



**HAL**  
open science

## Les foyers nucléaires de stress : conséquences structurales et fonctionnelles

Jessica Penin

► **To cite this version:**

Jessica Penin. Les foyers nucléaires de stress : conséquences structurales et fonctionnelles. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV095 . tel-01685337

**HAL Id: tel-01685337**

**<https://theses.hal.science/tel-01685337>**

Submitted on 16 Jan 2018

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Jessica PENIN**

Thèse dirigée par **Claire VOURC'H** et  
codirigée par **Cécile CARON**

préparée au sein du **laboratoire IAB Cri-Inserm/UJF U823**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## Les foyers nucléaires de stress : conséquences structurales et fonctionnelles

Thèse soutenue publiquement le **1er Avril 2016**  
devant le jury composé de :

**Docteur, Aline, PROBST**

GReD - CNRS UMR6293 - INSERM U1103

Rapporteur

**Docteur, Christian, MUCHARDT**

CNRS UMR 3738 - UR2578

Rapporteur

**Docteur, Valérie, MEZGER**

CNRS UMR7216

Examineur

**Docteur, Patrick, LOMONTE**

CNRS UMR5534

Examineur

**Professeur, Hans, GEISELMANN**

LAPM - UMR 5163

Président

**Docteur, Cécile CARON**

CRI INSERM/UJF U823

Membre

**Professeur, Claire VOURC'H**

CRI INSERM/UJF U823

Membre



# Résumé

## Les foyers nucléaires de stress : étude structurale et fonctionnelle.

Une réponse rapide et adaptée est nécessaire à la survie des cellules soumises à un stress. Cette réponse médiée par le facteur de transcription HSF1 : *la réponse cellulaire au stress* (HSR pour Heat-Shock response) est induite par les contextes environnementaux (chaleur, hypoxie, ...) et les processus biologiques normaux et pathologiques (vieillesse, inflammation, ...) associés à une accumulation de protéines endommagées. Elle limite ainsi les dommages liés à l'accumulation de ces protéines endommagées en agrégats toxiques qui ont des conséquences létales pour les cellules.

Conservé chez tous les eucaryotes, HSF1 orchestre les actions nécessaires à la survie et à la croissance des cellules malgré le stress. Ses cibles les mieux connues sont les gènes codant pour les Heat Shock Protein (HSP) qui font office de chaperons moléculaires. Une caractéristique de la HSR chez l'Homme est l'accumulation massive du facteur HSF1 en foyers nucléaires nommés Nuclear Stress Bodies (nSBs). Curieusement, ces foyers ciblent l'hétérochromatine péricentrique composée de séquences répétées en tandem de type Satellite III (SATIII), particulièrement au niveau du *locus* 9q12. HSF1 induit alors une accumulation de transcrits de type SATIII Sens (Jolly et al., 2004). Le rôle des nSBs est une des problématiques majeures de notre équipe cependant jusqu'à présent aucune fonction n'a été confirmée pour ces structures.

Les nSBs, spécifiques à l'Homme, n'ont été décrits que dans des cellules en culture. Mon projet de thèse a consisté dans un premier temps à montrer l'existence des nSBs *in vivo* chez l'Homme. Cette étude, réalisée sur du tissu testiculaire nous a également permis d'identifier une nouvelle cible SATIII majeure pour HSF1, la région Yq12. Dans les testicules, les nSBs sont associés à des stades cellulaires méiotiques et post-méiotiques, ce qui suggérerait un rôle dans le remodelage de l'hétérochromatine. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle des nSBs lors de la HSR. Nous avons pu montrer que l'étape de transcription des SATIII induit une déstabilisation de l'hétérochromatine péricentrique caractérisée par une dissociation des facteurs HPI (Heterochromatin Protein I)  $\alpha$  et  $\beta$  et une perte de la marque répressive H3K9me3. La perte complète et durable (plus de 24 heures) d'hétérochromatine péricentrique nous a permis de souligner la pertinence de la phase de récupération au stress comme modèle d'étude des mécanismes associés à la mise en place d'hétérochromatine péricentrique. Parmi ces mécanismes nous avons montré une transcription séquentielle d'ARN SATIII Sens puis Anti-sens sous le contrôle des protéines HPI. Une approche LNA-DNA nous a également permis de montrer que la transcription des SATIII, consécutive à la formation des nSBs, entraîne un ralentissement de la mitose. Dans des cellules tumorales, qui possèdent des points de contrôles mitotiques altérés, la transcription des SATIII entraîne la formation d'instabilités chromosomiques dont l'apparition de cellules polynucléées, ce qui pourrait causer la sélection de tumeurs agressives.

## Nuclear stress Bodies : Structural and functional analysis.

Cell survival upon stress requires a rapid and well-adapted response : The *cellular stress response* (HSR). Activated by environmental stress (heat, hypoxia, ...) and by patho-physiological contexts (aging, inflammation, ...) involving protein damages, it's mediated by the major transcription factor *Heat Shock Factor 1* (HSF1).

The best-characterized targets of HSF1 are genes coding for *Heat Shock Protein* (HSP) acting as molecular chaperone. But in human cells, a specific feature of the HSR is the presence of HSF1 nuclear foci named *Nuclear Stress Bodies* (NSBs). Surprisingly, nSBs target pericentric heterochromatin composed by tandem repeats of Satellite III (SATIII) sequences, particularly at the 9q12 *locus* and triggers a strong transcriptional activation of this *locus*. No functions related to these structures have been reported, the role of nSBs is a major problematic.

So far, nSBs have been only identified in culture cells. My thesis project has been to further explore whether these structures also existed in normal tissues. Indeed, we have been able to identify the presence of nSBs in testis where they were found to be associated to meiotic and post-meiotic stages, suggesting a role related to heterochromatin remodeling. Moreover, we have identified the Yq12 locus as new target of nSBs in these tissues. Secondly, we have brought new evidence that SATIII transcription triggers a transient dissociation of HPI (heterochromatin Protein I)  $\alpha$  and  $\beta$  as well as a loss of the repressive epigenetic H3K9me3 histone mark at pericentric heterochromatin. Interestingly we have also found that, following stress, a sequential accumulation of SATIII RNA in a Sense and Antisense orientation occurs, suggesting that this specific pattern of expression plays an important role in heterochromatin reformation. Finally, we have found that the accumulation of SATIII RNA is associated with a delay of mitosis. Indeed we have found that in stressed cells, accumulation of SATIII impacts the progression of mitosis and that a *knock down* of SATIII transcription using LNA-DNA approaches releases it. A genomic instability of tumor cells is also triggered by SATIII transcription, leading to the appearance of polynucleated cells.



# Remerciements

Je tiens à remercier l'école doctorale de Grenoble ainsi que la Fondation Médicale pour la Recherche d'avoir financé mes travaux de thèse.

Merci à tous les membres du jury d'avoir évalué ces travaux : P.Lomonte, V.Mezger, C.Muchardt, A.Probst et au président H.Geiselmann. Mais également aux membres de mon Comité de suivi de thèse P.Lomonte et S.Khochbin pour avoir suivi l'évolution de ces quatre années.

Merci à Claire Vourc'h de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir encadré ma thèse, ainsi que pour cette thématique si passionnante. J'aurai beaucoup appris à votre contact.

