étudiée consistait en la délétion du POUh entier sur HNF1beta-GFP (deltaHom). En interphase, la mutation deltaHom n'entraînait pas de défaut de localisation nucléaire de la protéine. Au moment de la mitose en revanche, aussitôt que l'enveloppe nucléaire est rompue lors de la prométaphase, le mutant deltaHom est dispersé dans le cytoplasme. Ce résultat indique que la perte de son homéo-domaine empêche HNF1beta d'être localisé sur la chromatine mitotique. La troisième hélice alpha du domaine POUh de HNF1beta interagit directement avec les bases et le squelette phospho-carboné du grand sillon de l'ADN, et présente donc une importance cruciale pour la liaison de HNF1beta à l'ADN. Nous avons étudié par vidéo-microscopie l'effet d'une délétion moins drastique que deltaHom, restreinte à la troisième hélice alpha de POUh sur HNF1beta-GFP (deltaH3), provoquant la perte de la liaison à l'ADN (**Figure 27A et 27B**). Nos résultats montrent que le mutant deltaH3 présente le même comportement de dispersion cytoplasmique après la rupture de l'enveloppe nucléaire que le mutant deltaHom (**Figure 27C**). Les délétions d'une partie importante d'une protéine, à l'image de deltaHom et de deltaH3, peuvent entraîner l'apparition de défauts conformationnels majeurs dans la structure des protéines. Cela aurait pu potentiellement prévenir la localisation mitotique de la protéine, de façon indépendante de la perte de la liaison à l'ADN. Nous avons décidé pour éclaircir ce point d'étudier l'effet de mutations moins drastiques, en l'occurrence des mutations ponctuelles faux-sens.

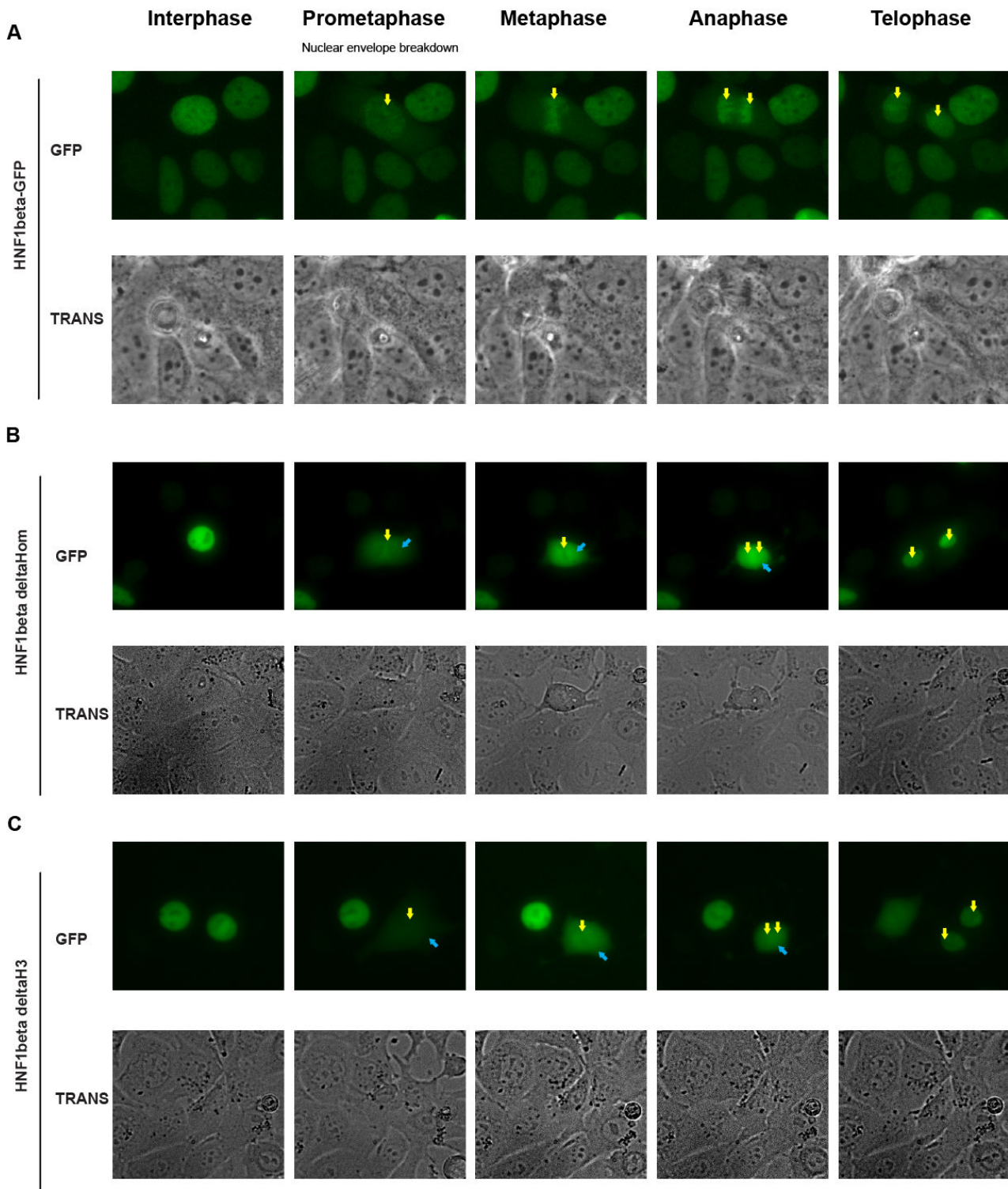


Figure 27 : Les mutations affectant la liaison à l'ADN perturbent la localisation mitotique de HNF1beta.

Cellules mitotique IMCD3 vivantes, en fluorescence verte (green), et en contraste de phase (trans).

A: Cellules transfectées stables avec HNF1beta-GFP.

B : Cellules transfectées avec le mutant deltaHom.

C: Cellules transfectées avec le mutant deltaH3.

Les flèches jaunes indiquent la position de la plaque métaphasique, les flèches bleues la dispersion mitotique du signal.

2) Certaines mutations MODY affectent la liaison à la chromatine mitotique, et sont thermosensibles.

Des mutations de *HNF1beta* (MODY5) et de *HNF1alpha* (MODY3) sont fréquemment retrouvées chez des patients diabétiques et souffrants de kystes rénaux. Un grand répertoire de mutations faux-sens sur *HNF1alpha* et *HNF1beta* entraîne l'apparition chez les patients d'un phénotype comparable à celui de souris déficientes pour *Hnf1a* ou *Hnf1b*. Cela suggère que les mutations identifiées chez ces patients entraînent la perte de la fonction de HNF1alpha ou HNF1beta. Un grand nombre de mutations ont été identifiées dans la partie N-terminale de HNF1beta, qui confère la liaison à l'ADN et à la chromatine mitotique. Nous ne pouvons pas exclure que certaines mutations entraînent une perte spécifique de l'activité de *Bookmarking* de HNF1alpha et HNF1beta. Nous avons ainsi sélectionné un ensemble de mutations touchant des résidus conservés entre HNF1alpha et HNF1beta et au cours de l'évolution, et les avons introduites dans HNF1beta-GFP par mutagenèse dirigée. Nous avons exclu de notre sélection les mutations touchant des acides aminés directement impliqués dans la liaison à l'ADN.

Nous avons analysé l'effet d'un panel de mutations MODY sur la localisation de HNF1beta-GFP en mitose avec les lignées de MDCK transfectées de façon stable avec un système Tet-ON inductible. Les protéines mutantes étudiées présentaient toutes une localisation nucléaire normale, ainsi que des taux d'expression comparables à la protéine sauvage en Western Blot avec un anticorps anti-GFP, indiquant l'absence de défauts majeurs dans la stabilité de ces mutants. De façon intéressante, les mutations K123E, A271T, et C273Y entraînent une délocalisation significative de HNF1beta-GFP dans le cytoplasme pendant la mitose. D'autres mutants, comme P256S ou V265L étaient complètement exclus de la chromatine mitotique (**Figure 28**). Nous avons ensuite concentré notre étude sur les mutants P256S, V265L et C273Y, et avons montré qu'ils ne présentaient pas de défaut de stabilité visible en Western Blot (**Figure 29**). Nous avons montré qu'il existait une différence significative dans la localisation cellulaire en mitose de HNF1beta sauvage et de certains mutants MODY. En effet, le degré d'association entre la protéine de fusion et la chromatine mitotique a été quantifiée avec un algorithme permettant d'étudier la co-localisation du signal GFP et du signal DAPI sur un axe perpendiculaire à la plaque métaphasique (*Intensity Coefficient Quotient*) (Li et al., 2004) (**Figure 29**). Ces résultats indiquent que les mutations MODY sélectionnées entraînent une altération de la localisation mitotique de HNF1beta GFP. Nous avons également testé l'effet cumulatif de mutations. La présence d'une double mutation K123E (touchant la partie POUh) et C273Y sur HNF1beta-GFP entraînait une délocalisation mitotique, supérieure à celle entraînée par les mutants seuls.

De façon remarquable, l'effet de certaines mutations MODY sur la localisation de HNF1beta-GFP sur la chromatine mitotique est sensible aux conditions de température. La localisation mitotique de HNF1beta-GFP sauvage est stable dans une large gamme de

température allant de 20°C à 40°C (**Figure 30**). Au contraire, les mutants présentent un degré de perte de localisation mitotique variable sous l'effet de la température. Par exemple, les mutants P256S et V265L sont intégralement dissociés, et même exclus de la chromatine mitotique à une température supérieure à 32°C (température restrictive) (Figure 6B et 6C). En dessous de cette température de commutation (température permissive), les mutants P256S et V265L sont associés à la chromatine mitotique (**Figure 31**) une gamme allant de 32 à 38°C. Les variations de températures entraînent ainsi une translocation des mutants entre le cytoplasme et les chromosomes mitotiques. Cette transition présente un caractère très dynamique, marqué par une cinétique très rapide. En effet, nous avons mené des expériences de microscopie en temps-réel, avec des capteurs de température, qui ont indiqué que les mutants thermosensibles sont relocalisés sur la chromatine mitotique en quelques secondes après une chute soudaine de la température, ou au contraire rapidement dispersés dans le cytoplasme après une élévation de température. A température restrictive, on peut noter que les mutants thermosensibles présentent une localisation nucléaire parfaite. Cependant, nous avons noté des différences dans la granulosité nucléaire entre HNF1beta-GFP sauvage et mutants. En effet les mutants P256S et V265L présentent une granulosité moins importante à température restrictive, en comparaison avec HNF1beta-GFP sauvage. A température permissive, la granulosité de ces deux mutants retrouvait un caractère comparable à la protéine sauvage, en fusion avec la GFP, ainsi qu'à la protéine endogène en immuno-fluorescence.

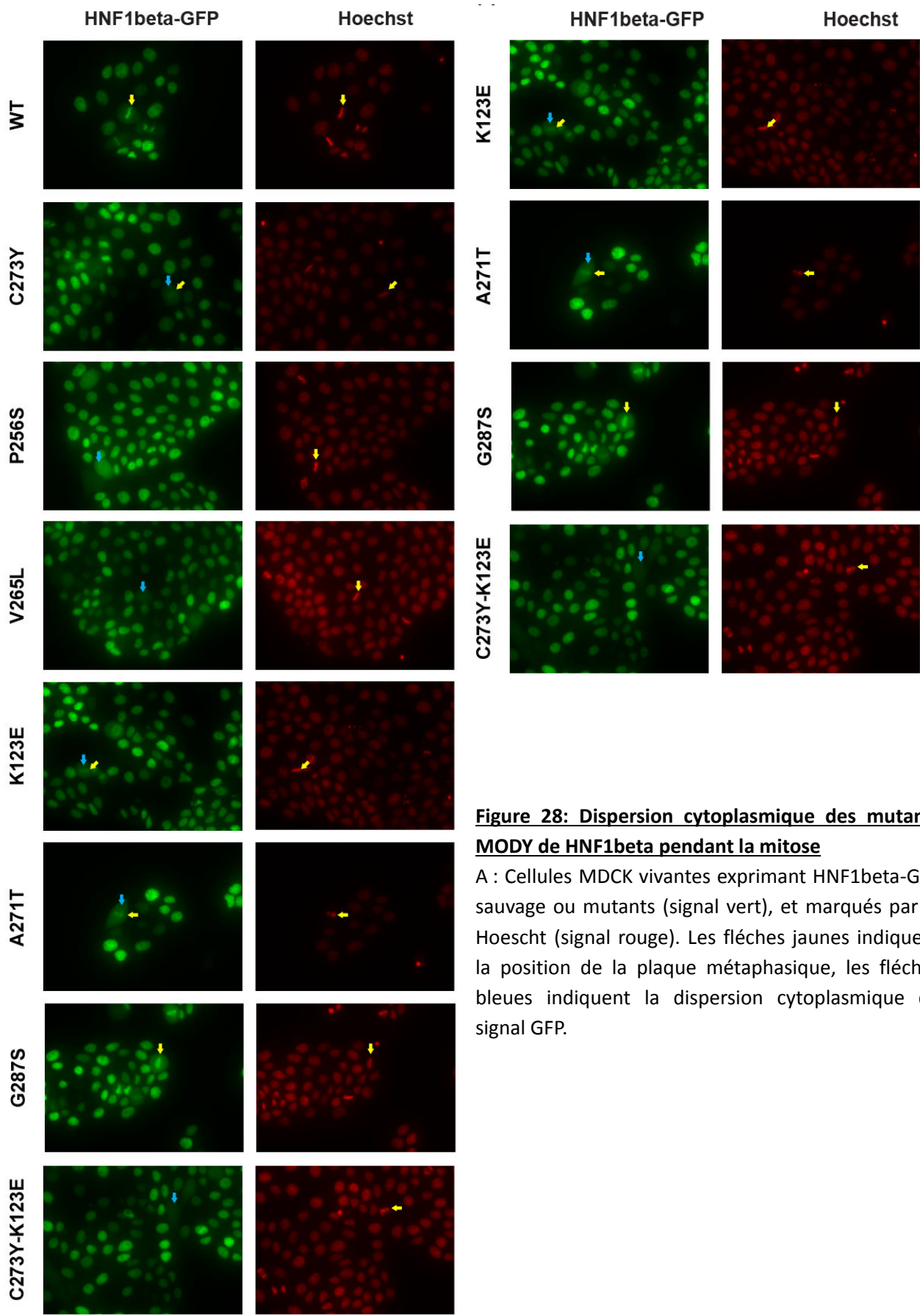
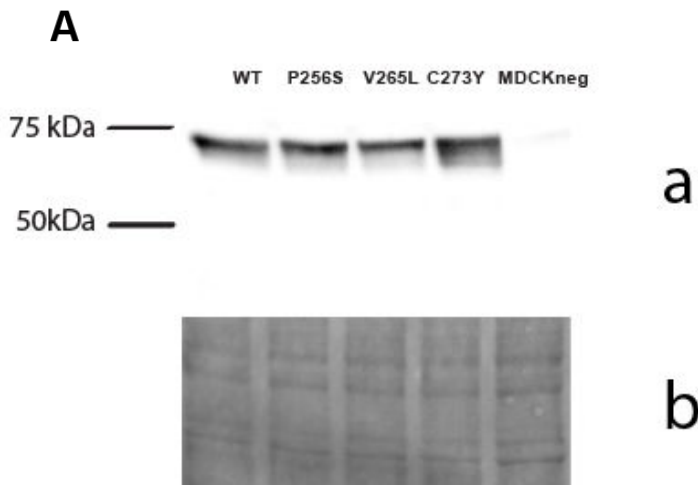


Figure 28: Dispersion cytoplasmique des mutants MODY de HNF1beta pendant la mitose

A : Cellules MDCK vivantes exprimant HNF1beta-GFP sauvage ou mutants (signal vert), et marqués par le Hoescht (signal rouge). Les flèches jaunes indiquent la position de la plaque métaphasique, les flèches bleues indiquent la dispersion cytoplasmique du signal GFP.

B



B

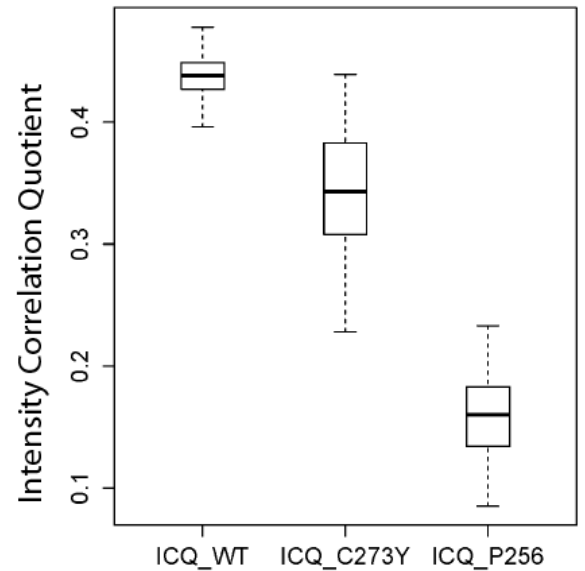


Figure 29: Stabilité des mutants de HNF1beta P256S, V265L et C273Y et quantification de la dispersion cytoplasmique pendant la mitose.

A : a : Western blot avec un anticorps anti-GFP (ab290) sur des extraits nucléaires issus de cellules exprimant HNF1beta-GFP sauvage ou P256S, V265L, C273Y. La protéine de fusion a un poids moléculaire de 70kDa environ. MDCKneg : cellules MDCK non transfectées. b : marquage au Rouge Ponceau montrant un taux similaire de protéine dans chaque puits.

B: "Intensity Correlation Quotient" (Li et al., 2004) des signaux GFP et DAPI, calculés pour des cellules MDCK en métaphase, pour les versions sauvage, C273Y et P256S de HNF1beta-GFP. Pour HNF1beta-GFP sauvage, n= 37 ; pour HNF1beta-GFP C273Y et P256S, n= 35.