Merci à Cécile pour avoir accepté de co-encadrer mon projet de thèse. Travailler avec toi aura été un vrai plaisir et une expérience très enrichissante.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler, des membres de mon équipe à ceux de l'institut, pour tout ce que vous m'avez transmis comme pour tout ce qu'on a partagé. Plus particulièrement à Catherine, Edwige, Solenne, Virginie, Eric, Gaëtan, Lydia, Neda et Sivan avec qui j'ai partagé le quotidien. A Alexei, Jacques et Mylène qui réalisent un travail exceptionnel sur les différentes plateformes de l'institut (microscopie, cytométrie, ...) et ont été d'une aide inestimable. Et merci aussi à tous les membres du comité des thèses qui ont grandement contribué à enjoliver ces quatre années. Notamment aux *anciens* Aysegul, Chloé, Matteo et plus particulièrement Yohan avec qui on aura commencé et terminé !

Bien évidemment je remercie mes parents ainsi que ma petite sœur pour bien plus que mon doctorat !

Un grand merci à Amélie pour son soutien indéfectible au cours de ces quatre longues années (et depuis le lycée en fait !). Rien de tout ça n'aurait été possible sans toi. Que ce soit pour le quotidien, le manuscrit ou encore le buffet final (et tout ce qui n'est pas listé ici) : encore merci !

Quant à toi Thierry tu m'as aidée, soutenue et supportée dans chaque étape de ma thèse comme tu le fais dans chaque étape de la vie. Merci de t'être autant impliqué et investi et de t'être même remis à la Biologie ! Ce manuscrit comme la soutenance n'auraient pas vu le jour sans toi.



## **Abbreviations les plus utilisées**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ARN POLII** : ARN Polymérase II

**SATIII** : Satellite III

**IncARN** : long ARN non-codant

**CD** : Chromodomain d'HPI

**CpG** : Dinucléotides composés d'une cytosine et d'une Guanine

**CSD** : Chromoshadowdomain d'HPI

**C-ter** : Extrémité C-terminale d'une protéine

**DAPI** : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

**FACS** : Fluorescence-activated cell sorting ou Cytométrie en flux

**FISH ARN** : Fluorescent In Situ Hybridization ARN

**FISH ADN** : Fluorescent In Situ Hybridization

**FUCCI** : Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator

**HA-HPI  $\beta\Delta N$**  : Mutant de la protéine HPI  $\beta$  tronquée de son domaine N-terminal

**HaKbme/ac** : Résidu a de l'histone b méthylé ou acétylé

**HSF** : Heat-Shock Factor

**IF** : Immunofluorescence

**HPI** : Heterochromatin Protein I

**HS** : Stress thermique

**HSE** : Eléments de réponse au stress thermique

**HSR** : Réponse Cellulaire au stress

**M** : Mitose

**N-ter** : Extrémité N terminale d'une protéine

**NHS** : non stressées

**nSBs** : Foyers nucléaires de stress

**Pb** : Paires de bases

**PTM** : Modifications post-traductionnelles

**SAT** : Séquences Satellite

# Table des matières

<b>Chapitre I : Introduction</b> -----	<b>1</b>
<i>I- La réponse au stress</i> -----	<i>1</i>
1. Causes et conséquences -----	1
1.1. Le stress et la réponse cellulaire-----	1
1.2. Les principaux acteurs-----	2
2. L'acteur majeur de la HSR : HSF1 -----	8
2.1. Ses caractéristiques-----	9
2.2. La régulation d'HSF1-----	11
3. Les foyers nucléaires de stress -----	14
3.1. Une caractéristique des cellules humaines -----	14
3.2. Une transcription active -----	17
3.3. Le rôle des foyers nucléaires de stress -----	20
<i>II- La structure chromatinienne des régions péricentriques.</i> -----	<i>24</i>
1. De l'ADN à l'hétérochromatine constitutive : -----	24
1.1. La structure de la chromatine -----	24
1.2. La régulation de la structure de la chromatine : l'épigénétique -----	28
1.3. Les différents types de chromatine -----	36
2. L'hétérochromatine péricentrique -----	42
2.1. Les séquences répétées-----	42
2.2. La marque H3K9me3 -----	45
2.3. Les protéines HP1 -----	47
<i>III- La mise en place et le maintien de la structure hétérochromatique des régions péricentriques</i> -----	<i>54</i>
1. La mise en place et le maintien de l'hétérochromatine péricentrique -----	54
1.1. L'évolution des régions centromériques et péricentriques -----	54
1.2. Le modèle de S.Pombe-----	57
1.3. L'exemple des mammifères-----	60
2. Garants de l'intégralité du génome -----	64
2.1. Les étapes clefs de la division cellulaire-----	64
2.2. La fonction des centromères et des régions péricentromériques dans la mitose et la ségrégation des chromatides sœurs-----	66
2.3. Les conséquences de défauts de ségrégation des chromosomes : les CIN-----	69
3. Les régions péricentriques et la réponse au stress -----	71
Problématique et hypothèse de travail-----	71
<b>Chapitre II : Matériels et Méthodes</b> -----	<b>75</b>

<i>I- Culture cellulaire, stress et drogues utilisées</i> -----	75
1. Culture cellulaire et stress-----	75
2. Les drogues utilisées-----	75
3. La transfection de plasmides -----	77
<i>II- Analyse in situ</i> -----	77
1. Marquages fluorescents -----	77
2. Observation microscopique et analyse d'image -----	80
3. Vidéomicroscopie de cellules vivantes HeLa-----	81
4. Cytométrie en Flux-----	82
<i>III-Analyses biochimiques</i> -----	82
1. Analyse Protéique -----	82
2. Analyse Nucléique-----	83
3. Analyse de l'interaction protéine/acide nucléique-----	84
<b>Chapitre III : Résultats</b> -----	<b>86</b>
<i>I -Une nouvelle cible pour HSF1 dans les cellules mâles</i> -----	87
1. La région Yq12 est massivement ciblée par HSF1 en réponse au stress thermique-----	88
1.1. La région 9q12 n'est pas la seule cible primaire dans les cellules humaines mâles-----	88
1.2. La région Yq12 est une cible du facteur HSF1 dans les cellules mâles-----	90
2. Les régions Yq12 sont activement transcrites en réponse au stress-----	92
2.1. La région Yq12 est ciblée avec une plus grande efficacité par HSF1 que la région 9q12 lors de la HSR -----	93
2.2. Les foyers HSF1 des régions Yq12 sont acétylés et transcrits à l'identique des régions 9q12-----	95
3. HSF1 s'accumule <i>in vivo</i> sur les SATIII des régions 9q12 et Yq12 au cours de la gamétogénèse-----	96
3.1. HSF1 forme des foyers dans les testicules humains -----	98
3.2. HSF1 cible les régions 9q12 et Yq12 dans les testicules humains -----	98
<i>II- La transcription des SATIII par HSF1 cause la perte de la structure hétérochromatique des régions 9q12 associée à une instabilité génomique</i> -----	101
1. La transcription des SATIII en réponse au stress thermique induit la perte de la structure hétérochromatique des régions péri-centriques 9q12 -----	102
1.1. Le stress thermique entraîne une perte d'HP1 $\alpha$ et d'H3K9me3 spécifiquement aux régions péri-centriques 9q12-----	102
1.2 : La perte d'HP1 $\alpha$ et d'H3K9me3 aux régions 9q12 est dépend de la transcription des séquences SATIII par HSF1 dans les cellules stressées.-----	110
Conclusion -----	114

2. La remise en place d'hétérochromatine péricentrique a lieu très tardivement au cours de la récupération et implique les protéines HP1 -----	115
2.1 Caractérisation de la remise en place de l'hétérochromatine péricentrique au cours de la récupération du stress -----	115
2.2. Rôle des protéines HP1 dans la remise en place de l'hétérochromatine péricentrique au cours de la récupération au stress -----	121
Conclusion -----	125
3. <i>La transcription des SATIII entraine l'accumulation de défauts mitotiques et une instabilité génomique</i> -----	127
3.1. Le stress thermique entraine un ralentissement de la mitose des cellules HeLa FUCCI -----	128
Conclusion -----	136
3.2. La transcription des SATIII induit le ralentissement de la mitose des cellules stressées en G2 ---	137
Conclusion -----	140
<b>Chapitre IV : Conclusions et discussion</b> -----	<b>143</b>
<i>I- Une nouvelle cible pour le facteur HSF1</i> -----	143
<i>II- La transcription des SATIII en réponse au stress thermique cause la perte de la structure hétérochromatique des régions 9q12 et une instabilité génomique</i> -----	146
1. L'impact du stress sur l'hétérochromatine constitutive péricentrique-----	146
2. La récupération au stress : un modèle de reformation de l'hétérochromatine constitutive chez l'Homme ? -----	148
3. La perte de l'hétérochromatine péricentrique constitutive est-elle cause de CIN ? -----	154
<i>III- Perspectives</i> -----	156
<b>Bibliographie</b> -----	<b>158</b>

# Liste des Figures

## Chapitre 1 : Introduction

Fig 1.1. La Réponse cellulaire au stress (HSR).

Fig 1.2. Arbre phylogénétique de la famille HSF.

Fig 1.3. La composition des trimères d'HSF varie en fonction des conditions physiologiques et pathologiques.

Fig 1.3. La composition des trimères d'HSF varie en fonction des conditions physiologiques et pathologiques.

Fig 1.4. Liaison des HSF aux éléments de réponse au stress (HSE).

Fig 1.5. La régulation par HSF1 de nombreux processus biologiques diffère selon le contexte (cancer ou stress) dans lequel ce facteur de transcription est activé.

Fig 1.6. Le facteur HSF1.

Fig 1.7. Cycle d'activation et d'atténuation d'HSF1 au cours de la réponse au stress.

Fig 1.8. Les foyers nucléaires de stress (nSBs).

Fig 1.9. Régions chromosomiques capables d'être ciblées par HSF1.

Fig 1.10. Séquestration massive de facteurs aux nSBs lors de la HSR.

Fig 1.11. La transcription des SATIII impacte les régions géniques localisées à proximité.

Fig 1.12. Régulation de la structure des régions péricentriques.

Fig 1.13. Organisation structurale de la fibre chromatinienne.

Fig 1.14. Les Associations Topologiques de Domaines (TAD).

Fig 1.15. Modifications post-traductionnelles des histones.

Fig 1.16. Différences majeures entre les deux grands types de chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine.

Fig 1.17. Le contraste Euchromatine/Hétérochromatine.

Fig 1.18. Modifications post-traductionnelles d'histones enrichies à l'hétérochromatine ou à l'euchromatine.

Fig 1.19. Les séquences répétées du génome humain.

Fig 1.20. Localisations chromosomiques des différentes séquences répétées du génome humain.

Fig 1.21. La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3.

Fig 1.22. Les domaines protéiques des facteurs la famille HPI.

Fig 1.23. Représentation structurale de la liaison de la protéine HPI  $\alpha$  au nucléosome.

Fig 1.24. HPI peut adopter différentes conformations, ce qui régule sa capacité à propager l'hétérochromatine.

Fig 1.25. Evolution de la composition des centromères et des régions péricentriques de S.Pombe à l'Homme.

Fig 1.26. Formation de l'hétérochromatine péricentrique chez S.Pombe.

Fig 1.27. Développement embryonnaire précoce murin.

Fig 1.28. Formation de l'hétérochromatine péricentrique chez les mammifères.

Fig 1.30. Structure des centromères chez l'Homme.

Fig 1.31. Accumulation d'instabilités chromosomiques suite à des défauts de checkpoints mitotiques.

Fig 1.32. De l'instabilité génétique à l'instabilité chromosomique et la formation de cellules tumorales.

## Chapitre 2 : Matériel et Méthode

Fig 2.1. Structure des monomères de Locked nucleic acid (LNA).

Fig 2.2. Analyse de la colocalisation.

Tab 2.1. Plasmides.

Tab 2.2. Anticorps et fluorophores.

Tab 2.3. Séquences de nucléotides.

### **Chapitre 3 : Résultats**

Fig 3.1. Les foyers nucléaires de stress.

Fig 3.2. Les nombre de nSBs varie selon le genre des cellules.

Fig 3.4. Les séquences SATIII du chromosome Y sont ciblées par HSF1.

Fig 3.5. La région Yq12 est un site majeur de formation des nSBs dans les cellules humaines mâles.

Fig 3.6. HSF1 se fixe aux régions Yq12 dans les cellules HT1080 stressées.

Fig 3.7. Le facteur HSF1 a une affinité plus grande pour la région Yq12.

Fig 3.8. La région Yq12 a la capacité d'être transcriptionnellement active.

Fig 3.9. Les régions Yq12 sont transcrites dans les cellules humaines mâles.

Fig 3.10. HSF1 forme des foyers in vivo dans le tissu testiculaire humain.

Fig 3.11 : HSF1 et HSF2 ciblent les loci 9q12 et Yq12 in vivo dans le tissu testiculaire humain.

Fig 3.12. Le locus 9q12 perd les marques caractéristiques de l'hétérochromatine constitutive en réponse au stress thermique.

Fig 3.13. L'enrichissement d'HP1 alpha et d'H3K9me3 aux régions enrichies en CENP-B ne diminue pas dans les cellules soumises à un stress thermique modéré.

Fig 3.14. La distribution d'HP1 varie en fonction de l'intensité des stress auxquels les cellules sont soumises.

Fig 3.15. Les foyers HSF1 formés lors d'un stress thermique intense sont transcriptionnellement inactifs.

Fig 3.16. Les cellules soumises à un stress thermique intense transcrivent les SATIII-S lors de la récupération du stress.

Fig 3.17. La formation de foyers HSF1 fonctionnels est nécessaire à la perte des marques hétérochromatiques du locus 9q12 en réponse à un stress thermique modéré.

Fig 3.18. La transcription des SATIII cause la perte d'HP1 alpha et d'H3K9me3 au locus 9q12 en réponse à un stress thermique.

Fig 3.19. Les LNA-DNA SATIII-S n'impactent pas les acteurs recrutés en amont de la transcription des nSBs.

Fig 3.20. Un stress thermique modéré de 30 minutes est suffisant pour induire la perte d'H3K9me3 et HP1 alpha aux régions 9q12.

Fig 3.21. Devenir des transcrits SATIII lors de la récupération à un stress.

Fig 3.22. H3K9me3 ne colocalise pas avec les transcrits SATIII-S et SATIII-AS jusqu'à 24 heures de récupération.

Fig 3.23. HP1 alpha et HP1 beta surexprimés se comportent comme HP1 endogène en réponse à un stress thermique modéré.

Fig 3.24. HP1 alpha et beta régulent l'accumulation des ARN SATIII en foyers nucléaires, mais n'y sont pas localisés.

Fig 3.25. La délétion des protéines HP1 n'entraîne pas d'accumulation de transcrits SATIII.

Fig 3.26. La délétion des protéines HP1 entraîne une accumulation très précoce d'ARN SATIII-AS en réponse à un stress thermique.