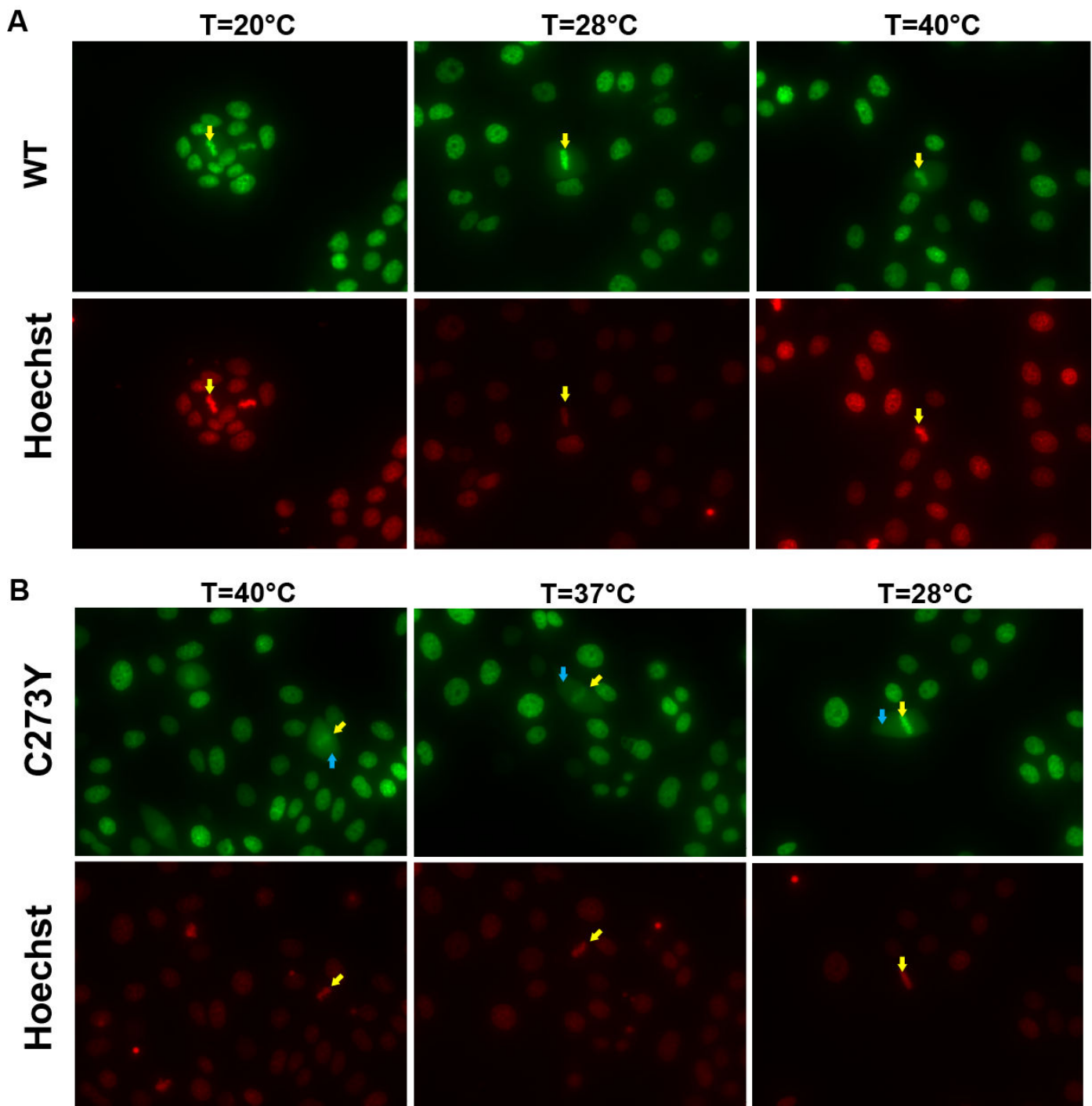


Figure 30 : Thermosensibilité du phenotype du mutant MODY C273Y.

Cellules MDCK exprimant HNF1beta-GFP sauvage/mutant C273Y de façon stable (signal vert), marquées avec du Hoechst (signal rouge). Les flèches jaunes indiquent la position des plaques métaphasiques, les flèches bleues indiquent la dispersion des protéines de fusion avec la GFP dans le cytoplasme des cellules mitotiques.

A : Cellules exprimant HNF1beta-GFP sauvage exposées à différentes températures.

B : Cellules exprimant HNF1beta-GFP portant la mutation C273Y exposées à différentes températures.

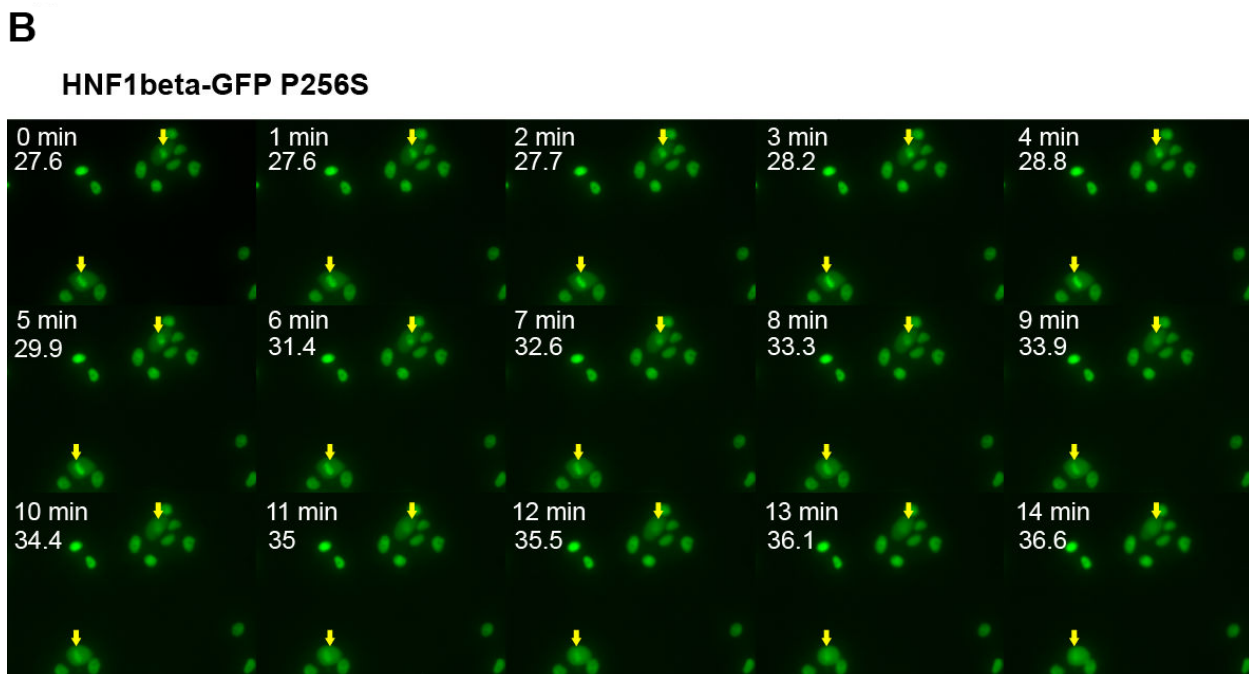
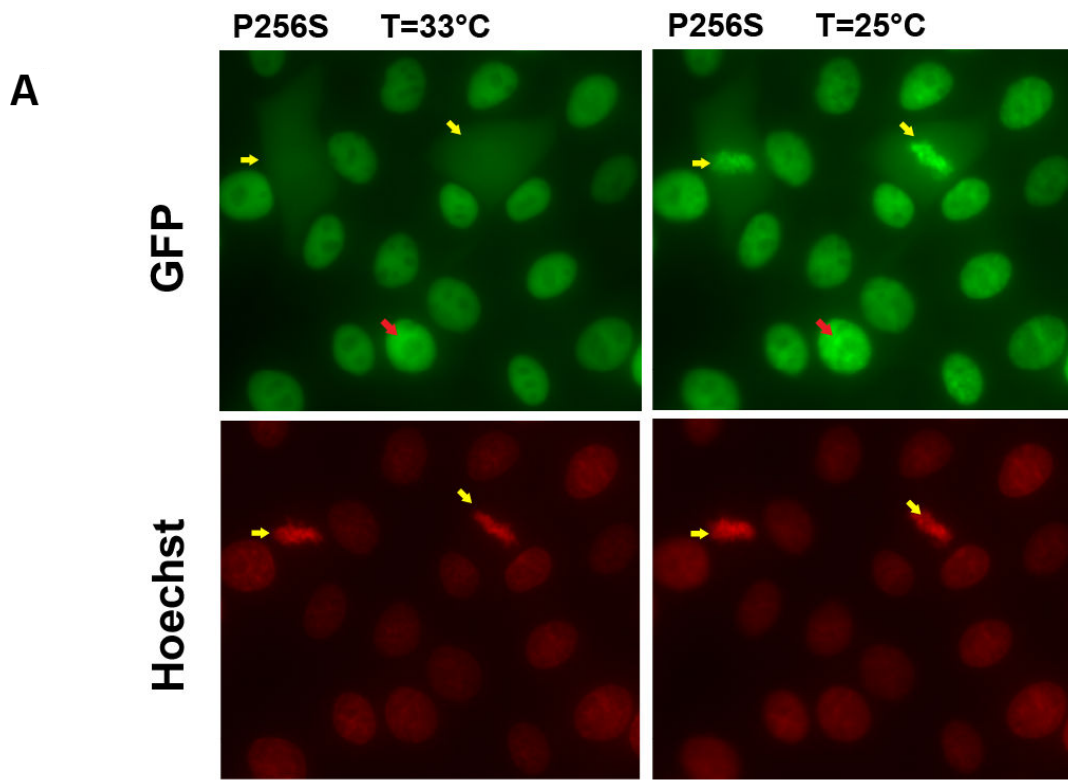


Figure 31 : Thermosensibilité du phenotype des mutants MODY.

A: Cellules exprimant HNF1beta-GFP portant la mutation P256S soumises à une baisse soudaine de température de 33°C à 25°C (mesurée dans le milieu), avec un intervalle de 1 minute. Les flèches jaunes indiquent la position des plaques métaphasiques, les flèches rouges indiquent des différences dans la granulosité du nucléoplasme, aux deux températures.

B: Délocalisation progressive du mutant P256S de HNF1beta-GFP après augmentation de la température. Les flèches jaunes indiquent la position des plaques métaphasiques.

3) Le recrutement de HNF1beta sur la chromatine mitotique est affecté par la déplétion en énergie et par l'importazole.

Nous avons utilisé la nature thermosensible des mutations MODY étudiées afin de caractériser certains aspects du recrutement de HNF1beta sur la chromatine mitotique. Nous voulions tout d'abord comprendre dans quelle mesure la rétention mitotique de HNF1beta impliquait un mécanisme énergie-dépendant. Nous avons ainsi mesuré la vitesse de relocalisation des mutants P256S et V265L dans des cellules ayant subi une privation énergétique grâce à l'usage d'un milieu de culture contenant du sodium-azide et du désoxy-glucose, pendant une période de temps courte (30 minutes), permettant de limiter la toxicité inhérente à ce protocole. La localisation nucléaire des protéines de fusion avec la GFP n'était pas affectée par le traitement, comme la localisation de la version sauvage de HNF1beta-GFP sur la chromatine mitotique (**Figure 32**). Nous avons étudié la vitesse de la relocalisation des protéines mutantes suivant une baisse subite de la température permettant de passer d'une température restrictive à une température permissive. Nous avons observé une diminution significative dans la vitesse de relocalisation des mutants sur la chromatine mitotique, ainsi qu'une baisse substantielle de la capacité maximale de recrutement (**Figure 32**). Cela indique que le recrutement de HNF1beta sur la chromatine mitotique n'est pas un simple processus passif, mais nécessite un mécanisme dépendant de l'énergie.

Le cycle de la Ran-GTPase joue un rôle essentiel dans le transport de protéines entre le cytoplasme et le nucléoplasme. Ran permet la régulation des interactions entre les protéines cargos et les protéines responsables du transport nucléaire de la famille de l'importine-beta. La fonction de Ran est établie grâce à l'anisotropie de la distribution de la forme Ran-GTP, réalisée par le facteur d'échange de GTP RCC1, associé avec la chromatine durant l'interphase et la mitose. Ainsi, dans le noyau, à proximité des chromosomes et de RCC1 se trouve une forte concentration de Ran-GTP qui diminue en s'éloignant dans le cytoplasme (Kalab et al., 2002). Il a été montré de façon intéressante que RCC1 et le système de transport lié à l'importine-beta avait un rôle important pendant la mitose, en permettant le recrutement de facteurs nécessaires à l'assemblage du fuseau mitotique, à la condensation des chromosomes. Nous avons étudié l'effet d'une inhibition partielle de l'importine-beta par un inhibiteur spécifique, l'importazole (Soderholm et al., 2011), sur le recrutement des mutants thermosensibles après une chute de la température. Nous avons traité les cellules pendant des courtes périodes de temps (5-10 minutes) juste avant observation, afin d'éviter l'effet toxique de la drogue vis-à-vis du déclenchement de la mitose, et de pouvoir observer des cellules déjà engagées dans la division cellulaire. Nos résultats montrent que ce court traitement n'interférait pas avec la localisation nucléaire des versions sauvages et mutantes de HNF1beta-GFP (**Figure 33**). Cependant, après un choc thermique, la cinétique de recrutement des mutants était fortement diminuée, ainsi que son taux global, indiquant que le système importine-beta semble impliqué dans le recrutement mitotique de HNF1beta (**Figure 33**).

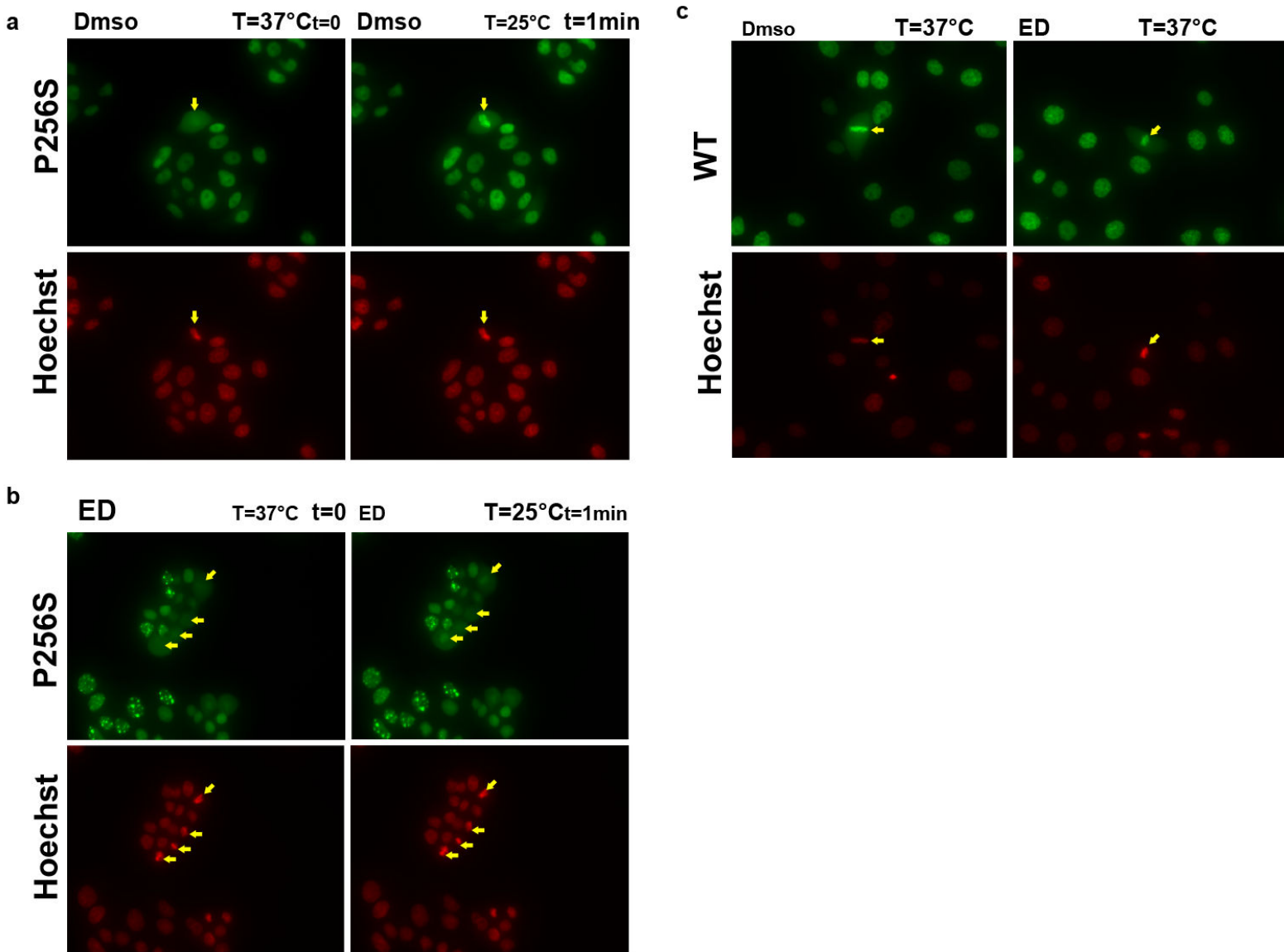


Figure 32 : La relocalisation mitotique de HNF1beta est sensible à la depletion en énergie

Cellules MDCK vivantes exprimant HNF1beta-GFP sauvage ou le mutant P256S (signal vert), marquées avec du Hoechst (signal rouge). Les flèches jaunes indiquent la position des plaques métaphasiques. Cellules exprimant le mutant P256S exposées soit à un traitement par le DMSO (a), soit à un milieu de déplétion en énergie (ED). Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont soumises à un choc thermique, diminuant la température du milieu de culture de 37°C à 25°C (b). En (c), les cellules exprimant HNF1beta-GFP sauvage sont exposées à un choc thermique, soit après incubation avec du DMSO, soit après incubation avec le milieu ED.