Fig 3.27. La Knock Down des facteurs HP1 résulte en une accumulation tardive d'ARN SATIII-AS.

Fig 3.28. Profil de fluorescence des cellules HeLa FUCCl en fonction des phases du cycle cellulaire.

Fig 3.29. La fluorescence émise par les protéines de fusion utilisées comme marqueurs du cycle dans les cellules HeLa FUCCl n'est pas affectée par un stress thermique.

Fig 3.30. La formation de nSBs dans les cellules HeLa FUCCl.

*Fig 3.31. L'accumulation de transcrits SATIII-S varie en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle les cellules sont stressées.*

*Fig 3.32. La progression du cycle cellulaire est modifiée par un stress thermique.*

*Fig 3.33. Un stress thermique appliqué sur des cellules en phase G2 ralentit la durée de la mitose.*

*Fig 3.34. Un stress thermique appliqué à des cellules en phase G2 ralentit spécifiquement la phase de mitose sans affecter la durée des autres phases du cycle cellulaire.*

*Fig 3.35. Les LNA-DNA SATIII-S induisent une diminution du nombre de cellules HeLa FUCCI formant des foyers d'ARN SATIII-S en réponse au stress.*

*Fig 3.36. Le ralentissement de la mitose résulte de la transcription et/ou de l'accumulation de transcrits SATIII-S.*

*Fig 3.37. La transcription des ARN SATIII en réponse au stress provoque des catastrophes mitotiques et est source d'instabilités chromosomiques.*

## **Chapitre 4 : Discussion et perspectives**

*Fig 4.1. L'organisation de la chromatine péricentrique des loci 9q12 au cours de la HSR et de la phase de récupération au stress*

*Fig 4.2. Formation de l'hétérochromatine induite par des facteurs de transcription.*

*Fig 4.3. Représentation schématique de l'impact des protéines HPI sur l'accumulation des transcrits SATIII péricentriques lors de la HSR et de la récupération.*

*Fig 4.4. Les nSBs : cause d'instabilité génomique et de tumeurs agressives chez l'Homme ?*



# Chapitre I : Introduction

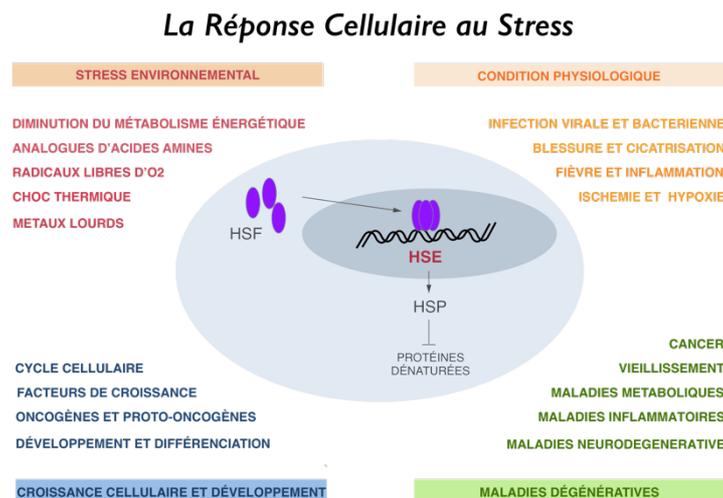
## I- La réponse au stress

La réponse au stress cellulaire est au centre de la problématique de notre équipe et de mon sujet de thèse. La première partie de cette introduction décrit ce qu'est un stress pour une cellule et les mécanismes de protection qu'il induit. Puis nous nous intéresserons à l'acteur clef de la réponse au stress et aux mécanismes moléculaires à la base de sa régulation. Enfin nous étudierons une particularité des cellules humaines, la formation de *foyers nucléaires de stress*.

## 1. Causes et conséquences

### 1.1. Le stress et la réponse cellulaire

Toutes les cellules sont confrontées au cours de leur vie à des conditions stressantes. Que ce soit un neurone, qui doit survivre très longtemps, une levure ou encore une cellule intestinale constamment au contact de pathogènes. Ces situations physiopathologiques tout comme ces changements environnementaux induisent un stress dit *protéotoxique* [Fig.1.1]. Ce stress consiste en une accumulation de protéines endommagées et dénaturées pouvant former des agrégats irréversibles et toxiques. En l'absence d'une réponse rapide et adaptée les conséquences sont létales (D. Fischer et al., 2002).



**Fig 1.1. La Réponse cellulaire au stress (HSR).** Un grand nombre de conditions physiologiques et pathologiques induisent des stress protéotoxiques. Ces stress activent la HSR médiée par les Heat Shock Factors (HSF) qui, sous forme de trimères, interagissent avec les promoteurs des gènes de choc thermique (*hsp*) par leurs séquences cibles (HSE). L'accumulation de protéines de choc thermique diminue celle des protéines déstructurées et agrégées, limitant ainsi la toxicité du stress. (D'après Morimoto et al., 2008).

C'est en 1962 que le premier signe d'une réponse active des cellules face à un stress a été fortuitement observé chez *Drosophila melanogaster*. L'induction accidentelle d'un stress thermique intense a permis l'observation de *puffs* transcrits très visibles au niveau des chromosomes des glandes salivaires (Ritossa et al., 1964). Cette découverte a été suivie en 1974 et en 1984 par celle des acteurs principaux de la réponse au stress : les protéines de choc thermique (HSP pour *Heat Shock Protein*) et le facteur de transcription associé HSTF (pour *Heat-Shock Factor Transcription*) (Parker et al., 1984; Tissières et al., 1974).

Ces acteurs font parti d'une réponse majeure nommée la réponse cellulaire au stress (HSR pour *Heat-Shock Response*) très étudiée depuis. Ubiquitaire et conservée chez tous les eucaryotes cette réponse est essentielle au développement et à la survie des cellules de part sa capacité à limiter les dommages vitaux liés au stress. Deux familles de protéines clefs sont impliquées : Les HSP et leurs facteurs de transcription les HSF (ou *Heat-Shock Factors*).

## **1.2. Les principaux acteurs**

Particulièrement conservés au cours de l'évolution, les acteurs de la HSR sont nécessaires au fonctionnement et à la survie des cellules. On les retrouve au centre des mécanismes de la réponse au stress où ils intègrent un grand nombre de signaux et engendrent de très nombreuses voies de signalisation. C'est par ce biais que la survie des cellules dans des conditions hostiles est assurée. Récemment une cartographie chez la levure réalisée à partir de plus de 900 études, incorporant 26 stimuli rassemblés en 6 voies de signalisation, a permis de décrire leur position clef dans ce système d'interaction dit en *nœud-papillon* (Kawakami et al., 2016).

### **Les protéines de choc thermique (HSP)**

Les HSP sont les effecteurs de la réponse au stress. Pour la plupart ce sont des protéines constitutivement exprimées dans les cellules. C'est par leur rôle de chaperons moléculaires qu'elles régulent l'homéostasie protéique assurant ainsi la protection, le maintien et la régulation des fonctions protéiques. L'ensemble de ces processus est vital au fonctionnement des cellules dans des conditions normales. Au moment du stress les HSP sont massivement induites par les HSF (Morimoto, 1993) pour répondre à l'accumulation d'un grand nombre de protéines endommagées ou agrégées. Elles restaurent alors l'homéostasie protéique en assurant le repliement tridimensionnel ou l'élimination par le *protéasome* des protéines endommagées. Ces rôles primordiaux dans la survie des cellules sont à la base des mécanismes d'adaptation au stress.

Par exemple, dans le cas d'un stress thermique, la *thermotolérance* est acquise par l'augmentation permanente de protéines HSP.

Classées en fonction de leur poids moléculaire, les trois familles les plus connues sont les HSP70, HSP90 et les petites HSP (sHSPs). Très sollicitées par les cellules, HSP70 et HSP90 constituent 1% à 2% du total des protéines (Taipale et al., 2010).

- HSP70 :

L'activité chaperon de ces protéines leur est attribuée par leur capacité à se lier aux acides aminés hydrophobes. Comme les autres HSP elles régulent, par cette activité chaperon, un grand nombre de processus biologiques variés au cours d'un stress. Parmi eux elles diminuent l'effet délétère des stress en empêchant la formation d'agrégats toxiques pour les cellules. Elles assurent aussi les divisions cellulaires en stabilisant des protéines comme dans le cas du centrosome, permettant ainsi le déroulement de la mitose de cellules soumises à des stress thermiques modérés (Hut et al., 2005). Ou encore elles évitent l'entrée en apoptose notamment en bloquant le recrutement de la pro-caspase9 au complexe de l'apoptosome Apaf-1 (Beere et al., 2000). Par tous ces mécanismes elles confèrent une résistance aux chimiothérapies tout en augmentant les risques invasifs des cellules tumorales (Juhász et al., 2013).

- HSP90 :

Les protéines HSP90 sont, quant à elles, connues pour leur rôle essentiel de chaperon des facteurs de transcription. Comme les HSP70 elles impactent des processus biologiques variés. Il a été montré chez la levure que la survie en réponse à un stress est directement corrélée au niveau d'HSP90 (Borkovich et al., 1989). Chez les mammifères, l'association d'HSP90 avec les microtubules et les microfilaments stabilise le cytosquelette et participe au maintien de l'intégrité cellulaire après un stress (Czar et al., 1996).

- sHSP :

Pour leur part, les sHSP se différencient par la présence d'un motif  $\alpha$ -crystalline à la base de leur liaison aux autres peptides. Parmi elles, l' $\alpha\beta$ -crystalline et HSP27 sont des protéines cytosoliques exprimées constitutivement dans un grand nombre de tissus. Tout comme les autres HSP, lorsqu'elles sont induites par un stress, elles ont un rôle de chaperon moléculaire, un rôle anti-

apoptotique et participent aux mécanismes d'adaptation au stress (Trautinger et al., 1997). Ces deux protéines ont également une implication dans les maladies neurodégénératives liées à l'accumulation d'agrégats protéiques : une mutation dominante dans le gène de l' $\alpha\beta$ -crystalline conduit chez l'homme à une myopathie myofibrillaire associée à une cataracte (Fischer et al., 2002).

### Les facteurs de transcription de la réponse au stress (HSF) :

Comme décrit précédemment, les HSF sont les facteurs de transcription responsables de l'accumulation des HSP au moment du stress. De part leur capacité à intégrer les signaux liés à un stress, puis à celle de les retranscrire en cascades de signalisation nécessaires à la survie des cellules, ils sont le point central de la HSR. Par exemple dans le cas d'un stress thermique, ils sont activés par la présence de protéines endommagées. C'est alors qu'ils induisent une répression globale de la transcription et de la traduction, tout en contrôlant l'activation spécifique des gènes essentiels pour éviter et réparer les dommages.

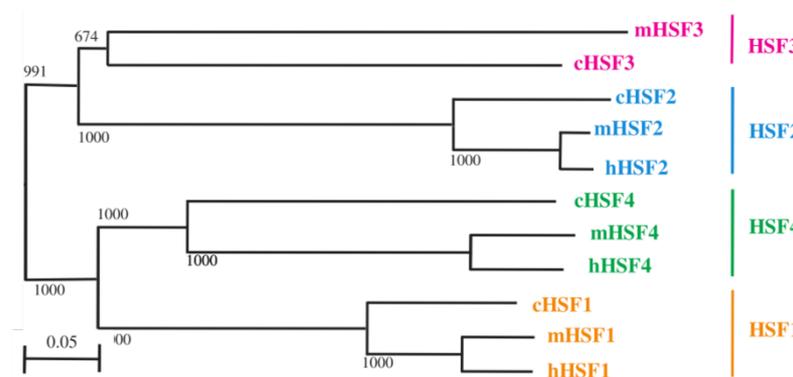


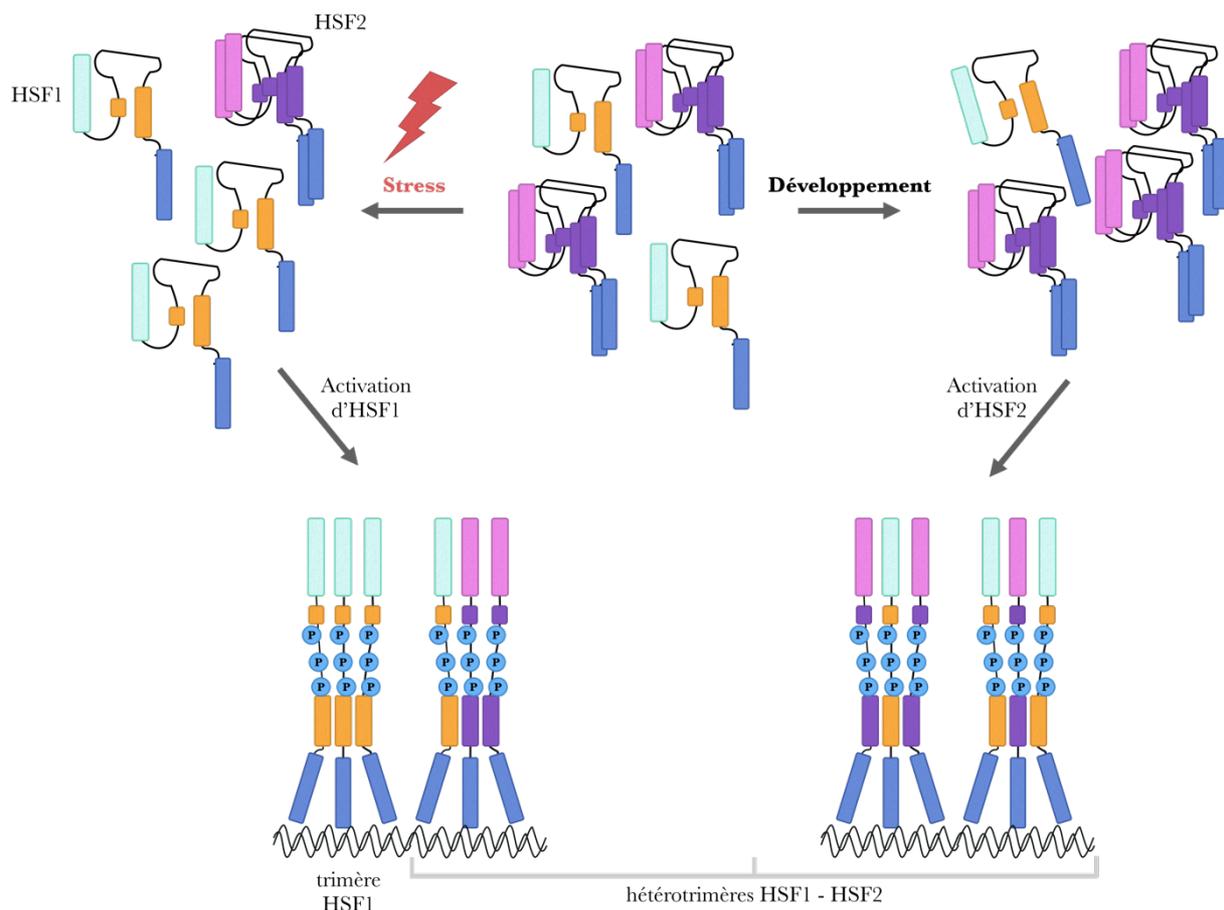
Fig 1.2. Arbre phylogénétique de la famille HSF. Trois espèces sont représentées : (c) pour les aviaires, (m) pour la souris et (h) pour l'Homme (Barre = 0,5 substitutions/site). D'après (Fujimoto et al., 2010).