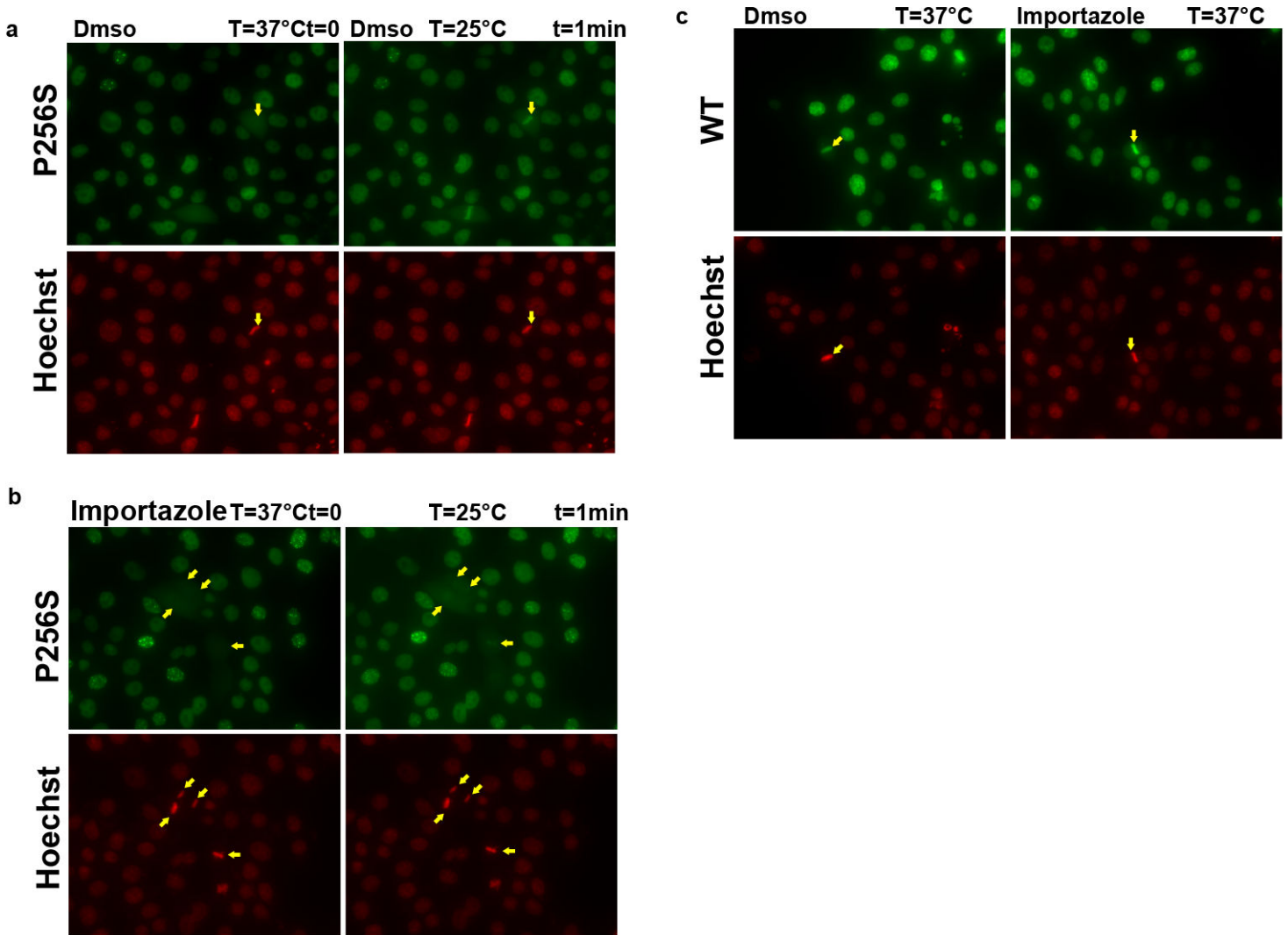


Figure 33 : La relocalisation mitotique de HNF1beta est sensible à l'importazole.

Cellules MDCK vivantes exprimant HNF1beta-GFP sauvage ou le mutant P256S (signal vert), marquées avec du Hoescht (signal rouge). Les flèches jaunes indiquent la position des plaques métaphasiques.

B : Cellules exprimant le mutant P256S exposées soit à un traitement par le DMSO (a), soit à un l'importazole. Après 5-10 minutes d'incubation, les cellules sont soumises à un choc thermique, diminuant la température du milieu de culture de 37°C à 25°C (b). En (c), les cellules exprimant HNF1beta-GFP sauvage sont exposées à un choc thermique, soit après incubation avec du DMSO, soit après incubation avec l'importazole.

L'effet de la transition de température sur la liaison à la chromatine mitotique suggère que les mutations MODY étudiées pourraient induire des changements conformationnels affectant la capacité de HNF1beta à lier la chromatine mitotique. Afin de tester cette hypothèse, nous avons évalué la capacité des mutants MODY à se lier à l'ADN dans des expériences de retard sur gel, en condition de température contrôlée. La production de protéines purifiées recombinantes de fusion de l'extrémité N-terminale de HNF1beta avec la GST a résulté dans un défaut de dimérisation entraînant une faible affinité pour l'ADN. Nous avons donc développé un protocole permettant d'estimer par EMSA le Kd à l'équilibre des versions sauvage et mutantes de HNF1beta-GFP à partir d'extraits nucléaires, en l'absence de compétiteurs nucléotidiques non-spécifiques (poly dIdc ou *salmon sperm DNA*). Notre protocole nous a permis d'observer un retard spécifique de la sonde radioactive, comme le montre la réduction de la quantité de sonde en complexe avec HNF1beta lors d'une expérience de compétition spécifique avec un excès de 30 fois de sonde HNF1 froide (et l'absence d'effet d'un excès d'une sonde froide aléatoire) (**Figure 34**).

Nos résultats indiquent que lorsque les complexes ADN-protéines étaient séparés par électrophorèse à basse température (4°C), la liaison à l'ADN des mutants P256S et V265L était réalisée avec des caractéristiques similaires à celles de la protéine sauvage (**Figure 35**). Au contraire, la même expérience de gel retard réalisée à une température restrictive (40°C) entraînait l'absence de bandes de retards correspondant à une liaison des deux mutants à la sonde radioactive, tandis que HNF1beta-GFP sauvage conservait sa capacité de liaison (**Figure 36**). La perte de la capacité de liaison à l'ADN n'était pas due à un évènement irréversible, comme une dégradation de la protéine, car les extraits incubés 20minutes à 40°C puis refroidis et subissant une électrophorèse à faible température donnent lieu à l'observation de profils de retards normaux (**Figure 36**). De plus, un western blot réalisé sur ces extraits, (chauffés ou non) montre un niveau équivalent de protéine HNF1beta sauvage et mutantes (**Figure 36**).

Ces résultats suggèrent qu'à température restrictive, le mutant P256S subit un changement conformationnel réversible entraînant la perte de la capacité à lier l'ADN. Dans ces conditions, de la même façon que les mutants deltaH3 et deltaHom, la perte de la liaison à l'ADN entraîne la dispersion cytoplasmique des mutants pendant la mitose. Ce résultat souligne encore le caractère indispensable de la liaison à l'ADN pour la rétention mitotique de HNF1beta. De façon intéressante, pour un des mutants MODY que nous avons caractérisé, C273Y, la perte de la rétention chromosomique pendant la mitose n'est pas corrélée à une perte de liaison à l'ADN, puisque les expériences de gel-retard menées sur des extraits nucléaires avec des quantités croissantes de sonde radioactive, en l'absence de compétiteurs non-spécifiques ont montré un Kd apparent comparable à celle de la protéine sauvage, à température permissive comme restrictive (**Figure 36**).

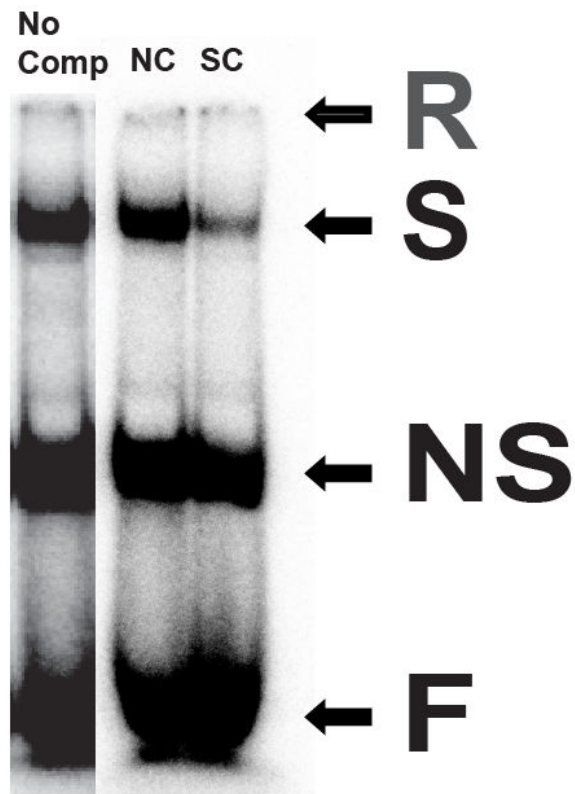


Figure 34: Retard sur gel spécifique réalisé avec HNF1beta-GFP sauvage, en l'absence de compétiteur non-spécifique.

L'expérience de retard sur gel a été réalisée en utilisant 2µg d'extraits nucléaires et 2.5ng de sonde double brin radioactive. "R" indique la position du fond des puits, "S" indique la position du bandshift spécifique, "NS" correspond au bandshift non-spécifique (en l'absence de compétition avec des compétiteurs non-spécifiques), "F" correspond à la fraction non-liée.

Nous avons mis au point des conditions expérimentales permettant d'observer un bandshift spécifique avec des extraits en l'absence de compétiteur non spécifique type Poly dIdC ou Salmon sperm DNA (No comp). NC : compétition avec une sonde arbitraire froide de 25bp, avec un excès de 30 fois par rapport à la sonde HNF1 radioactive. SC : compétition avec la sonde HNF1 froide, avec un excès de 30 fois par rapport à la sonde HNF1 radioactive.

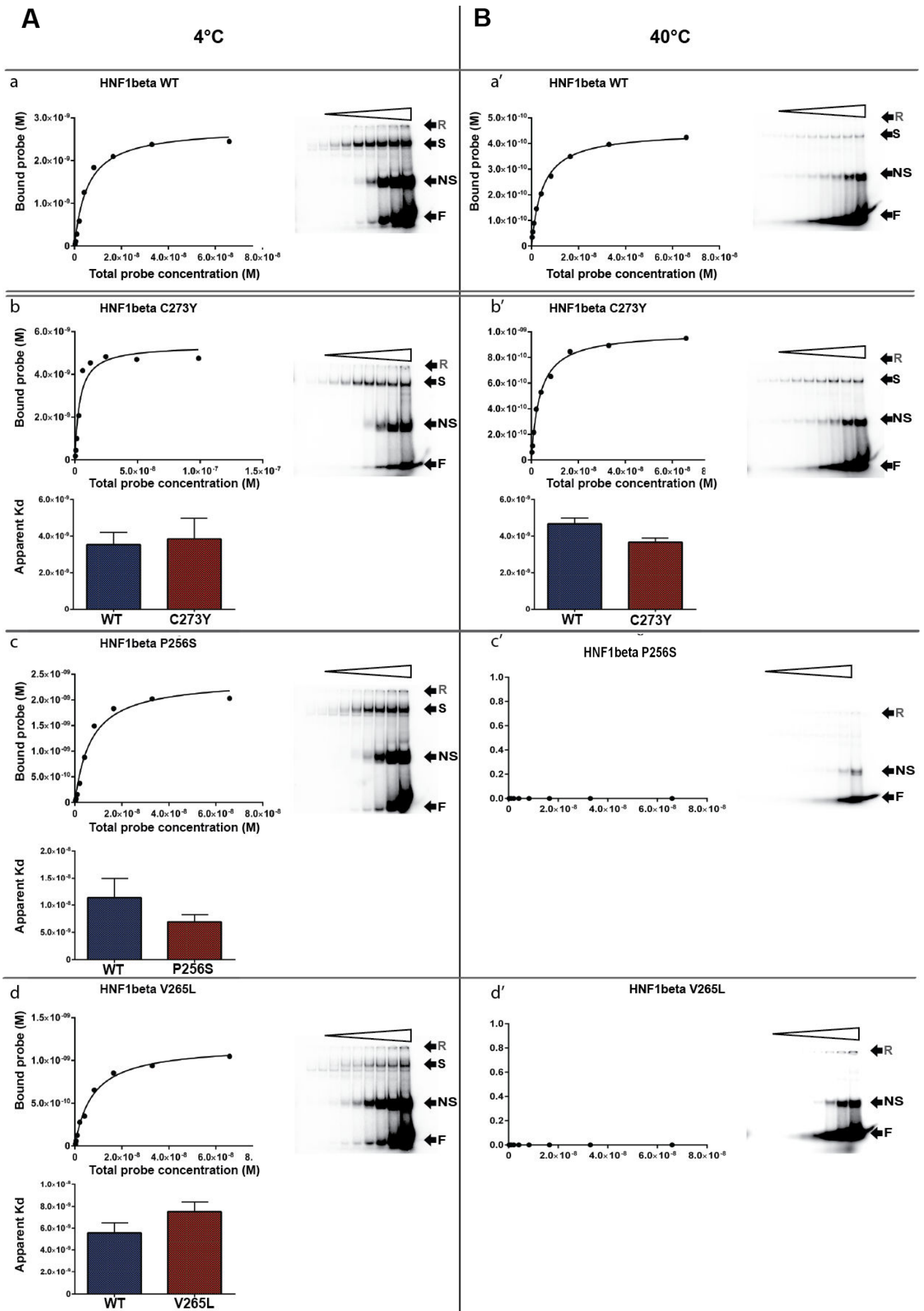


Figure 35: Effet de la température sur l'affinité pour l'ADN des mutants MODY.

Des expériences de retard sur gel ont été réalisées en utilisant 2 μ g d'extraits nucléaires et une quantité variable de sonde double brin radioactive, comme dans la figure 34. "R" indique la position du fond des puits, "S" indique la position du bandshift spécifique, "NS" correspond au bandshift non-spécifique (en l'absence de compétition avec des compétiteurs non-spécifiques), "F" correspond à la fraction non-liée. Dans le panneau A, les réactions de liaison ont été réalisées sur glace, et l'électrophorèse a été réalisée et migrée en chambre froide. Dans le panneau B, les réactions de liaison ont été mises en place à 40°C, et l'électrophorèse a été réalisée avec un gel d'acrylamide et un tampon de migration préchauffés, dans un incubateur à 40°C. L'intensité des bandes a été mesurée en mesurant l'intégrale du signal S et F. Les courbes de saturation ainsi établies ont été analysées par *fitting* avec le logiciel Graphpad prism pour déterminer un Kd apparent pour le mutant HNF1beta-GFP mutant et pour HNF1beta-GFP sauvage, dans une expérience réalisée en parallèle.

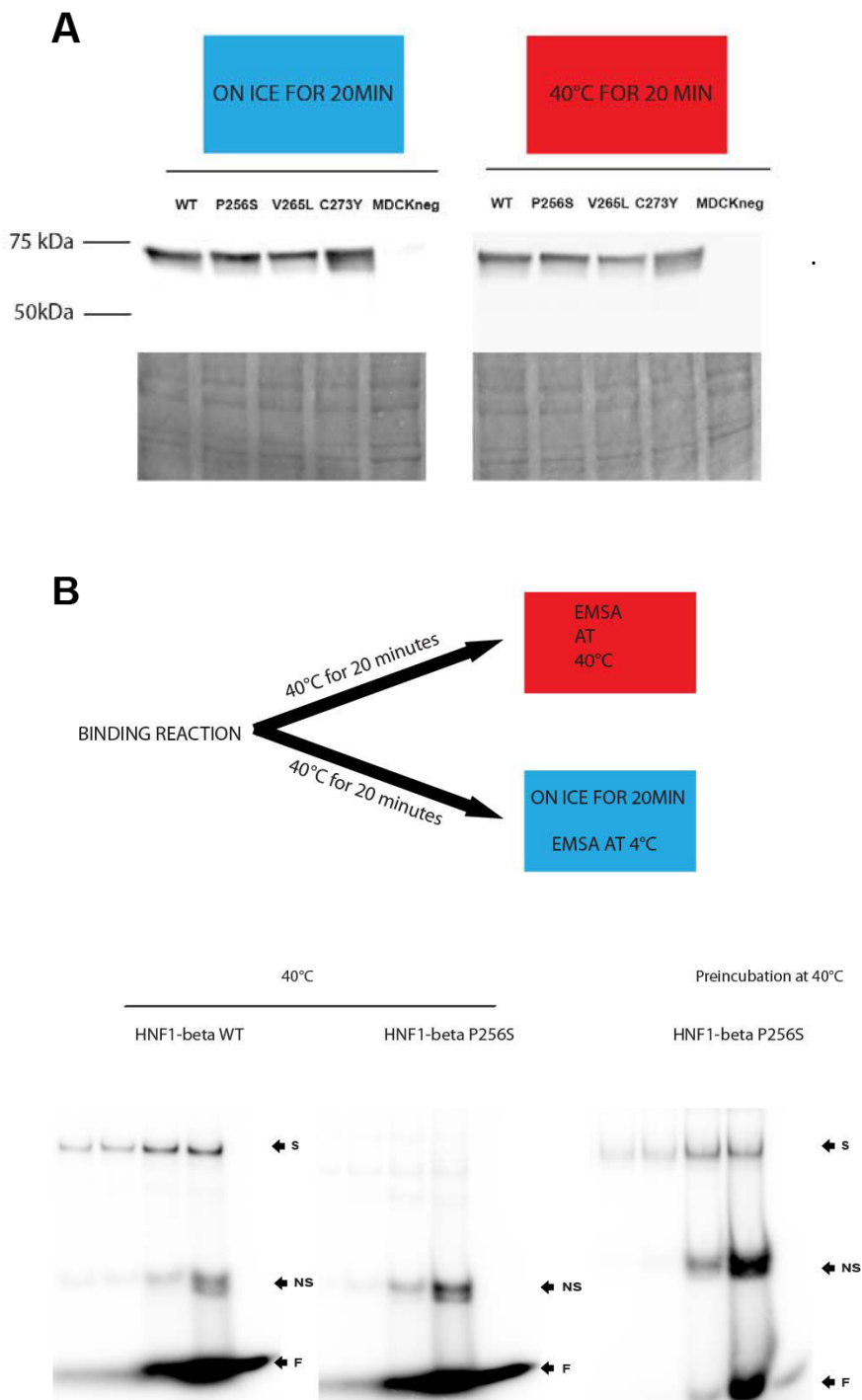


Figure 36 : La capacité de liaison à l'ADN des mutants MODY est thermo-sensible.

A: La stabilité de la protéine n'est pas affectée par les changements de température. Les extraits protéiques contenant HNF1beta-GFP ont été soit incubés sur glace, soit à 40°C pendant 20 minutes, puis directement resuspendus dans le Laemlii buffer, et bouillis pendant 5 minutes. HNF1beta a été détecté avec un anticorps anti-GFP (ab290) par Western Blot. La coloration au rouge Ponceau indique que les quantités de protéines pour chaque extrait sont comparables.

B : Un gel retard a été réalisé avec le même protocole (3µg d'extrait protéique). La moitié de la réaction de liaison a été utilisée pour réaliser un EMSA à 40°C, et l'autre moitié pour un EMSA à 4°C. Un EMSA à 40°C a été réalisé en parallèle avec HNF1beta-GFP sauvage.

4) Liaison séquence-spécifique de HNF1beta à la chromatine mitotique.

Nous avons ensuite procédé à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) afin de vérifier si HNF1beta interagissait avec la chromatine mitotique spécifiquement sur des sites génomiques particuliers. Nous nous sommes interrogés sur le possible effet de la fixation en formaldéhyde sur l'immunoprécipitation de HNF1beta au sein des cellules mitotiques, vu que ce type de fixation entraîne une délocalisation artefactuelle de la protéine des chromosomes mitotiques, et pourrait résulter en un biais empêchant significativement la détection de la liaison de la protéine à la chromatine mitotique par ChIP. Nous avons pu montrer que lorsque les cellules étaient préfixées avec du méthanol, le *cross-linking* par le formaldéhyde n'entraînait plus de la délocalisation mitotique de HNF1beta-GFP en immunofluorescence (**Figure 37**). D'autre part, nous avons pu montrer que si la fixation en méthanol était précédée par une fixation au formaldéhyde, la localisation mitotique était perdue (**Figure 37**). Nous avons utilisé ce protocole pour tester la liaison de HNF1beta à un site HNF1 conservé, en amont du gène cible *Pkhd1*, à la fois dans des cellules interphasiques et dans des cellules bloquées en nocodazole. Nous avons établi un protocole de synchronisation de cellules MDCK, nous permettant d'obtenir un index mitotique variant entre 80 et 90% (**Figure 37**). Nos résultats ont montré que l'enrichissement en HNF1beta sur *Pkhd1* avec la double fixation était significativement supérieur à celui obtenu avec la fixation en formaldéhyde seulement (**Figure 38**). La détection de la liaison de HNF1beta sur un site-spécifique sur la chromatine mitotique, en complément du caractère indispensable de la liaison à l'ADN démontré précédemment, indiquent que l'interaction de HNF1beta avec la chromatine mitotique est séquence-spécifique. Il est probable que le protocole de préfixation par le méthanol avant le *crosslinking* par le formaldéhyde ait augmenté significativement la détection de la liaison de HNF1beta à la chromatine mitotique en limitant la dissociation de la protéine de ses sites de fixation.

Précédemment, nous avons montré que la mutation C273Y entraînait la dispersion de HNF1beta-GFP dans le cytoplasme pendant la mitose, sans affecter l'affinité de la protéine pour l'ADN à température restrictive. Nous avons voulu ensuite vérifier si la protéine mutante était capable de se lier de façon spécifique à un site HNF1, dans un contexte chromatinien, en l'occurrence le site présent en amont du gène *Pkhd1*. Nous avons réalisé le ChIP avec un anticorps anti-GFP au sein des cellules MDCK soit exprimant HNF1beta-GFP sauvage soit mutant. Avant la double fixation, les cellules ont été incubées 30 minutes soit à température ambiante, soit à 40°C, pour réaliser l'expérience respectivement à température permissive et restrictive (voir matériel et méthodes). Nos résultats ont montré que la version sauvage et le mutant C273Y de HNF1beta-GFP présentent un enrichissement significatif au niveau du site en amont de *Pkhd1*, à température permissive et à température restrictive, alors que la température restrictive entraînait une baisse de l'enrichissement à ce site pour le mutant P256S (**Figure 39**). Ces résultats indiquent que la perte de la localisation mitotique résultant de la

mutation C273Y n'est due ni à une baisse d'affinité pour l'ADN, ni à une altération de la liaison au motif consensus dans un contexte chromatinien. Une autre fonction de HNF1beta est affectée par cette mutation, ce qui suggère qu'il s'agit d'une mutation spécifique de la fonction de *bookmarking*.

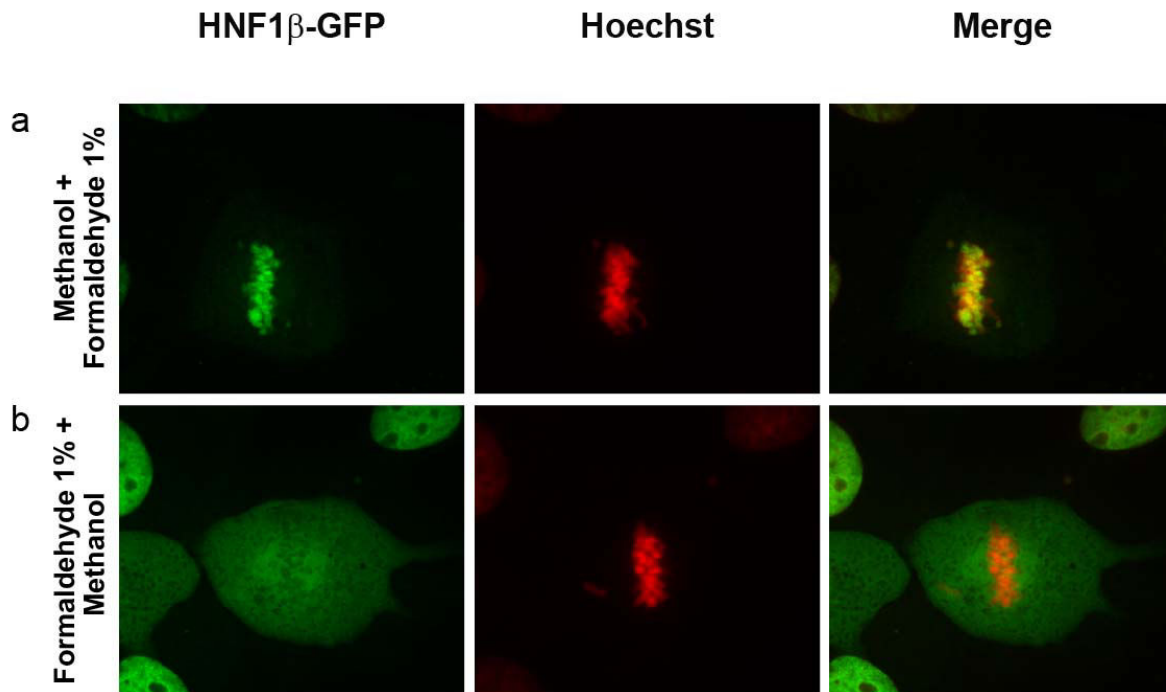


Figure 37 : La fixation en méthanol suivi par le crosslinking avec 1% de formaldéhyde permet la conservation de la localisation mitotique de HNF1beta

A : Cellules MDCK exprimant HNF1beta-GFP (signal vert), et marquées avec du Hoechst (signal rouge), vues en microscopie confocale. a : Cellules fixées 20 minutes en méthanol, puis crosslinkées avec du formaldéhyde pendant 10 minutes. b : Cellules crosslinkées avec du formaldéhyde pendant 10 minutes, puis fixées 20 minutes en méthanol.

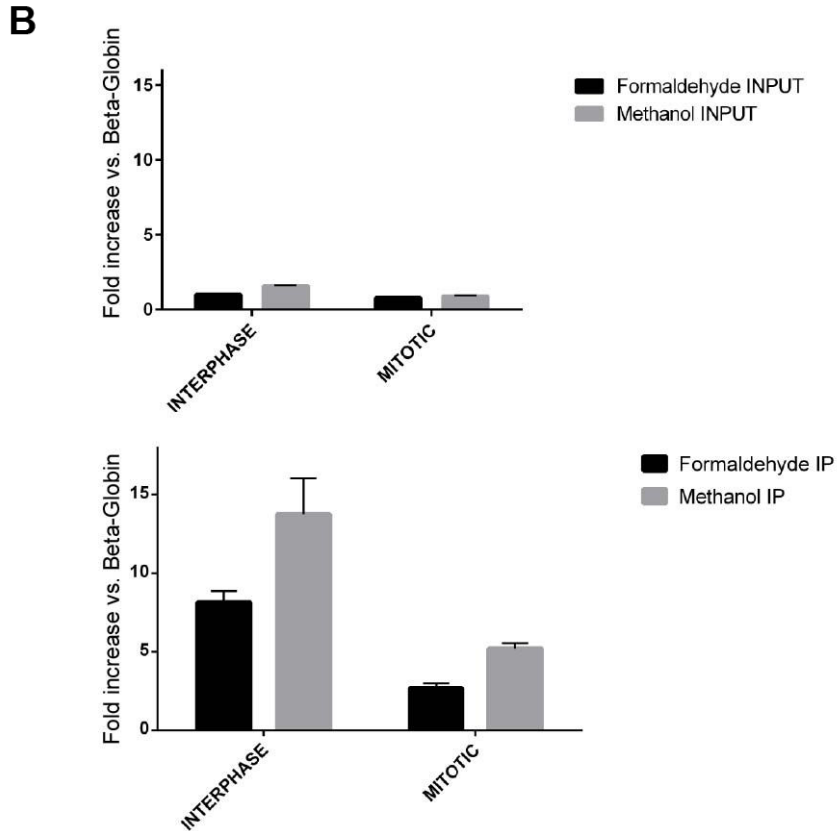
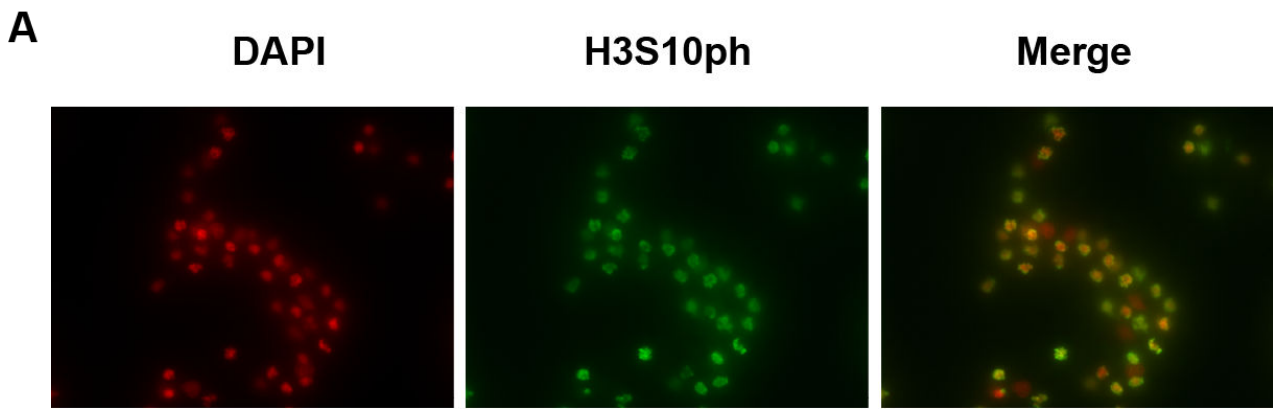


Figure 38: Les expériences de CHIP révèlent une liaison site-spécifique de HNF1beta sur les chromosomes mitotiques

A : préparation représentative de cellules utilisées pour la préparation de chromatine mitotique. En rouge : marquage DAPI. En vert : marquage avec un anticorps anti H3S10ph.

B : CHIP de HNF1beta endogène dans des cellules MDCK, au niveau d'un site HNF1 en amont de *Pkhd1*. L'enrichissement a été calculé vis-à-vis d'un site au niveau du gène *beta-globine*, ne possédant pas de site de liaison pour HNF1beta. Deux conditions de fixation ont été comparées, avec (histogramme noir) ou sans (histogramme gris), sur les INPUTS (a), ou sur la chromatine immunoprécipitée avec un anticorps anti HNF1beta (sc22840).

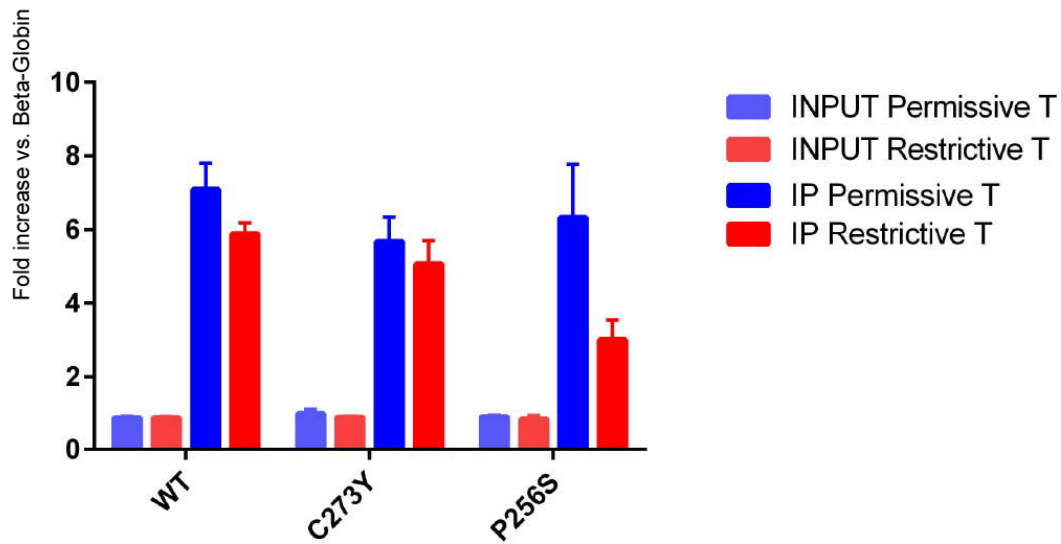


Figure 39 : ChIP à température permissive et restrictive sur HNF1beta sauvage, C273Y, et P256S.

ChIP de HNF1beta-GFP sauvage et mutant, avec un anticorps anti-GFP (ab290). Avant extraction de la chromatine, les cellules ont été incubées 30 minutes à température permissive (température ambiante) ou restrictive (40°C), sur les INPUTS (bleu et rouge clair), ou sur la chromatine immunoprécipitée avec un (bleu et rouge foncé).

DISCUSSION

1) Liaison de la partie N-terminale de HNF1beta à la chromatine mitotique.

a) Aspects techniques

Au cours de mon travail de thèse, j'ai caractérisé la liaison de HNF1beta à la chromatine mitotique. Cette capacité particulière, partagée par certains facteurs de transcription, est codée génétiquement dans la partie N-terminale de HNF1beta. J'ai montré que l'utilisation de conditions de fixations appropriées, avec le méthanol, étaient essentielles à l'étude de la localisation mitotique de HNF1beta en immunofluorescence, et par extension pour l'étude de l'interaction avec la chromatine en CHIP. En effet, en considérant ce résultat, il est possible que, sur la base d'expériences d'IF avec une fixation classique par le formaldéhyde, certains facteurs de transcription aient été caractérisés à tort comme exclus de la chromatine mitotique. Ce résultat souligne l'importance méthodologique concernant l'étude du *Bookmarking*, en particulier concernant l'association des facteurs de transcription à la chromatine mitotique. Ce problème a déjà été soulevé dans une revue de Kadauke et Blobel (2013). Ils relèvent également le problème de la détection de l'épitope, à la fois en IF et dans les expériences de CHIP. GATA1 par exemple a été caractérisé récemment comme un facteur de *Bookmarking*. L'étude de GATA1 en fusion avec l'YFP par vidéomicroscopie sur des cellules vivantes montre que la protéine est retenue sur la chromatine mitotique. Les expériences de CHIP montrent également le maintien d'une liaison de GATA1 sur des sites spécifiques pendant la mitose. En revanche, en IF, le facteur de transcription apparaît significativement dispersé dans le cytoplasme. Au contraire, pour FOXA1, un autre exemple récent de facteur de *bookmarking*, les expériences d'IF montrent une localisation parfaite sur la chromatine mitotique, malgré une baisse de la liaison sur des sites spécifique montrée par CHIP. Il apparaît donc qu'une approche multiple devrait être mise en place pour étudier la localisation mitotique d'un facteur de transcription.

b) Rôle de la liaison à l'ADN

Certaines mutations de HNF1beta entraînant en une perte de la liaison à l'ADN (deltaHom et deltaH3, ainsi que P256S et V265L à 37°C) résultent en la dispersion de la protéine dans le cytoplasme au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire. La fonction du domaine de liaison à l'ADN est donc essentielle pour la rétention mitotique de HNF1beta. Ce résultat est en accord avec les résultats concernant d'autres facteurs de *Bookmarking*, par exemple FOXA1. Caravaca *et al.* ont montré en effet qu'une mutation touchant un résidu indispensable à l'interaction directe avec l'ADN, entraîne une perte totale de la localisation mitotique de FOXA1. L'affinité de la liaison de HNF1beta pour l'ADN n'est pas particulièrement plus importante que celle d'autres facteurs de transcription qui ne sont pas capables de lier la chromatine mitotique, suggérant que cette capacité n'est pas suffisante pour qu'un facteur de transcription soit retenu sur la chromatine mitotique.

c) Liaison site-spécifique

Nous avons montré que la liaison de HNF1beta sur la chromatine mitotique était site-spécifique. Cela est comparable avec les résultats obtenus avec d'autres facteurs de transcription, notamment FOXA1. Caravaca *et al.* ont présenté un modèle selon lequel ce facteur de transcription possède deux modes de fixation à la chromatine mitotique. Le mode de liaison site-spécifique permet la réactivation rapide de gènes fortement exprimés après la mitose. Un mode additionnel de fixation non spécifique, causant l'augmentation du bruit de fond lors du CHIP-seq, permet la fixation du facteur de transcription à la chromatine, de façon globale, que les auteurs supposent constituer un réservoir de facteur de transcription à proximité des gènes non liés spécifiquement pendant la mitose, et permettant leur réactivation post-mitotique rapide. Cette caractéristique pourrait être liée au fait que FOXA1 est un facteur pionnier présentant une forte affinité pour les nucléosomes.

d) Facteurs POU et Bookmarking

Mes résultats montrent que HNF1alpha, Pit-1 et Oct-1 partagent avec HNF1beta la capacité d'interagir avec la chromatine mitotique. Les facteurs POU présentent une conservation relativement importante de la séquence en acides aminés des domaines POU et POUh, et, de façon plus frappante, des structures tridimensionnelles similaires. Cela suggère que le bookmarking pourrait être une fonction commune à la famille des facteurs de transcription POU. On peut mettre cette fonction en lien avec le rôle important de beaucoup de facteurs POU durant le développement. Oct-1 est indispensable pour la maintenance et la différenciation du compartiment de cellules trophoblastiques pendant le développement. Le Knockout du gène entraîne une létalité embryonnaire précoce, à cause d'un défaut de l'interface entre l'embryon et l'utérus maternel (Sebastiano *et al.*, 2010). Pit1(POU1F1) joue un rôle crucial dans le développement de l'hypophyse (de la Hoya *et al.*, 1998).