De part leur fonction primordiale dans la survie cellulaire, ces facteurs sont conservés de la levure à l'Homme [Fig.1.2]. Chez *S.Cerevisiae*, un seul facteur HSF est présent. Il est indispensable à la survie des cellules en conditions stressées mais également en conditions normales par la régulation, entre autres, de la protéine HSP90. Chez les vertébrés quatre membres de cette famille existent : HSF1 à 4, tous avec un rôle fondamental dans la protection des cellules stressées. C'est tout de même le facteur ubiquitaire HSF1 qui est nécessaire à l'induction des HSP lors de

la HSR. Il est également impliqué dans un grand nombre de processus pathologiques, allant du développement tumoral au vieillissement. Central à la HSR c'est sur lui que nous nous sommes concentrés au cours de ma thèse, il sera plus amplement décrit au cours de la partie 2. Les trois autres HSF (2 à 4) ont des fonctions plus spécifiques :

- HSF2 :

Contrairement à HSF1, le facteur de transcription HSF2 a une expression tissu-spécifique. Il est activé par une augmentation de sa concentration intracellulaire ce qui lui confère des propriétés plus physiologiques que les autres HSF. Pour se lier à l'ADN, cette forme active s'associe en trimères composés soit exclusivement d'HSF2 (homotrimères), soit d'HSF2 et d'HSF1 (hétérotrimères). La cellule peut ainsi adapter sa réponse en fonction des besoins puisque ce ne sont pas les mêmes cibles génomiques qui sont reconnues par des trimères de composition différente [Fig1.3]. Ces variations existent notamment dans le cas de la HSR où la nature des trimères formés dépend des conditions et de l'intensité du stress, ce qui rend la réponse cellulaire adaptée à des stimuli distincts (Sandqvist et al., 1994). Par exemple lors d'un stress thermique de faible intensité ceux sont des hétérotrimères HSF1/HSF2 qui sont formés dans lesquels HSF2 abaisse le seuil d'activation d'HSF1 et donc facilite l'induction de la HSR (Shinkawa et al., 2011). Si le stress thermique est plus intense, HSF2 est inactivé par la chaleur et seul HSF1 intervient. Des trimères contenant uniquement HSF1 sont alors présents et induisent la HSR avec une intensité plus élevée qu'en présence d'HSF2 (Mathew et al., 2001). Lors d'autres types de stress, HSF2 aide également à l'activation d'HSF1 et des gènes *hsp70* (He et al., 2003 ; Jaeger et al., 2016). Les variations de composition au sein des trimères d'HSF formés jouent aussi un rôle en conditions physiologiques. Les homotrimères HSF2 sont présents dans un grand nombre de processus développementaux [Fig.1.3]. Par exemple lors du développement embryonnaire, HSF2 est plus concentré et s'associe en homotrimères actifs avec un rôle essentiel dans l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la migration des cellules neuronales. Lorsque le fœtus est exposé à un stress comme à de l'alcool ce processus est dérégulé. HSF1 est alors activé et forme des hétérotrimères avec HSF2. En conséquence HSF2 change de gènes cibles ce qui produit des défauts de migration des cellules neuronales et le syndrome d'alcoolémie fœtale (El Fatimy et al., 2014; Hashimoto-Torii et al., 2011). HSF2 joue également un rôle important dans d'autres pathologies dont le cancer où sa présence supprime le caractère invasif de tumeurs de la prostate (Björk et al., 2015).



**Fig 1.3. La composition des trimères d'HSF varie en fonction des conditions physiologiques et pathologiques.** Les différences de concentrations en HSF2 entraînent la formation de trimères HSF1-HSF2 qui varient en fonction du stimuli, conduisant ainsi à une réponse cellulaire adaptée. Par exemple, la concentration en HSF2 est plus élevée lors de processus développementaux, mais diminue en réponse à un stress thermique (D'après Åkerfelt et al., 2010).

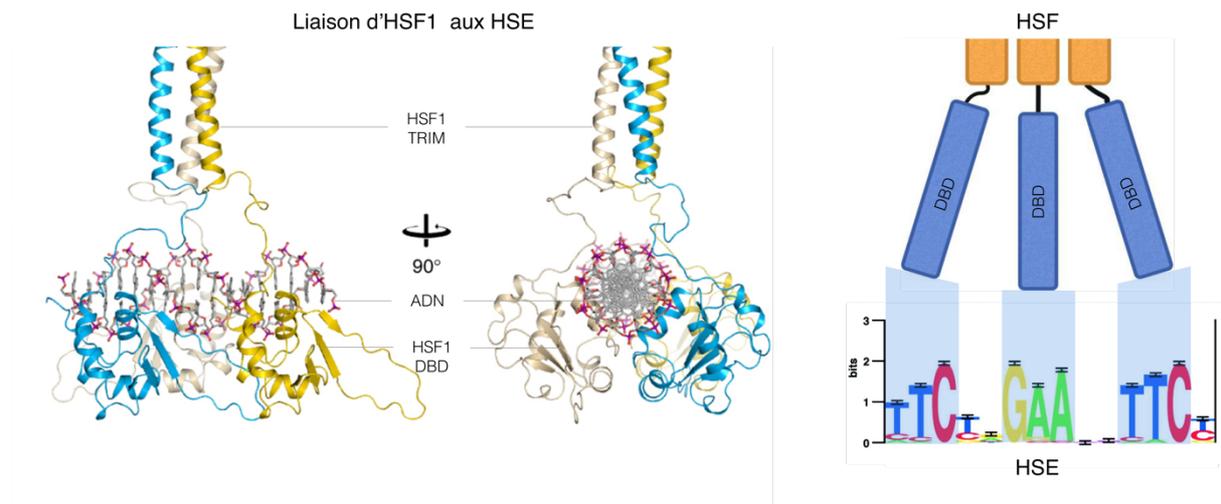
- HSF4 :

HSF4 a une expression très spécifique. Chez l'Homme il est plus présent dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique et le pancréas où il forme des trimères constitutifs. Contrairement à tous les autres HSF il peut aussi jouer le rôle de répresseur transcriptionnel (A Nakai et al., 1997). Exprimé dans le cristallin, il entre en compétition avec HSF1 pour certains facteurs de croissance, permettant ainsi le développement et la différenciation adéquate de ces cellules (Fujimoto et al., 2004). Il permet aussi la différenciation des cellules épithéliales humaines du cristallin par leur arrêt en G1/S via la stabilisation de p53 (Huang et al., 2015). Des mutations au sein du facteur HSF4 entraînent à la fois des cataractes congénitales et des cataractes liées au vieillissement (Behnam et al., 2015 ; Shi et al., 2008).