2) Mutations MODY et localisation mitotique de HNF1beta

a) Certaines mutations MODY résultent en une délocalisation de HNF1beta de la chromatine mitotique.

J'ai montré que des mutations perte de fonction, observées chez des patients MODY3 et MODY5 (voir tableau 1) et touchant des résidus conservés de HNF1beta et HNF1alpha, affectaient la capacité de HNF1beta de lier la chromatine mitotique. D'après mes résultats, l'effet de certaines mutations est potentiellement lié à une perte de la capacité de liaison à l'ADN. J'ai montré que le phénotype des mutations P256S, V265L et C273Y est réversible en quelques secondes par un choc thermique permettant la diminution rapide de la température dans le milieu de culture. J'ai montré que la dynamique de la relocalisation des mutants après

baisse de la température est affectée par la privation énergétique de la cellule, et par l’inhibition de l’importine-beta. Cela suggère l’existence d’un mécanisme actif, impliquant le système importine-beta, permettant la localisation de HNF1beta à la chromatine mitotique. L’importine-beta est cruciale dans le recrutement et la localisation de plusieurs facteurs sur les chromosomes mitotiques. Toutefois, c’est la première fois qu’un résultat expérimental suggère son implication dans le recrutement d’un facteur de transcription, reconnaissant l’ADN de façon séquence-spécifique, sur la chromatine mitotique. Ces résultats suggèrent que la localisation mitotique de HNF1beta est liée à un mécanisme d’adressage spécifique du facteur de transcription par un mécanisme impliquant des acteurs communs au système d’import des protéines au sein du noyau. L’absence d’effet de l’importazole sur la localisation mitotique de la version sauvage de HNF1beta-GFP pourrait être expliquée dans ce cadre par le temps d’incubation court que nous avons utilisé. Ce résultat suggère que le *bookmarking* des gènes par HNF1beta pourrait être un phénomène plus dynamique que ce qu’on pourrait imaginer. Cela est d’ailleurs en accord avec les résultats de FRAP obtenus pour FoxA1 sur la chromatine mitotique par Caravaca *et al.*, montrant une dynamique du facteur de transcription plus élevée que lors de l’interphase.

Type	Position in HNF1alpha	Position in HNF1beta	Mitotic retention	DNA binding	Phenotype
MODY3	K117E	K123E	Weak	Reduced	MODY3 ³³
MODY5	P224S	P256S	No	No	Bilateral cortical cysts ³⁴
MODY3	V233L	V265L	No	No	MODY3 ³⁵
MODY3	A239T	A271T	Weak	Reduced	MODY3 ²⁸
MODY5	C241Y	C273Y	Weak	Normal	Bilateral hyoplasia ³⁶
MODY3	G255S	G287S	Normal	Normal	MODY3 ²⁷

Tableau 1 : phénotype des mutations MODY étudiées

Vert : mutation MODY3, rouge : mutation MODY5

b) Le caractère thermosensible de la liaison de HNF1beta à la chromatine mitotique est lié à la capacité intrinsèque des mutants à pouvoir se lier avec l’ADN.

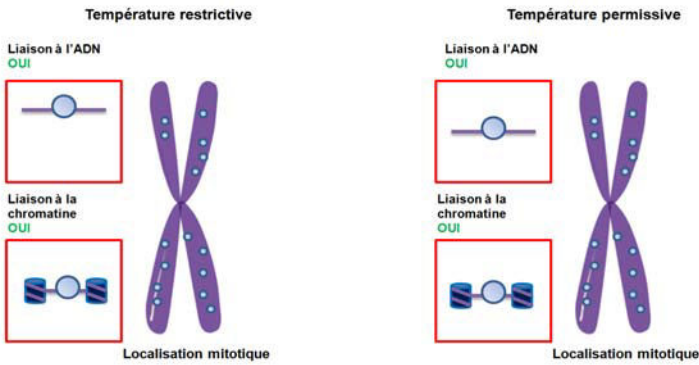
Les protéines mutantes P256S, V265L et C273Y présentent une température de commutation. Au-dessous de cette température, les mutants sont capables de se lier au moins partiellement à la chromatine mitotique. Lorsque la température excède cette valeur, les protéines mutantes perdent cette capacité et sont dispersées dans le cytoplasme des cellules mitotiques. Nous avons montré que dans le cas des mutations P256S et V265L, la transition affecte la liaison à l’ADN. Cela confirme l’importance de la liaison à l’ADN dans la localisation mitotique de

HNF1beta. La transition dans la capacité à lier l'ADN se produisant entre température permissive et restrictive pourrait être liée à un changement de conformation dynamique et réversible de P256S et V265L.

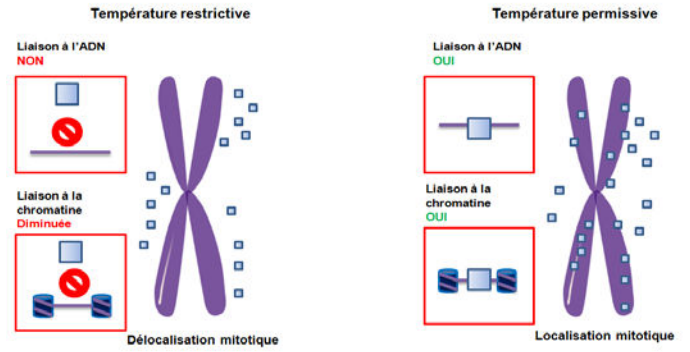
3) Mutant C273Y et fonction de HNF1beta.

Nous avons présenté en détail dans l'introduction l'étude de Verdeguer et al., dans laquelle est démontrée une dualité dans la fonction de HNF1beta. Il apparaît en effet que le facteur de transcription, en plus de sa fonction classique de transactivation, est nécessaire à la réexpression de ses gènes cibles après un événement mitotique. Les auteurs ont montré en complément que HNF1beta était localisé sur la chromatine mitotique, sans démontrer la corrélation avec la fonction mitotique du facteur de transcription. Ainsi, lors de ma thèse, j'ai voulu comprendre si la localisation mitotique de HNF1beta était nécessaire à l'établissement de sa fonction de *Bookmarking*. Une conséquence observable de cette hypothèse est que la perte spécifique de la liaison à la chromatine mitotique par HNF1beta entraînerait une altération de la ré-expression des gènes cibles de HNF1beta. Au sein du laboratoire d'accueil, nous avons ainsi voulu déterminer si dans la large gamme de mutations sur HNF1alpha et HNF1b identifiées chez des patients présentant des pathologies variées, certaines mutations étaient responsables d'une perte spécifique de l'accrochage à la chromatine mitotique. L'étude du mutant C273Y, entraînant l'apparition d'une hypoplasie rénale bilatérale chez le patient a permis de réaliser le lien entre ce phénotype pathologique et la localisation mitotique de HNF1beta. J'ai en effet montré que HNF1beta portant la mutation C273Y présentait un Kd pour l'ADN équivalent à celui de la protéine sauvage, que ce soit à température permissive quand la protéine est capable d'interagir avec la chromatine mitotique, ou à température restrictive quand la protéine est dispersée dans le cytoplasme en mitose. J'ai montré que le mutant C273Y conserve également la capacité à lier le motif consensus dans un contexte chromatinien. Ces résultats suggèrent que cette mutation entraîne une perte de spécificité de la fonction *bookmarking*. Ainsi, la fonction de *Bookmarking* de HNF1beta est liée à sa rétention sur la chromatine mitotique, et la perte de cette localisation peut-être responsable de l'apparition d'une pathologie.

HNF1beta sauvage



HNF1beta P256S/V265L



HNF1beta C273Y

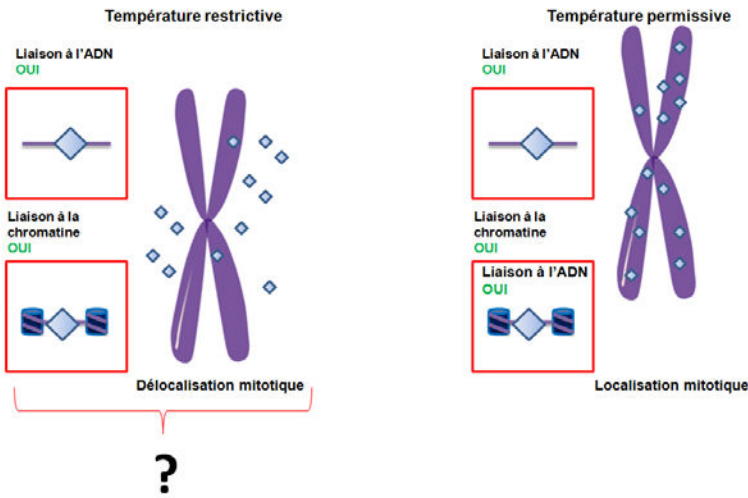


Figure 40 : Résumé du phénotype des mutants étudiés.

La température n'a d'influence sur la capacité de HNF1beta sauvage ni à lier à l'ADN, ni la chromatine. Les mutants P256S et V265L, à température restrictive perdent la capacité à lier l'ADN et la chromatine, ce qui entraîne la perte de l'interaction avec la chromatine mitotique. Le phénotype est reversé par le passage à température restrictive. En revanche le mutant C273Y, malgré sa délocalisation cytoplasmique pendant la mitose à température restrictive, conserve la capacité à lier l'ADN et la chromatine normalement.

4) Réflexions sur le Bookmarking.

Le mécanisme de *Bookmarking* a été décrit par plusieurs études comme permettant la réactivation rapide de l'expression des gènes après l'inactivation globale se produisant durant la mitose. L'idée que la fonction de *Bookmarking* dépasse le simple cadre de la nécessité temporelle de ré-expression des gènes émerge aujourd'hui dans la communauté scientifique. Un certain nombre de gènes liés durant la mitose par des facteurs de transcription, en particulier les gènes impliqués dans la spécification du lignage cellulaire, n'ont pas de fonction spécifique connue en phase G1, soulevant la question de la fonction de leur ré-expression rapide (Kadauke and Blobel, 2013). L'étude de la stabilité des ARNm à travers les divisions cellulaires devrait être prise en compte dans l'étude de l'importance de la réactivation transcriptionnelle rapide d'un gène. Si certains gènes ont des transcrits avec une longue demi-vie, alors il est possible que le *Bookmarking* ait une fonction plus vaste, encore mal cernée, que la seule cinétique de ré-activation. Toutefois, dans le cas spécifique du *bookmarking* engendré par HNF1beta, il ne s'agit pas simplement d'accélérer l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles après une mitose. HNF1beta semble jouer un rôle essentiel pour la réactivation transcriptionnelle post-mitotique. En effet, en quiescence, la fonction de transactivation de HNF1beta semble redondante pour un certain nombre de gènes cibles. Cela pourrait signifier qu'un autre facteur de transcription contribue à la régulation de ses gènes cibles. En revanche, la survenue d'un événement mitotique entraîne la perte de l'expression des gènes cibles, ce qui semble indiquer qu'en l'absence de HNF1beta, ils ne sont pas réactivés après la mitose, en dépit de l'activité de transactivation redondante.

De façon intéressante, les processus permettant la réactivation de la transcription après la mitose mettent en jeu des acteurs et une composante dynamique commune avec les processus de différenciation au cours du développement. Ainsi, GATA1 et FoxA1 sont décrits comme facteurs pionniers dans les cellules progénitrices, capables de se lier à des gènes cibles dans des territoires hétérochromatiniens et permettant de modifier localement la structure chromatinienne et d'activer leur expression. La destinée cellulaire peut être également régulée par la liaison de complexes répressifs prenant la place des facteurs pionniers sur la chromatine, excluant ainsi l'engagement dans certains lignages cellulaires. On peut établir une comparaison intéressante de l'accessibilité de la chromatine pendant la mitose avec les changements se produisant pendant le développement et la reprogrammation cellulaire. Les cellules ES présentent ainsi une dynamique des échanges d'histones élevée par rapport aux cellules différenciées. On peut d'ailleurs noter que les expériences de transferts de noyaux ont une efficacité renforcée lorsque les chromosomes transférés ont subi une condensation mitotique. La décondensation contrôlée de la chromatine pourrait ainsi améliorer la reprogrammation.

CONCLUSIONS

Le bookmarking par HNF1beta est indispensable au maintien de l'expression de ses gènes cibles dans un contexte prolifératif. Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé les modalités de l'interaction de HNF1beta à la chromatine mitotique, indispensable à l'exécution de sa fonction. HNF1beta se lie de façon site-spécifique à la chromatine durant la mitose, d'une façon similaire en termes biochimiques avec sa liaison à la chromatine lors du reste du cycle cellulaire. J'ai montré que certaines mutations MODY, identifiées chez des patients présentant des pathologies rénales et endocriniennes (diabète), entraînaient une perturbation de la localisation mitotique de HNF1beta. La réversibilité de ce phénotype par le biais d'une baisse de température nous a permis d'étudier la dynamique de relocalisation des mutants sur la chromatine mitotique. Mes résultats indiquent que cette dynamique est dépendante d'un mécanisme actif, et du fonctionnement correct du système d'import nucléaire pendant la mitose. Nous avons identifié une mutation, présente chez un patient présentant une hypoplasie rénale bilatérale, qui semble altérer spécifiquement la fonction de *bookmarking* de HNF1beta. Cette étude a permis de mieux comprendre les modalités d'interaction de HNF1beta avec la chromatine mitotique, indispensable à l'accomplissement de sa fonction de facteur de *bookmarking*.

PERSPECTIVES

1) Quels sont les partenaires de HNF1beta sur la chromatine mitotique ?

Nous avons montré que la capacité de HNF1beta à lier la chromatine mitotique est génétiquement programmée, car la mutation MODY C273Y affecte cette propriété sans perturber la liaison à l'ADN ou à la chromatine. Il est possible que cette mutation altère l'interaction avec un ou plusieurs partenaires cruciaux impliqués dans la localisation mitotique de HNF1beta. Dans le futur, l'identification de ces partenaires pourrait nous permettre de mieux comprendre l'aspect mécanistique de la localisation mitotique de HNF1beta.

Nous pourrions adopter une stratégie en spectrométrie de masse pour analyser les interacteurs avec la méthode SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*). Cette stratégie pourrait nous permettre d'identifier des protéines interagissant différemment avec HNF1beta sauvage et mutant. Un problème potentiel est la protéine sauvage et la protéine mutée sont présentes dans deux compartiments différents (chromatine mitotique et cytoplasme, respectivement). Cela pourrait avoir un impact important sur la possibilité d'interagir avec des partenaires simplement à cause de la localisation de la protéine. Pour cette raison, au lieu d'utiliser une technique classique de Co-immunoprécipitation, nous pourrions analyser les interacteurs avec une approche en SILAC utilisant une stratégie de GST-pulldown.

En parallèle, nous pourrions développer une stratégie d'analyse par crible double hybride.

Un certain nombre de candidats pourraient être également testés de façon aprioristique. Tout d'abord, plusieurs partenaires potentiels de HNF1beta sont présents sur la chromatine durant la mitose. La cohésine, en plus de son rôle dans la cohésion des chromatides sœurs, est retenue à des sites spécifiques de liaison de nombreux facteurs de transcription durant l'interphase et la mitose, et permet le maintien d'une chromatine structurellement active. Le facteur CTCF est également présent sur certains sites (notamment H19), et sa fonction d'isolateur est maintenue (Burke et al., 2005). Le facteur BRD4 a également été caractérisé comme restant lié à la chromatine mitotique, et indispensable à la cinétique de réactivation de certains gènes. La protéine HMGB1 est localisée sur la chromatine mitotique également (Pallier et al., 2003). Ce facteur est capable de lier l'ADN de façon non séquence-spécifique, et permet la potentialisation de l'activation de plusieurs facteurs de transcription. HMGB1 a été identifié lors d'un crible double-hybride comme un partenaire de HNF1alpha. La zyxine pourrait également un partenaire potentiel intéressant sur la chromatine mitotique. La zyxine est une protéine cytoplasmique, localisée au niveau des jonctions adhérentes, associée aux filaments d'actine. L'interaction de cette protéine avec HNF1beta a déjà été démontrée *in vitro*, et entraîne une potentialisation de la transactivation par HNF1beta. La translocation nucléaire de la zyxine est nécessaire à l'établissement de l'interaction avec HNF1beta, afin que les deux protéines soient dans le même compartiment. En mitose, cette compartimentalisation disparaît, puisque l'enveloppe nucléaire est rompue durant la prométaphase. De plus, une réorganisation globale du cytosquelette se produit, avec une diminution générale de l'interaction de la cellule avec la matrice extra cellulaire, et on peut donc imaginer que la concentration de la zyxine dans le

cytoplasme pourrait augmenter. Il a été montré dans une étude de 1999 que la zyxine était phosphorylée pendant la mitose par cdc2, et qu'elle était localisée sur le fuseau mitotique, par immunofluorescence, après fixation par le formaldéhyde. Nous pourrions vérifier par immunofluorescence si la fixation par le méthanol a un effet sur la localisation mitotique de la protéine, et tester l'interaction de HNF1beta avec la zyxine par coimmunoprécipitation dans des cellules bloquées par le nocodazole.

L'ensemble de ces protéines pourraient être des partenaires potentiels de HNF1beta sur la chromatine mitotique et possiblement être nécessaires à sa localisation mitotique.

2) L'interaction de HNF1beta avec la chromatine mitotique dépend-elle de modifications post-traductionnelles de la protéine ?

La plupart des mutations que nous avons étudiées étaient situées sur la deuxième hélice-alpha de l'homéodomaine de HNF1beta, ou à proximité. Cette hélice n'est pas en contact direct avec l'ADN, mais sa déstabilisation par les mutations V265L et P256S pourrait potentiellement conduire à une perte de l'affinité pour l'ADN en perturbant la conformation globale de HNF1beta, notamment la structure de POUh, et l'interface avec le domaine POU.

La mutation C273Y se trouve également au sein de la deuxième hélice alpha de POUh. De façon intéressante, un site de phosphorylation par la protéine kinase Mirk/Dyrk a été décrit sur le résidu sérine 247 de HNF1alpha (sérine 279 pour HNF1beta). Ce résidu est spatialement proche de la Cystéine 273. Il est possible que la mutation, en modifiant la conformation locale de POUh à l'interface extérieure de la protéine, perturbe la mise en place de cette modification post-traductionnelle. Mirk/Dyrk est une protéine kinase intervenant dans des processus de régulation de la prolifération cellulaire et de la différenciation. La perte de cette phosphorylation pourrait avoir un lien avec la délocalisation observée du mutant C273Y. Une inhibition spécifique de cette kinase pourrait être effectuée pour vérifier l'effet sur la localisation mitotique de HNF1beta. Des résultats préliminaires ont d'ailleurs montré que la mutation de cette serine en alanine entraînait une diminution de l'accrochage à la chromatine mitotique.

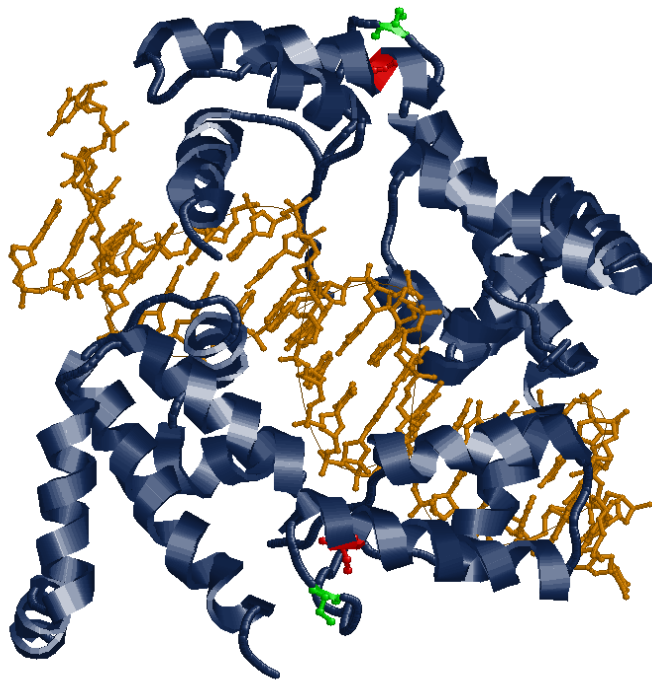


Figure 41 :Cristal de HNF1beta lié à l'ADN.

En rouge : mutation C273Y.

En vert : sérine 279 : site potentiel de phosphorylation par Mirk/Dyrk.

3) Quels sites sont liés par HNF1beta durant la mitose ?

L'analyse des sites liés par HNF1beta sur la chromatine pendant la mitose est une question cruciale pour comprendre le rôle de sa fonction de *Bookmarking*. Une analyse par ChIP-seq des sites liés par HNF1beta va être réalisée dans le laboratoire dans les semaines qui suivent grâce aux conditions expérimentales que j'ai mises au point pendant mon travail. J'ai établi un protocole de « double fixation » avec du méthanol, puis le formaldéhyde, préservant de la localisation mitotique de HNF1beta, et permettant la détection d'un enrichissement supérieur de HNF1beta au niveau du gène cible *pkhd1*. Un ChIP-seq sera réalisé prochainement, en comparant l'effet de la fixation en formaldéhyde seul et de la « double fixation » sur la répartition de HNF1beta sur la chromatine, en interphase et en mitose.

Il serait également intéressant d'étudier la nature des sites liés par HNF1beta pendant l'élongation des tubules rénaux (contexte prolifératif) chez la souris, en appliquant le protocole de pré-fixation en méthanol. Cela nous permettrait d'avoir une vue globale des gènes régulés par l'activité de *Bookmarking* de HNF1beta *in vivo* dans le rein.

4) Quelle est la nature des marques chromatinienne au niveau des sites de liaison de HNF1beta ?

Nous pourrions effectuer l'analyse de marques chromatinienne corrélant avec la présence de HNF1beta pendant l'interphase et la mitose. Nous pourrions notamment étudier le statut de marques d'activation telles que la méthylation de H3K4, ou les acétylayions de H3K9, H3K27 ou encore H4K16 ; ainsi que de marques de répression telles que la méthylation de H3K9 et de H3K27. Cela pourrait nous permettre de comprendre la nature de la marque épigénétique liée à la localisation mitotique de HNF1beta. Cette étude pourrait être réalisée par CHIP-seq.

BIBLIOGRAPHIE

Aggaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., et al. (1999). Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J.* *18*, 1923–1938.

Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* *25*, 863–874.

Adalat, S., Woolf, A.S., Johnstone, K.A., Wirsing, A., Harries, L.W., Long, D.A., Hennekam, R.C., Ledermann, S.E., Rees, L., van't Hoff, W., et al. (2009). HNF1B mutations associate with hypomagnesemia and renal magnesium wasting. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *20*, 1123–1131.

Adolph, K.W., Cheng, S.M., and Laemmli, U.K. (1977). Role of nonhistone proteins in metaphase chromosome structure. *Cell* *12*, 805–816.

Adolphs, K.W., Cheng, S.M., Paulson, J.R., and Laemmli, U.K. (1977). Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 4937–4941.

Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* *111*, 381–392.

Agger, K., Cloos, P.A.C., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* *449*, 731–734.

Aizawa, H., Sekine, Y., Takemura, R., Zhang, Z., Nangaku, M., and Hirokawa, N. (1992). Kinesin family in murine central nervous system. *J. Cell Biol.* *119*, 1287–1296.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science).

Ali, S.A., Zaidi, S.K., Dobson, J.R., Shakoory, A.R., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2010). Transcriptional corepressor TLE1 functions with Runx2 in epigenetic repression of ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4165–4169.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *51*, 786–794.

Allshire, R.C., Javerzat, J.P., Redhead, N.J., and Cranston, G. (1994). Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell* *76*, 157–169.

Bacq, Y., Jacquemin, E., Balabaud, C., Jeannot, E., Scotto, B., Branchereau, S., Laurent, C., Bourlier, P., Pariente, D., de Muret, A., et al. (2003). Familial liver adenomatosis associated with hepatocyte nuclear factor 1alpha inactivation. *Gastroenterology* *125*, 1470–1475.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* *410*, 120–124.

- Barbacci, E., Reber, M., Ott, M.O., Breillat, C., Huetz, F., and Cereghini, S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 4795–4805.
- Barbacci, E., Chalkiadaki, A., Masdeu, C., Haumaitre, C., Lokmane, L., Loirat, C., Cloarec, S., Talianidis, I., Bellanne-Chantelot, C., and Cereghini, S. (2004). HNF1beta/TCF2 mutations impair transactivation potential through altered co-regulator recruitment. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 3139–3149.
- Barratt, M.J., Hazzalin, C.A., Cano, E., and Mahadevan, L.C. (1994). Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small hyperacetylation-sensitive fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 4781–4785.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* *129*, 823–837.
- Baumhueter, S., Courtois, G., and Crabtree, G.R. (1988). A variant nuclear protein in dedifferentiated hepatoma cells binds to the same functional sequences in the beta fibrinogen gene promoter as HNF-1. *EMBO J.* *7*, 2485–2493.
- Baxter, J., and Aragón, L. (2012). A model for chromosome condensation based on the interplay between condensin and topoisomerase II. *Trends Genet. TIG* *28*, 110–117.
- Bellanné-Chantelot, C., Clauin, S., Chauveau, D., Collin, P., Daumont, M., Douillard, C., Dubois-Laforgue, D., Dusselier, L., Gautier, J.-F., Jadoul, M., et al. (2005). Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. *Diabetes* *54*, 3126–3132.
- Berdasco, M., and Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev. Cell* *19*, 698–711.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* *447*, 407–412.
- Bingham, C., Bulman, M.P., Ellard, S., Allen, L.I., Lipkin, G.W., Hoff, W.G., Woolf, A.S., Rizzoni, G., Novelli, G., Nicholls, A.J., et al. (2001). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am. J. Hum. Genet.* *68*, 219–224.
- Bioulac-Sage, P., Rebouissou, S., Thomas, C., Blanc, J.-F., Saric, J., Sa Cunha, A., Rullier, A., Cubel, G., Couchy, G., Imbeaud, S., et al. (2007). Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry. *Hepatol. Baltim. Md* *46*, 740–748.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* *16*, 6–21.
- Blobel, G.A., Kadauke, S., Wang, E., Lau, A.W., Zuber, J., Chou, M.M., and Vakoc, C.R. (2009). A reconfigured pattern of MLL occupancy within mitotic chromatin promotes rapid transcriptional reactivation following mitotic exit. *Mol. Cell* *36*, 970–983.
- Bluteau, O., Jeannot, E., Bioulac-Sage, P., Marqués, J.M., Blanc, J.-F., Bui, H., Beaudoin, J.-C., Franco, D., Balabaud, C., Laurent-Puig, P., et al. (2002). Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat. Genet.* *32*, 312–315.

- Buchner, A., Castro, M., Hennig, A., Popp, T., Assmann, G., Stief, C.G., and Zimmermann, W. (2010). Downregulation of HNF-1B in renal cell carcinoma is associated with tumor progression and poor prognosis. *Urology* 76, 507.e6–e11.
- Burke, L.J., Zhang, R., Bartkuhn, M., Tiwari, V.K., Tavoosidana, G., Kurukuti, S., Weth, C., Leers, J., Galjart, N., Ohlsson, R., et al. (2005). CTCF binding and higher order chromatin structure of the H19 locus are maintained in mitotic chromatin. *EMBO J.* 24, 3291–3300.
- Bush, K.M., Yuen, B.T., Barrilleaux, B.L., Riggs, J.W., O’Geen, H., Cotterman, R.F., and Knoepfler, P.S. (2013). Endogenous mammalian histone H3.3 exhibits chromatin-related functions during development. *Epigenetics Chromatin* 6, 7.
- Caravaca, J.M., Donahue, G., Becker, J.S., He, X., Vinson, C., and Zaret, K.S. (2013). Bookmarking by specific and nonspecific binding of FoxA1 pioneer factor to mitotic chromosomes. *Genes Dev.* 27, 251–260.
- Cereghini, S., Blumenfeld, M., and Yaniv, M. (1988). A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev.* 2, 957–974.
- Chang, C.-J., Goulding, S., Earnshaw, W.C., and Carmena, M. (2003). RNAi analysis reveals an unexpected role for topoisomerase II in chromosome arm congression to a metaphase plate. *J. Cell Sci.* 116, 4715–4726.
- Chen, D., Hinkley, C.S., Henry, R.W., and Huang, S. (2002). TBP dynamics in living human cells: constitutive association of TBP with mitotic chromosomes. *Mol. Biol. Cell* 13, 276–284.
- Chen, D., Dundr, M., Wang, C., Leung, A., Lamond, A., Misteli, T., and Huang, S. (2005). Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins. *J. Cell Biol.* 168, 41–54.
- Cheret, C., Doyen, A., Yaniv, M., and Pontoglio, M. (2002). Hepatocyte nuclear factor 1 alpha controls renal expression of the Npt1-Npt4 anionic transporter locus. *J. Mol. Biol.* 322, 929–941.
- Chi, Y.-I., Frantz, J.D., Oh, B.-C., Hansen, L., Dhe-Paganon, S., and Shoelson, S.E. (2002). Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1alpha. *Mol. Cell* 10, 1129–1137.
- Chignola, F., Gaetani, M., Rebane, A., Org, T., Mollica, L., Zucchelli, C., Spitaleri, A., Mannella, V., Peterson, P., and Musco, G. (2009). The solution structure of the first PHD finger of autoimmune regulator in complex with non-modified histone H3 tail reveals the antagonistic role of H3R2 methylation. *Nucleic Acids Res.* 37, 2951–2961.
- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y., and Reinberg, D. (1998). A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5355–5363.
- Choi, Y.-H., McNally, B.T., and Igarashi, P. (2013). Zyxin regulates migration of renal epithelial cells through activation of hepatocyte nuclear factor-1 β . *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 305, F100–F110.

Chouard, T., Jeannequin, O., Rey-Campos, J., Yaniv, M., and Traincard, F. (1997). A set of polyclonal and monoclonal antibodies reveals major differences in post-translational modification of the rat HNF1 and vHNF1 homeoproteins. *Biochimie* 79, 707–715.

Christova, R., and Oelgeschläger, T. (2002). Association of human TFIIID-promoter complexes with silenced mitotic chromatin in vivo. *Nat. Cell Biol.* 4, 79–82.

Citron, B.A., Kaufman, S., Milstien, S., Naylor, E.W., Greene, C.L., and Davis, M.D. (1993). Mutation in the 4a-carbinolamine dehydratase gene leads to mild hyperphenylalaninemia with defective cofactor metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 768–774.

Clerc, R.G., Corcoran, L.M., LeBowitz, J.H., Baltimore, D., and Sharp, P.A. (1988). The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box- and homeo box-type domains. *Genes Dev.* 2, 1570–1581.

Coffinier, C., Thépot, D., Babinet, C., Yaniv, M., and Barra, J. (1999). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 126, 4785–4794.

Costanzi, C., Stein, P., Worrada, D.M., Schultz, R.M., and Pehrson, J.R. (2000). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos. *Development* 127, 2283–2289.

Couldrey, C., Carlton, M.B., Nolan, P.M., Colledge, W.H., and Evans, M.J. (1999). A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2489–2495.

Courtois, G., Morgan, J.G., Campbell, L.A., Fourel, G., and Crabtree, G.R. (1987). Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha 1-antitrypsin promoters. *Science* 238, 688–692.

Couture, J.-F., Collazo, E., and Trievel, R.C. (2006). Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 698–703.

Craig, J.M. (2005). Heterochromatin--many flavours, common themes. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 27, 17–28.

Creyghton, M.P., Markoulaki, S., Levine, S.S., Hanna, J., Lodato, M.A., Sha, K., Young, R.A., Jaenisch, R., and Boyer, L.A. (2008). H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. *Cell* 135, 649–661.

Cronk, J.D., Endrizzi, J.A., and Alber, T. (1996). High-resolution structures of the bifunctional enzyme and transcriptional coactivator DCoH and its complex with a product analogue. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 5, 1963–1972.

Daniel, J.M., Spring, C.M., Crawford, H.C., Reynolds, A.B., and Baig, A. (2002). The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res.* 30, 2911–2919.

Davey, C.A., Sargent, D.F., Luger, K., Maeder, A.W., and Richmond, T.J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *J. Mol. Biol.* 319, 1097–1113.

Decramer, S., Parant, O., Beaufils, S., Clauin, S., Guillou, C., Kessler, S., Aziza, J., Bandin, F., Schanstra, J.P., and Bellanné-Chantelot, C. (2007). Anomalies of the TCF2 gene are the main cause of fetal bilateral hyperechogenic kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 923–933.

DeManno, D.A., Cottom, J.E., Kline, M.P., Peters, C.A., Maizels, E.T., and Hunzicker-Dunn, M. (1999). Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 13, 91–105.

Dey, A., Nishiyama, A., Karpova, T., McNally, J., and Ozato, K. (2009). Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Mol. Biol. Cell* 20, 4899–4909.

Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491–496.

Dohda, T., Kaneoka, H., Inayoshi, Y., Kamihira, M., Miyake, K., and Iijima, S. (2004). Transcriptional coactivators CBP and p300 cooperatively enhance HNF-1 α -mediated expression of the albumin gene in hepatocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* 136, 313–319.

Dudziak, K., Mottalebi, N., Senkel, S., Edghill, E.L., Rosengarten, S., Roose, M., Bingham, C., Ellard, S., and Ryffel, G.U. (2008). Transcription factor HNF1 β and novel partners affect nephrogenesis. *Kidney Int.* 74, 210–217.

Earnshaw, W.C., and Heck, M.M. (1985). Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J. Cell Biol.* 100, 1716–1725.

Egli, D., Birkhoff, G., and Eggen, K. (2008). Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 505–516.

Ellard, S. (2000). Hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF-1 α) mutations in maturity-onset diabetes of the young. *Hum. Mutat.* 16, 377–385.

Endrizzi, J.A., Cronk, J.D., Wang, W., Crabtree, G.R., and Alber, T. (1995). Crystal structure of DCoH, a bifunctional, protein-binding transcriptional coactivator. *Science* 268, 556–559.