- HSF3 :

Le facteur HSF3 a été identifié chez les aviaires et les souris. Chez les aviaires ce n'est pas HSF1 mais HSF3 qui est indispensable à l'expression des HSP en réponse à un stress (Akira Nakai & Ishikawa, 2001). Le gène orthologue à HSF3 découvert chez la souris se rapproche beaucoup du HSF1 aviaire, avec la même fonction : ils jouent tous deux un rôle redondant en ce qui concerne l'induction des gènes *hsp* (Fujimoto et al., 2010).

### Les éléments de réponse au stress thermique (HSE)



**Fig 1.4. Liaison des HSF aux éléments de réponse au stress (HSE).** (Gauche) Structure cristallographique du domaine de trimérisation (TRIM) et de liaison à l'ADN (DBD) du trimère du facteur HSF1 humain associé à l'ADN. (Droite) Représentation schématisque de la liaison des HSF par leur DBD aux HSE. D'après (Neudegger et al., 2016; Vihervaara et al., 2014).

Le plus grand point commun des membres de la famille HSF est leur domaine de liaison à l'ADN (DBD pour *DNA Binding Domain*) dont l'importance est attestée par sa conservation inter-espèce. Les HSF reconnaissent ainsi la même structure génomique de base : les *éléments de réponse au stress thermique* ou HSE pour *Heat-Shock Element* [Fig.1.4]. Ce motif correspond à la répétition inversée des bases azotées nGAAn dont l'efficacité varie avec le nombre de répétitions, 3 à 5 répétitions étant la combinaison la plus efficace. Le nombre mais aussi l'espacement des répétitions conditionnent l'affinité de chaque HSF. Les motifs pour lesquels les facteurs HSF1 et HSF2 ont une préférence sont respectivement ceux avec des longues ou des courtes répétitions d'HSE parfaites. Leur structure a été résolue par cristallographie cette année (Jaeger et al., 2016; Neudegger et al., 2016). Le facteur HSF4 a, quant à lui, une plus grande affinité pour les répétitions espacées (Yamamoto et al., 2009).

La grande variété de promoteurs composés d'une HSE permet aux HSF de réguler une large gamme de gènes en réponse à un stress. Ces éléments sont en effet retrouvés au niveau des promoteurs des gènes *hsp*, mais aussi au niveau de beaucoup de gènes impliqués dans des

processus biologiques essentiels tels que le métabolisme glucidique, la membrane cellulaire ou le cytosquelette.

La variété des séquences ciblées par les HSF est encore augmentée par la présence de ces éléments au sein de séquences Alu. Dispersées dans le génome ces séquences sont des fragments d'ADN courts, de moins de 300bp, appartenant à la catégorie des rétrotransposons SINE pour *Short Interspersed Element*. En induisant leur transcription en réponse à un stress, le facteur HSF1 conduit non seulement à la transcription de gènes ne présentant pas de HSE dans leurs promoteurs, mais aussi à la répression d'un grand nombre de gènes par leur transcription anti-sens (Pandey et al., 2011).

## 2. L'acteur majeur de la HSR : HSF1

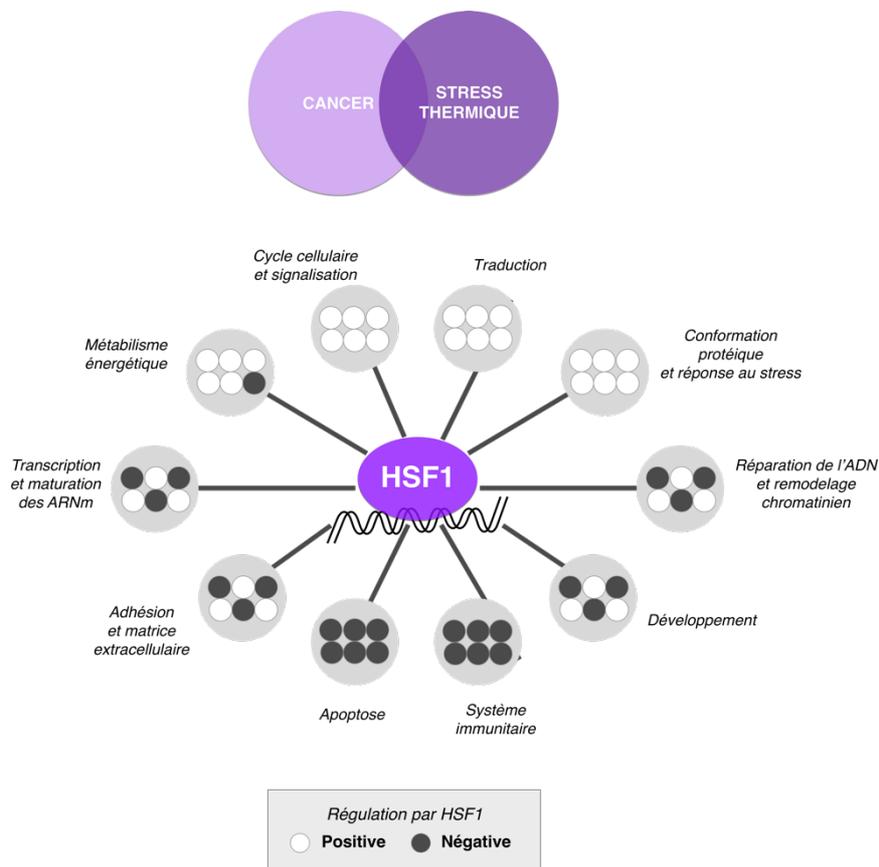


Fig 1.5. La régulation par HSF1 de nombreux processus biologiques diffère selon le contexte (cancer ou stress) dans lequel ce facteur de transcription est activé. (D'après Mendillo et al. 2012).

HSF1 est l'acteur clef de la réponse cellulaire au stress chez l'Homme. Il correspond à l'HSF ancestral présent chez la levure et la drosophile. En plus de son rôle essentiel dans cette réponse, ce facteur de transcription est impliqué dans un très grand nombre de processus biologiques du

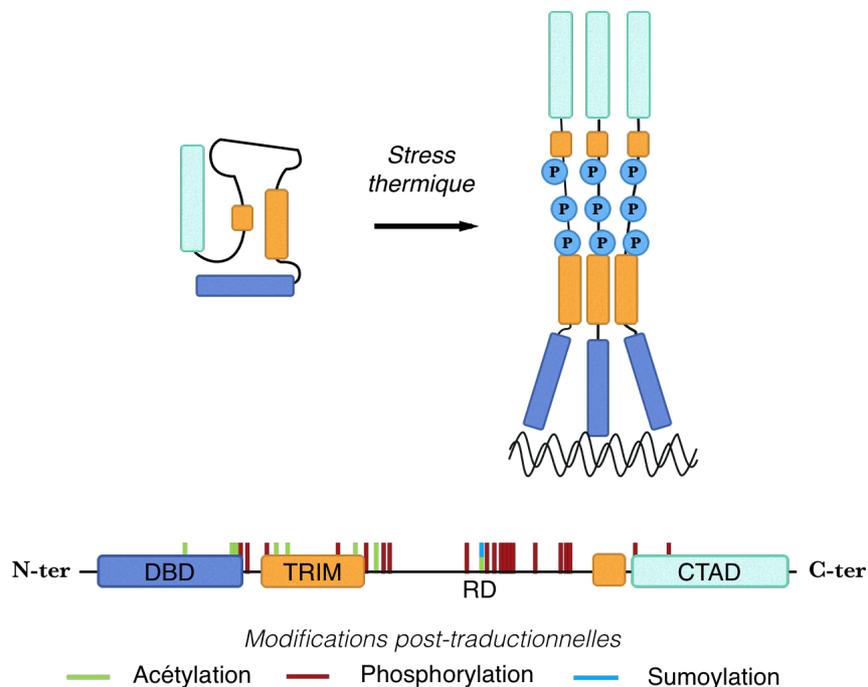
développement au vieillissement, en passant par la différenciation (Mendillo et al., 2012). Son équilibre est essentiel : en excès il permet la protection des cellules face au stress mais aussi promeut la carcinogénèse [Fig.1.5]. A l'inverse lorsque sa concentration est trop faible, les cellules ne sont plus protégées et développent des pathologies liées à l'accumulation d'agrégats protéiques. En plus de son impact à l'échelle cellulaire, HSF1 régule le stress à l'échelle de l'organisme : l'étude de souris déficientes en HSF1 suggère qu'il régule le contrôle hypothalamique de la température corporelle et de la production de prolactine, l'hormone du stress (Ingenwerth et al., 2015).