Eswaran, J., Patnaik, D., Filippakopoulos, P., Wang, F., Stein, R.L., Murray, J.W., Higgins, J.M.G., and Knapp, S. (2009). Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20198–20203.

Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J., and Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr. Biol. CB* 11, 1183–1187.

Fairley, J.A., Scott, P.H., and White, R.J. (2003). TFIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo. *EMBO J.* 22, 5841–5850.

Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S., and Jeltsch, A. (2001). The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J. Mol. Biol.* 309, 1189–1199.

Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* 4, 497–508.

Filion, G.J., van Bommel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., de Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J., et al. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* 143, 212–224.

Finney, M., Ruvkun, G., and Horvitz, H.R. (1988). The *C. elegans* cell lineage and differentiation gene *unc-86* encodes a protein with a homeodomain and extended similarity to transcription factors. *Cell* 55, 757–769.

Fischer, E., Gresh, L., Reimann, A., and Pontoglio, M. (2004). Cystic kidney diseases: learning from animal models. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 19, 2700–2702.

Flanagan, J.F., Mi, L.-Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 438, 1181–1185.

Follmer, N.E., Wani, A.H., and Francis, N.J. (2012). A Polycomb Group Protein Is Retained at Specific Sites on Chromatin in Mitosis. *PLoS Genet* 8, e1003135.

Fonseca, J.P., Steffen, P.A., Müller, S., Lu, J., Sawicka, A., Seiser, C., and Ringrose, L. (2012). In vivo Polycomb kinetics and mitotic chromatin binding distinguish stem cells from differentiated cells. *Genes Dev.* 26, 857–871.

Fournier, A., Sasai, N., Nakao, M., and Defossez, P.-A. (2012). The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. *Brief. Funct. Genomics* 11, 251–264.

Gamble, M.J., Frizzell, K.M., Yang, C., Krishnakumar, R., and Kraus, W.L. (2010). The histone variant macroH2A1 marks repressed autosomal chromatin, but protects a subset of its target genes from silencing. *Genes Dev.* 24, 21–32.

Garske, A.L., Oliver, S.S., Wagner, E.K., Musselman, C.A., LeRoy, G., Garcia, B.A., Kutateladze, T.G., and Denu, J.M. (2010). Combinatorial profiling of chromatin binding modules reveals multisite discrimination. *Nat. Chem. Biol.* 6, 283–290.

Gavet, O., and Pines, J. (2010a). Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev. Cell* 18, 533–543.

Gavet, O., and Pines, J. (2010b). Activation of cyclin B1-Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J. Cell Biol.* 189, 247–259.

Giet, R., and Glover, D.M. (2001). *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell Biol.* 152, 669–682.

Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635–638.

- Gordon, F., Luger, K., and Hansen, J.C. (2005). The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt-dependent oligomerization of nucleosomal arrays. *J. Biol. Chem.* *280*, 33701–33706.
- Gotoh, E., and Durante, M. (2006). Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J. Cell. Physiol.* *209*, 297–304.
- Gottesfeld, J.M., and Forbes, D.J. (1997). Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 197–202.
- Goyal, R., Reinhardt, R., and Jeltsch, A. (2006). Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* *34*, 1182–1188.
- Gresh, L., Fischer, E., Reimann, A., Tanguy, M., Garbay, S., Shao, X., Hiesberger, T., Fiette, L., Igarashi, P., Yaniv, M., et al. (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J.* *23*, 1657–1668.
- Grewal, S.I.S., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 35–46.
- Grisanzio, C., Werner, L., Takeda, D., Awoyemi, B.C., Pomerantz, M.M., Yamada, H., Sooriakumaran, P., Robinson, B.D., Leung, R., Schinzel, A.C., et al. (2012). Genetic and functional analyses implicate the NUDT11, HNF1B, and SLC22A3 genes in prostate cancer pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 11252–11257.
- Guay-Woodford, L.M. (2003). Murine models of polycystic kidney disease: molecular and therapeutic insights. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *285*, F1034–F1049.
- Gudmundsson, J., Sulem, P., Steinthorsdottir, V., Bergthorsson, J.T., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Rafnar, T., Gudbjartsson, D., Agnarsson, B.A., Baker, A., et al. (2007). Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat. Genet.* *39*, 977–983.
- Güttinger, S., Laurell, E., and Kutay, U. (2009). Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 178–191.
- Hagstrom, K.A., Holmes, V.F., Cozzarelli, N.R., and Meyer, B.J. (2002). *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev.* *16*, 729–742.
- Hans, F., and Dimitrov, S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* *20*, 3021–3027.
- Hardon, E.M., Frain, M., Paonessa, G., and Cortese, R. (1988). Two distinct factors interact with the promoter regions of several liver-specific genes. *EMBO J.* *7*, 1711–1719.
- Hart, T.C., Gorry, M.C., Hart, P.S., Woodard, A.S., Shihabi, Z., Sandhu, J., Shirts, B., Xu, L., Zhu, H., Barmada, M.M., et al. (2002). Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J. Med. Genet.* *39*, 882–892.

He, X., Treacy, M.N., Simmons, D.M., Ingraham, H.A., Swanson, L.W., and Rosenfeld, M.G. (1989). Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature* 340, 35–41.

Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A., et al. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 311–318.

Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose (Boroträger).

Hendrich, B., and Tweedie, S. (2003). The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet. TIG* 19, 269–277.

Henzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., and Allis, C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348–360.

Herr, W., Sturm, R.A., Clerc, R.G., Corcoran, L.M., Baltimore, D., Sharp, P.A., Ingraham, H.A., Rosenfeld, M.G., Finney, M., and Ruvkun, G. (1988). The POU domain: a large conserved region in the mammalian *pit-1*, *oct-1*, *oct-2*, and *Caenorhabditis elegans unc-86* gene products. *Genes Dev.* 2, 1513–1516.

Hirano, T. (2005a). Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr. Biol. CB* 15, R265–R275.

Hirano, T. (2005b). SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 507–514.

Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.-H., and Peters, J.-M. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 438, 1176–1180.

Hödl, M., and Basler, K. (2012). Transcription in the absence of histone H3.2 and H3K4 methylation. *Curr. Biol. CB* 22, 2253–2257.

Holliday, R., and Pugh, J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226–232.

Holm, C., Goto, T., Wang, J.C., and Botstein, D. (1985). DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 41, 553–563.

Van Hooser, A., Goodrich, D.W., Allis, C.D., Brinkley, B.R., and Mancini, M.A. (1998). Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 23), 3497–3506.

Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B.N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., et al. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat. Genet.* 17, 384–385.

- Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P., and Choo, K.H. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 1148–1153.
- De la Hoya, M., Vila, V., Jiménez, O., and Castrillo, J.L. (1998). Anterior pituitary development and Pit-1/GHF-1 transcription factor. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *54*, 1059–1066.
- Hoyer-Fender, S., Czirr, E., Radde, R., Turner, J.M.A., Mahadevaiah, S.K., Pehrson, J.R., and Burgoyne, P.S. (2004). Localisation of histone macroH2A1.2 to the XY-body is not a response to the presence of asynapsed chromosome axes. *J. Cell Sci.* *117*, 189–198.
- Hsieh, C.L. (1999). In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 8211–8218.
- Huang, Y., Fang, J., Bedford, M.T., Zhang, Y., and Xu, R.-M. (2006). Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* *312*, 748–751.
- Hudson, D.F., Vagnarelli, P., Gassmann, R., and Earnshaw, W.C. (2003). Condensin is required for nonhistone protein assembly and structural integrity of vertebrate mitotic chromosomes. *Dev. Cell* *5*, 323–336.
- Igarashi, P., and Somlo, S. (2002). Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *13*, 2384–2398.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* *288*, 1422–1425.
- Jeltsch, A. (2006). On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* *1*, 63–66.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074–1080.
- John, S., and Workman, J.L. (1998). Bookmarking genes for activation in condensed mitotic chromosomes. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *20*, 275–279.
- Johnen, G., Kowlessur, D., Citron, B.A., and Kaufman, S. (1995). Characterization of the wild-type form of 4a-carbinolamine dehydratase and two naturally occurring mutants associated with hyperphenylalaninemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 12384–12388.
- Johnson, R.T., and Rao, P.N. (1970). Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* *226*, 717–722.
- Johnson, L.M., Kayne, P.S., Kahn, E.S., and Grunstein, M. (1990). Genetic evidence for an interaction between SIR3 and histone H4 in the repression of the silent mating loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 6286–6290.
- Johnson, M., Phua, H.H., Bennett, S.C., Spence, J.M., and Farr, C.J. (2009). Studying vertebrate topoisomerase 2 function using a conditional knockdown system in DT40 cells. *Nucleic Acids Res.* *37*, e98.

Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *12*, 206–222.

Kadauke, S., and Blobel, G.A. (2013). Mitotic bookmarking by transcription factors. *Epigenetics Chromatin* *6*, 6.

Kadauke, S., Udugama, M.I., Pawlicki, J.M., Achtman, J.C., Jain, D.P., Cheng, Y., Hardison, R.C., and Blobel, G.A. (2012). Tissue-specific mitotic bookmarking by hematopoietic transcription factor GATA1. *Cell* *150*, 725–737.

Kal, A.J., Mahmoudi, T., Zak, N.B., and Verrijzer, C.P. (2000). The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev.* *14*, 1058–1071.

Kalab, P., Weis, K., and Heald, R. (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* *295*, 2452–2456.

Karagianni, P., Amazit, L., Qin, J., and Wong, J. (2008). ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 705–717.

Kelly, T.K., Miranda, T.B., Liang, G., Berman, B.P., Lin, J.C., Tanay, A., and Jones, P.A. (2010). H2A.Z maintenance during mitosis reveals nucleosome shifting on mitotically silenced genes. *Mol. Cell* *39*, 901–911.

Kieffer-Kwon, P., Martianov, I., and Davidson, I. (2004). Cell-specific nucleolar localization of TBP-related factor 2. *Mol. Biol. Cell* *15*, 4356–4368.

Kim, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., Zhang, Y., and Bedford, M.T. (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep.* *7*, 397–403.

Kireeva, N., Lakonishok, M., Kireev, I., Hirano, T., and Belmont, A.S. (2004). Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J. Cell Biol.* *166*, 775–785.

Krauss, V. (2008). Glimpses of evolution: heterochromatic histone H3K9 methyltransferases left its marks behind. *Genetica* *133*, 93–106.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116–120.

Laget, S., Joulie, M., Le Masson, F., Sasai, N., Christians, E., Pradhan, S., Roberts, R.J., and Defossez, P.-A. (2010). The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA. *PLoS One* *5*, e11982.

Lau, P.N.I., and Cheung, P. (2011). Unlocking polycomb silencing through histone H3 phosphorylation. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 1514–1515.

Laue, K., Daujat, S., Crump, J.G., Plaster, N., Roehl, H.H., Tübingen 2000 Screen Consortium, Kimmel, C.B., Schneider, R., and Hammerschmidt, M. (2008). The multidomain protein Brpf1 binds histones and is required for Hox gene expression and segmental identity. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 1935–1946.

- Lazarus, R.A., Dietrich, R.F., Wallick, D.E., and Benkovic, S.J. (1981). On the mechanism of action of phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry (Mosc.)* 20, 6834–6841.
- Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N., and Shiekhatar, R. (2005). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* 437, 432–435.
- Lee, Y.M., Lee, S., Lee, E., Shin, H., Hahn, H., Choi, W., and Kim, W. (2001). Human kinesin superfamily member 4 is dominantly localized in the nuclear matrix and is associated with chromosomes during mitosis. *Biochem. J.* 360, 549–556.
- Levinger, L., and Varshavsky, A. (1982). Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell* 28, 375–385.
- Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–719.
- Li, D., Duell, E.J., Yu, K., Risch, H.A., Olson, S.H., Kooperberg, C., Wolpin, B.M., Jiao, L., Dong, X., Wheeler, B., et al. (2012). Pathway analysis of genome-wide association study data highlights pancreatic development genes as susceptibility factors for pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 33, 1384–1390.
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926.
- Li, Q., Lau, A., Morris, T.J., Guo, L., Fordyce, C.B., and Stanley, E.F. (2004). A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4070–4081.
- Lin, C.-J., Conti, M., and Ramalho-Santos, M. (2013). Histone variant H3.3 maintains a decondensed chromatin state essential for mouse preimplantation development. *Dev. Camb. Engl.* 140, 3624–3634.
- Lin, I.G., Han, L., Taghva, A., O'Brien, L.E., and Hsieh, C.-L. (2002). Murine de novo methyltransferase Dnmt3a demonstrates strand asymmetry and site preference in the methylation of DNA in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 22, 704–723.
- Lindner, T.H., Njolstad, P.R., Horikawa, Y., Bostad, L., Bell, G.I., and Sovik, O. (1999). A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2001–2008.
- Liu, W., Tanasa, B., Tyurina, O.V., Zhou, T.Y., Gassmann, R., Liu, W.T., Ohgi, K.A., Benner, C., Garcia-Bassets, I., Aggarwal, A.K., et al. (2010). PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* 466, 508–512.
- Llères, D., James, J., Swift, S., Norman, D.G., and Lamond, A.I. (2009). Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *J. Cell Biol.* 187, 481–496.
- Van Lohuizen, M. (1999). The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 355–361.

Loomis, R.J., Naoe, Y., Parker, J.B., Savic, V., Bozovsky, M.R., Macfarlan, T., Manley, J.L., and Chakravarti, D. (2009). Chromatin binding of SRp20 and ASF/SF2 and dissociation from mitotic chromosomes is modulated by histone H3 serine 10 phosphorylation. *Mol. Cell* 33, 450–461.

Di Lorenzo, A., and Bedford, M.T. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS Lett.* 585, 2024–2031.

Lu, P., Rha, G.B., and Chi, Y.-I. (2007). Structural basis of disease-causing mutations in hepatocyte nuclear factor 1beta. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 12071–12080.

Maeshima, K., and Laemmli, U.K. (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev. Cell* 4, 467–480.

Martínez-Balbás, M.A., Dey, A., Rabindran, S.K., Ozato, K., and Wu, C. (1995). Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell* 83, 29–38.

Mateescu, B., England, P., Halgand, F., Yaniv, M., and Muchardt, C. (2004). Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep.* 5, 490–496.

Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A.A., and Allis, C.D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat. Rev. Genet.* 15, 259–271.

Mazumdar, M., Sundareshan, S., and Misteli, T. (2004). Human chromokinesin KIF4A functions in chromosome condensation and segregation. *J. Cell Biol.* 166, 613–620.

Mendel, D.B., Khavari, P.A., Conley, P.B., Graves, M.K., Hansen, L.P., Admon, A., and Crabtree, G.R. (1991a). Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein. *Science* 254, 1762–1767.

Mendel, D.B., Hansen, L.P., Graves, M.K., Conley, P.B., and Crabtree, G.R. (1991b). HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev.* 5, 1042–1056.

Merkenschlager, M., and Odom, D.T. (2013). CTCF and cohesin: linking gene regulatory elements with their targets. *Cell* 152, 1285–1297.

Michelotti, E.F., Sanford, S., and Levens, D. (1997). Marking of active genes on mitotic chromosomes. *Nature* 388, 895–899.

Mishra, B.P., Ansari, K.I., and Mandal, S.S. (2009). Dynamic association of MLL1, H3K4 trimethylation with chromatin and Hox gene expression during the cell cycle. *FEBS J.* 276, 1629–1640.

Muramoto, T., Müller, I., Thomas, G., Melvin, A., and Chubb, J.R. (2010). Methylation of H3K4 is required for inheritance of active transcriptional states. *Curr. Biol. CB* 20, 397–406.

Nasmyth, K. (2011). Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nat. Cell Biol.* 13, 1170–1177.

- Neurohr, G., Naegeli, A., Titos, I., Theler, D., Greber, B., Díez, J., Gabaldón, T., Mendoza, M., and Barral, Y. (2011). A midzone-based ruler adjusts chromosome compaction to anaphase spindle length. *Science* 332, 465–468.
- Ng, R.K., and Gurdon, J.B. (2005). Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1957–1962.
- Ng, R.K., and Gurdon, J.B. (2008). Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat. Cell Biol.* 10, 102–109.
- Nicosia, A., Tafi, R., and Monaci, P. (1992). Trans-dominant inhibition of transcription activator LFB1. *Nucleic Acids Res.* 20, 5321–5328.
- Nishigori, H., Yamada, S., Kohama, T., Tomura, H., Sho, K., Horikawa, Y., Bell, G.I., Takeuchi, T., and Takeda, J. (1998). Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes* 47, 1354–1355.
- Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., Takahashi, Y., Hihara, S., Frangakis, A.S., Imamoto, N., Ishikawa, T., et al. (2012). Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 31, 1644–1653.
- Oh, S., Hahn, H., Torrey, T.A., Shin, H., Choi, W., Lee, Y.M., Morse, H.C., and Kim, W. (2000). Identification of the human homologue of mouse KIF4, a kinesin superfamily motor protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 219–224.
- Ohta, S., Bukowski-Wills, J.-C., Sanchez-Pulido, L., Alves, F. de L., Wood, L., Chen, Z.A., Platani, M., Fischer, L., Hudson, D.F., Ponting, C.P., et al. (2010). The protein composition of mitotic chromosomes determined using multiclassifier combinatorial proteomics. *Cell* 142, 810–821.
- Okano, M., Xie, S., and Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* 19, 219–220.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Orian, A., Abed, M., Kenyagin-Karsenti, D., and Boico, O. (2009). DamID: a methylation-based chromatin profiling approach. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 567, 155–169.
- Pagliuca, F.W., Collins, M.O., Lichawska, A., Zegerman, P., Choudhary, J.S., and Pines, J. (2011). Quantitative proteomics reveals the basis for the biochemical specificity of the cell-cycle machinery. *Mol. Cell* 43, 406–417.
- Pallier, C., Scaffidi, P., Chopineau-Proust, S., Agresti, A., Nordmann, P., Bianchi, M.E., and Marechal, V. (2003). Association of Chromatin Proteins High Mobility Group Box (HMGB) 1 and HMGB2 with Mitotic Chromosomes. *Mol. Biol. Cell* 14, 3414–3426.
- Papait, R., Pistore, C., Grazini, U., Babbio, F., Cogliati, S., Pecoraro, D., Brino, L., Morand, A.-L., Dechampesme, A.-M., Spada, F., et al. (2008). The PHD domain of Np95 (mUHRF1) is involved in large-scale reorganization of pericentromeric heterochromatin. *Mol. Biol. Cell* 19, 3554–3563.

Park, E.C., and Szostak, J.W. (1990). Point mutations in the yeast histone H4 gene prevent silencing of the silent mating type locus HML. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 4932–4934.

Passarge, E. (1979). Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *Am. J. Hum. Genet.* *31*, 106–115.

Pelletier, L., Rebouissou, S., Vignjevic, D., Bioulac-Sage, P., and Zucman-Rossi, J. (2011). HNF1 α inhibition triggers epithelial-mesenchymal transition in human liver cancer cell lines. *BMC Cancer* *11*, 427.

Peña, P.V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K.L., Verkhusha, V.V., Gozani, O., Zhao, R., and Kutateladze, T.G. (2006). Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* *442*, 100–103.

Pogo, B.G., Allfrey, V.G., and Mirsky, A.E. (1966). RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *55*, 805–812.

Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J.P., Babinet, C., and Yaniv, M. (1996). Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* *84*, 575–585.

Pontoglio, M., Faust, D.M., Doyen, A., Yaniv, M., and Weiss, M.C. (1997). Hepatocyte nuclear factor 1 α gene inactivation impairs chromatin remodeling and demethylation of the phenylalanine hydroxylase gene. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 4948–4956.

Pontoglio, M., Prié, D., Cheret, C., Doyen, A., Leroy, C., Froguel, P., Velho, G., Yaniv, M., and Friedlander, G. (2000). HNF1 α controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* *1*, 359–365.

Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., and Grant, P.A. (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* *433*, 434–438.

Probst, A.V., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 192–206.

Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jørgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., and Prokhortchouk, E. (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.* *15*, 1613–1618.

Razin, A. (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J.* *17*, 4905–4908.

Rebouissou, S., Vasiliu, V., Thomas, C., Bellanné-Chantelot, C., Bui, H., Chrétien, Y., Timsit, J., Rosty, C., Laurent-Puig, P., Chauveau, D., et al. (2005). Germline hepatocyte nuclear factor 1 α and 1 β mutations in renal cell carcinomas. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 603–614.

Rebrin, I., Bailey, S.W., Boerth, S.R., Ardell, M.D., and Ayling, J.E. (1995a). Catalytic characterization of 4a-hydroxytetrahydropterin dehydratase. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 5801–5810.

Rebrin, I., Bailey, S.W., and Ayling, J.E. (1995b). Activity of the bifunctional protein 4a-hydroxy-tetrahydropterin dehydratase/DCoH during human fetal development: correlation with dihydropteridine reductase activity and tetrahydrobiopterin levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *217*, 958–965.

Reese, B.E., Bachman, K.E., Baylin, S.B., and Rountree, M.R. (2003). The Methyl-CpG Binding Protein MBD1 Interacts with the p150 Subunit of Chromatin Assembly Factor 1. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 3226–3236.

Reuter, G., and Spierer, P. (1992). Position effect variegation and chromatin proteins. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *14*, 605–612.

Reznik, Y., Dao, T., Coutant, R., Chiche, L., Jeannot, E., Clauin, S., Rousselot, P., Fabre, M., Oberti, F., Fatome, A., et al. (2004). Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene inactivation: cosegregation between liver adenomatosis and diabetes phenotypes in two maturity-onset diabetes of the young (MODY)3 families. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 1476–1480.

Richards, E.J., and Elgin, S.C.R. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* *108*, 489–500.

Robinson, P.J.J., An, W., Routh, A., Martino, F., Chapman, L., Roeder, R.G., and Rhodes, D. (2008). 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. *J. Mol. Biol.* *381*, 816–825.

Rose, R.B., Bayle, J.H., Endrizzi, J.A., Cronk, J.D., Crabtree, G.R., and Alber, T. (2000). Structural basis of dimerization, coactivator recognition and MODY3 mutations in HNF-1alpha. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 744–748.

Rottach, A., Frauer, C., Pichler, G., Bonapace, I.M., Spada, F., and Leonhardt, H. (2010). The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification. *Nucleic Acids Res.* *38*, 1796–1804.

Ruthenburg, A.J., Wang, W., Graybosch, D.M., Li, H., Allis, C.D., Patel, D.J., and Verdine, G.L. (2006). Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 704–712.

Ruzov, A., Savitskaya, E., Hackett, J.A., Reddington, J.P., Prokhortchouk, A., Madej, M.J., Chekanov, N., Li, M., Dunican, D.S., Prokhortchouk, E., et al. (2009). The non-methylated DNA-binding function of Kaiso is not required in early *Xenopus laevis* development. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 729–738.

Ryan, A.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev.* *11*, 1207–1225.

Saitoh, Y., and Laemmli, U.K. (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* *76*, 609–622.

Sarge, K.D., and Park-Sarge, O.-K. (2005). Gene bookmarking: keeping the pages open. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 605–610.

Sarma, K., and Reinberg, D. (2005). Histone variants meet their match. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 139–149.

Sarraf, S.A., and Stancheva, I. (2004). Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol. Cell* *15*, 595–605.

Sasai, N., Nakao, M., and Defossez, P.-A. (2010). Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* *38*, 5015–5022.

Schedl, A. (2007). Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 791–802.

Schuetz, A., Allali-Hassani, A., Martín, F., Loppnau, P., Vedadi, M., Bochkarev, A., Plotnikov, A.N., Arrowsmith, C.H., and Min, J. (2006). Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 By WDR5. *EMBO J.* *25*, 4245–4252.

Sebastiano, V., Dalvai, M., Gentile, L., Schubart, K., Sutter, J., Wu, G.-M., Tapia, N., Esch, D., Ju, J.-Y., Hübner, K., et al. (2010). Oct1 regulates trophoblast development during early mouse embryogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 3551–3560.

Segil, N., Guermah, M., Hoffmann, A., Roeder, R.G., and Heintz, N. (1996). Mitotic regulation of TFIID: inhibition of activator-dependent transcription and changes in subcellular localization. *Genes Dev.* *10*, 2389–2400.

Senkel, S., Lucas, B., Klein-Hitpass, L., and Ryffel, G.U. (2005). Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim. Biophys. Acta* *1731*, 179–190.

Servitja, J.-M., Pignatelli, M., Maestro, M.A., Cardalda, C., Boj, S.F., Lozano, J., Blanco, E., Lafuente, A., McCarthy, M.I., Sumoy, L., et al. (2009). Hnf1alpha (MODY3) controls tissue-specific transcriptional programs and exerts opposed effects on cell growth in pancreatic islets and liver. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2945–2959.

Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T.A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., et al. (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* *450*, 908–912.

Shen, H., Fridley, B.L., Song, H., Lawrenson, K., Cunningham, J.M., Ramus, S.J., Cicek, M.S., Tyrer, J., Stram, D., Larson, M.C., et al. (2013). Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer. *Nat. Commun.* *4*.

Shi, L., Sun, L., Li, Q., Liang, J., Yu, W., Yi, X., Yang, X., Li, Y., Han, X., Zhang, Y., et al. (2011). Histone demethylase JMJD2B coordinates H3K4/H3K9 methylation and promotes hormonally responsive breast carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 7541–7546.

Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Peña, P., Lan, F., Kaadige, M.R., et al. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* *442*, 96–99.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* *119*, 941–953.

- Shiio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13225–13230.
- Shintomi, K., and Hirano, T. (2010). Sister chromatid resolution: a cohesin releasing network and beyond. *Chromosoma* *119*, 459–467.
- Sims, R.J., and Reinberg, D. (2006). Histone H3 Lys 4 methylation: caught in a bind? *Genes Dev.* *20*, 2779–2786.
- Skene, P.J., Illingworth, R.S., Webb, S., Kerr, A.R.W., James, K.D., Turner, D.J., Andrews, R., and Bird, A.P. (2010). Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. *Mol. Cell* *37*, 457–468.
- Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Pahwa, A., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2012). A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 25–30.
- Soderholm, J.F., Bird, S.L., Kalab, P., Sampathkumar, Y., Hasegawa, K., Uehara-Bingen, M., Weis, K., and Heald, R. (2011). Importazole, a small molecule inhibitor of the transport receptor importin- β . *ACS Chem. Biol.* *6*, 700–708.
- Sourdive, D.J., Chouard, T., and Yaniv, M. (1993). The HNF1 C-terminal domain contributes to transcriptional activity and modulates nuclear localisation. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie* *316*, 385–394.
- Soutoglou, E. (2001). Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *EMBO J.* *20*, 1984–1992.
- Soutoglou, E., Papafotiou, G., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins. *J. Biol. Chem.* *275*, 12515–12520.
- Spence, J.M., Phua, H.H., Mills, W., Carpenter, A.J., Porter, A.C.G., and Farr, C.J. (2007). Depletion of topoisomerase II α leads to shortening of the metaphase interkinetochore distance and abnormal persistence of PICH-coated anaphase threads. *J. Cell Sci.* *120*, 3952–3964.
- Spencer, C.A., Kruhlak, M.J., Jenkins, H.L., Sun, X., and Bazett-Jones, D.P. (2000). Mitotic transcription repression in vivo in the absence of nucleosomal chromatin condensation. *J. Cell Biol.* *150*, 13–26.
- Steffen, P.A., Fonseca, J.P., Gänger, C., Dworschak, E., Kockmann, T., Beisel, C., and Ringrose, L. (2013). Quantitative in vivo analysis of chromatin binding of Polycomb and Trithorax group proteins reveals retention of ASH1 on mitotic chromatin. *Nucleic Acids Res.* *41*, 5235–5250.
- Steward, M.M., Lee, J.-S., O'Donovan, A., Wyatt, M., Bernstein, B.E., and Shilatifard, A. (2006). Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 852–854.
- Sturm, R.A., and Herr, W. (1988). The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature* *336*, 601–604.

- Sullivan, B.A., and Karpen, G.H. (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 1076–1083.
- Sun, J., Zheng, S.L., Wiklund, F., Isaacs, S.D., Purcell, L.D., Gao, Z., Hsu, F.-C., Kim, S.-T., Liu, W., Zhu, Y., et al. (2008). Evidence for two independent prostate cancer risk-associated loci in the HNF1B gene at 17q12. *Nat. Genet.* *40*, 1153–1155.
- Takemoto, A., Maeshima, K., Ikehara, T., Yamaguchi, K., Murayama, A., Imamura, S., Imamoto, N., Yokoyama, S., Hirano, T., Watanabe, Y., et al. (2009). The chromosomal association of condensin II is regulated by a noncatalytic function of PP2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1302–1308.
- Tang, Q.Q., and Lane, M.D. (1999). Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* *13*, 2231–2241.
- Tavormina, P.A., Côme, M.-G., Hudson, J.R., Mo, Y.-Y., Beck, W.T., and Gorbsky, G.J. (2002). Rapid exchange of mammalian topoisomerase II alpha at kinetochores and chromosome arms in mitosis. *J. Cell Biol.* *158*, 23–29.
- Thomas, G., Jacobs, K.B., Yeager, M., Kraft, P., Wacholder, S., Orr, N., Yu, K., Chatterjee, N., Welch, R., Hutchinson, A., et al. (2008). Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat. Genet.* *40*, 310–315.
- Thon, G., and Klar, A.J. (1992). The *clr1* locus regulates the expression of the cryptic mating-type loci of fission yeast. *Genetics* *131*, 287–296.
- Thöny, B., Neuheiser, F., Kierat, L., Blaskovics, M., Arn, P.H., Ferreira, P., Rebrin, I., Ayling, J., and Blau, N. (1998). Hyperphenylalaninemia with high levels of 7-biopterin is associated with mutations in the PCBD gene encoding the bifunctional protein pterin-4a-carbinolamine dehydratase and transcriptional coactivator (DCoH). *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 1302–1311.
- Tolstorukov, M.Y., Goldman, J.A., Gilbert, C., Ogryzko, V., Kingston, R.E., and Park, P.J. (2012). Histone variant H2A.Bbd is associated with active transcription and mRNA processing in human cells. *Mol. Cell* *47*, 596–607.
- Tomei, L., Cortese, R., and De Francesco, R. (1992). A POU-A related region dictates DNA binding specificity of LFB1/HNF1 by orienting the two XL-homeodomains in the dimer. *EMBO J.* *11*, 4119–4129.
- Tsukiyama, T., and Wu, C. (1997). Chromatin remodeling and transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *7*, 182–191.
- Tsumura, A., Hayakawa, T., Kumaki, Y., Takebayashi, S., Sakaue, M., Matsuoka, C., Shimotohno, K., Ishikawa, F., Li, E., Ueda, H.R., et al. (2006). Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *11*, 805–814.
- Turner, B.M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* *111*, 285–291.
- Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K., and Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* *50*, 917–925.

- Ulinski, T., Lescure, S., Beaufile, S., Guignon, V., Decramer, S., Morin, D., Clauin, S., Deschênes, G., Bouissou, F., Bensman, A., et al. (2006). Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17, 497–503.
- Unoki, M., Nishidate, T., and Nakamura, Y. (2004). ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* 23, 7601–7610.
- Vagnarelli, P. (2012). Mitotic chromosome condensation in vertebrates. *Exp. Cell Res.* 318, 1435–1441.
- Verdeguer, F., Le Corre, S., Fischer, E., Callens, C., Garbay, S., Doyen, A., Igarashi, P., Terzi, F., and Pontoglio, M. (2010). A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat. Med.* 16, 106–110.
- Vermeulen, M., Eberl, H.C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K.K., Olsen, J.V., Hyman, A.A., Stunnenberg, H.G., et al. (2010). Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* 142, 967–980.
- Waddington, C.H. (2012). The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* 41, 10–13.
- Wallrath, L.L. (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 147–153.
- Wang, F., and Higgins, J.M.G. (2013). Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks. *Trends Cell Biol.* 23, 175–184.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004a). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873–878.
- Wang, X.-C., Xu, S.-Y., Wu, X.-Y., Song, H.-D., Mao, Y.-F., Fan, H.-Y., Yu, F., Mou, B., Gu, Y.-Y., Xu, L.-Q., et al. (2004b). Gene expression profiling in human insulinoma tissue: genes involved in the insulin secretion pathway and cloning of novel full-length cDNAs. *Endocr. Relat. Cancer* 11, 295–303.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Peng, W., Zhang, M.Q., et al. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* 40, 897–903.
- Wegner, M., Drolet, D.W., and Rosenfeld, M.G. (1993). Regulation of JC virus by the POU-domain transcription factor Tst-1: implications for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4743–4747.
- Wei, P., Tang, H., and Li, D. (2012). Insights into pancreatic cancer etiology from pathway analysis of genome-wide association study data. *PLoS One* 7, e46887.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A., and Allis, C.D. (1999). Phosphorylation of Histone H3 Is Required for Proper Chromosome Condensation and Segregation. *Cell* 97, 99–109.
- Wilkins, B.J., Rall, N.A., Ostwal, Y., Kruitwagen, T., Hiragami-Hamada, K., Winkler, M., Barral, Y., Fischle, W., and Neumann, H. (2014). A cascade of histone modifications induces chromatin condensation in mitosis. *Science* 343, 77–80.

Woodcock, C.L., and Ghosh, R.P. (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000596.

Wreggett, K.A., Hill, F., James, P.S., Hutchings, A., Butcher, G.W., and Singh, P.B. (1994). A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* 66, 99–103.

Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., et al. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442, 86–90.

Xing, H., Wilkerson, D.C., Mayhew, C.N., Lubert, E.J., Skaggs, H.S., Goodson, M.L., Hong, Y., Park-Sarge, O.-K., and Sarge, K.D. (2005). Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science* 307, 421–423.

Xing, H., Vanderford, N.L., and Sarge, K.D. (2008). The TBP-PP2A mitotic complex bookmarks genes by preventing condensin action. *Nat. Cell Biol.* 10, 1318–1323.

Yan, J., Enge, M., Whittington, T., Dave, K., Liu, J., Sur, I., Schmierer, B., Jolma, A., Kivioja, T., Taipale, M., et al. (2013). Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites. *Cell* 154, 801–813.

Yang, Z., He, N., and Zhou, Q. (2008). Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* 28, 967–976.

Yoon, H.-G., Chan, D.W., Reynolds, A.B., Qin, J., and Wong, J. (2003). N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol. Cell* 12, 723–734.

Young, D.W., Hassan, M.Q., Yang, X.-Q., Galindo, M., Javed, A., Zaidi, S.K., Furcinitti, P., Lapointe, D., Montecino, M., Lian, J.B., et al. (2007a). Mitotic retention of gene expression patterns by the cell fate-determining transcription factor Runx2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3189–3194.

Young, D.W., Hassan, M.Q., Pratap, J., Galindo, M., Zaidi, S.K., Lee, S., Yang, X., Xie, R., Javed, A., Underwood, J.M., et al. (2007b). Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. *Nature* 445, 442–446.

Zaidi, S.K., Grandy, R.A., Lopez-Camacho, C., Montecino, M., van Wijnen, A.J., Lian, J.B., Stein, J.L., and Stein, G.S. (2014). Bookmarking target genes in mitosis: a shared epigenetic trait of phenotypic transcription factors and oncogenes? *Cancer Res.* 74, 420–425.

Zeng, L., and Zhou, M.M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* 513, 124–128.

Zentner, G.E., and Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 259–266.

Zhao, R., Nakamura, T., Fu, Y., Lazar, Z., and Spector, D.L. (2011). Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation. *Nat. Cell Biol.* 13, 1295–1304.

Zucman-Rossi, J., Jeannot, E., Nhieu, J.T.V., Scoazec, J.-Y., Guettier, C., Rebouissou, S., Bacq, Y., Letteurtre, E., Paradis, V., Michalak, S., et al. (2006). Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology*. Baltimore, Md 43, 515–524.

« La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de la science. »

François Jacob