## **2.1. Ses caractéristiques**

La fonction première du facteur HSF1 est la réponse cellulaire au stress. De tous les membres de la famille HSF c'est celui qui est responsable, chez les mammifères, de l'induction de toutes les protéines HSP en réponse au stress et donc de l'intégrité protéique et cellulaire. Mais en plus de ses cibles qui permettent la réponse au stress, HSF1 est capable d'activer spécifiquement un grand nombre de gènes associés au métabolisme, à l'adhésion, la traduction, ... dans les cellules tumorales. L'accumulation d'HSF1 favorise ainsi l'apparition de cellules malignes, de même qu'un mauvais pronostic pour les patients (Mendillo et al., 2012).

Un grand nombre de mécanismes expliquent l'implication d'HSF1 dans la carcinogénèse. Son activité de facteur *promoteur de tumeur* a été mise en avant dans le développement tumoral d'un modèle murin KO pour le *suppresseur de tumeur* p53 (Dai et al., 2007). Dans cette étude la formation des tumeurs induites est inhibée par le KO d'HSF1, révélant le rôle d'HSF1 comme protecteur de la carcinogénèse. De même en l'absence d'HSF1 le développement de lymphomes est drastiquement réduit : 70% pour les souris KO p53 contre moins de 8% en ce qui concerne les souris double KO P53/HSF1 (Min et al., 2007). HSF1 est aussi impliqué dans d'autres types de tumeurs comme les fibrosarcomes dérivés du virus simien 40 (SV40) où le *knock out* (KO) de HSF1 inhibe la croissance tumorale et la formation de métastases en bloquant l'association entre SV40, le suppresseur de tumeur p53 et la protéine *Rétinoblastome* phosphorylée (Jiang et al., 2015). D'autre part, HSF1 promeut le développement tumoral en interagissant avec les protéines Ku70 et Ku86 qui participent à des mécanismes de réparation de l'ADN dépendants de *Non Homologous End Joining* (NHEJ). Cette interaction conduit à une instabilité génomique (Kang et al., 2015). De même, une forte concentration en HSF1 est aussi corrélée à un mauvais pronostic dans le cas de cancers du sein (Santagata et al., 2011). Ce qui pourrait s'expliquer par la capacité d'HSF1 à

induire un phénotype de cellules souches cancéreuses chez les MCF-7 par des voies indépendantes des HSP ou de la TEM (Wang et al., 2015). Sa présence est aussi un mauvais pronostic pour les patients atteints d'un cancer du poumon *non à petites cellules* où il est corrélé à une angiogenèse tumorale (Cui et al., 2015). Pour finir, HSF1 est un substrat de MAPK/ERK kinase, dans les cellules normales comme tumorales, ce qui fait de la voie de signalisation RAS-MEK une voie permettant directement de réguler l'homéostasie cellulaire. Or les cellules tumorales sont extrêmement sensibles aux agrégats, notamment aux plaques amyloïdes qui sont décrites comme suppresseurs de tumeur. Donc l'activation de HSF1 par cette voie dans les cellules tumorales induit leur protection, et ce, plus particulièrement pour les cellules malignes (Amyloidogenesis et al., 2015; Dai et al., 2015).



**Fig 1.6. Le facteur HSF1.** (Haut) HSF1 forme des trimères hyperphosphorylés en réponse à un stress thermique. (Bas) Domaines protéiques du facteur HSF1 et leurs sites de modifications post-traductionnelles: domaine de liaison à l'ADN (DBD), domaine de trimérisation (TRIM), de régulation (RD) et de transactivation (CTAD). (D'après Herbomel et al., 2013).

La présence d'HSF1 en excès conduit à une carcinogénèse, mais protège en parallèle contre le développement de maladies neurodégénératives comme *Huntington*. Il agit à la fois via l'expression des HSP et celle de miRNAs qui ciblent *huntingtin* et éliminent les agrégats toxiques (Das & Bhattacharyya, 2015). Il a également été montré chez *C.Elegans* que l'induction d'HSP70 par HSF1 permet d'éviter l'accumulation de plaques amyloïdes dans les neurones lors de leur activation serotoninergique (Tatum et al., 2015).

En plus de son impact direct dans la formation de cancers et les maladies dégénératives, HSF1 est indispensable au développement embryonnaire, à la gamétogénèse où il régule l'expression post-méiotique des chromosomes sexuels et permet ainsi leur compaction dans les spermatozoïdes, au développement cérébral, à la mise en place des organes sensoriels et de la réponse inflammatoire. C'est donc un facteur clef qui nécessite une régulation spatiale et temporelle extrêmement fine.

## **2.2. La régulation d'HSF1**

La protéine HSF1 est composée de quatre domaines majeurs. Ils ont tous un rôle important dans son activité et sa régulation en réponse au stress. Le premier domaine côté N-terminal est celui de la liaison à l'ADN (DBD) de type *Hélice Tour Hélice* « ailé » (wHTH) (Neudegger, 2016). Il est suivi d'un domaine de *trimérisation* (TRIM), puis d'une *région régulatrice* (RD), et pour finir d'un domaine de *transactivation* (TAD) en C-terminal [Fig 1.6].

Exprimé de façon constitutive, le facteur HSF1 est constamment présent sous une forme inactive dans les cellules non stressées. En conséquences, lors d'un stress, sa mobilisation est rapide et facilement réversible. La forme inactive d'HSF1 est un monomère majoritairement cytoplasmique, replié sur lui-même par l'interaction de ses domaines RD et TAD. De plus, cet état inactif est maintenu par un complexe répresseur, lui-même régulé par l'homéostasie protéique puisqu'il est constitué d'acteurs du maintien de l'intégrité protéique. A savoir certaines protéines HSP, ainsi que des protéines impliquées dans le *contrôle qualité des protéines dépendant de l'ubiquitine* comme HDAC6, une histone déacétylase cytoplasmique, et VCP (Valosin Containing Protein), une AAA-ATPase associée à HDAC6. Tant que ces protéines ne sont pas sollicitées, ce complexe maintient HSF1 sous sa forme inactive.

Plusieurs mécanismes sont sous-jacents à l'activation transitoire du facteur HSF1 en réponse à un stress protéotoxique. Son activité de liaison à l'ADN comme son activité transcriptionnelle nécessitent (i) sa libération du complexe répresseur, (ii) sa trimérisation et (iii) son accumulation dans le noyau. Cette activation est régulée dans le temps par le retour progressif d'HSF1 sous sa forme monomérique durant la période de récupération qui suit un stress [Fig 1.7].

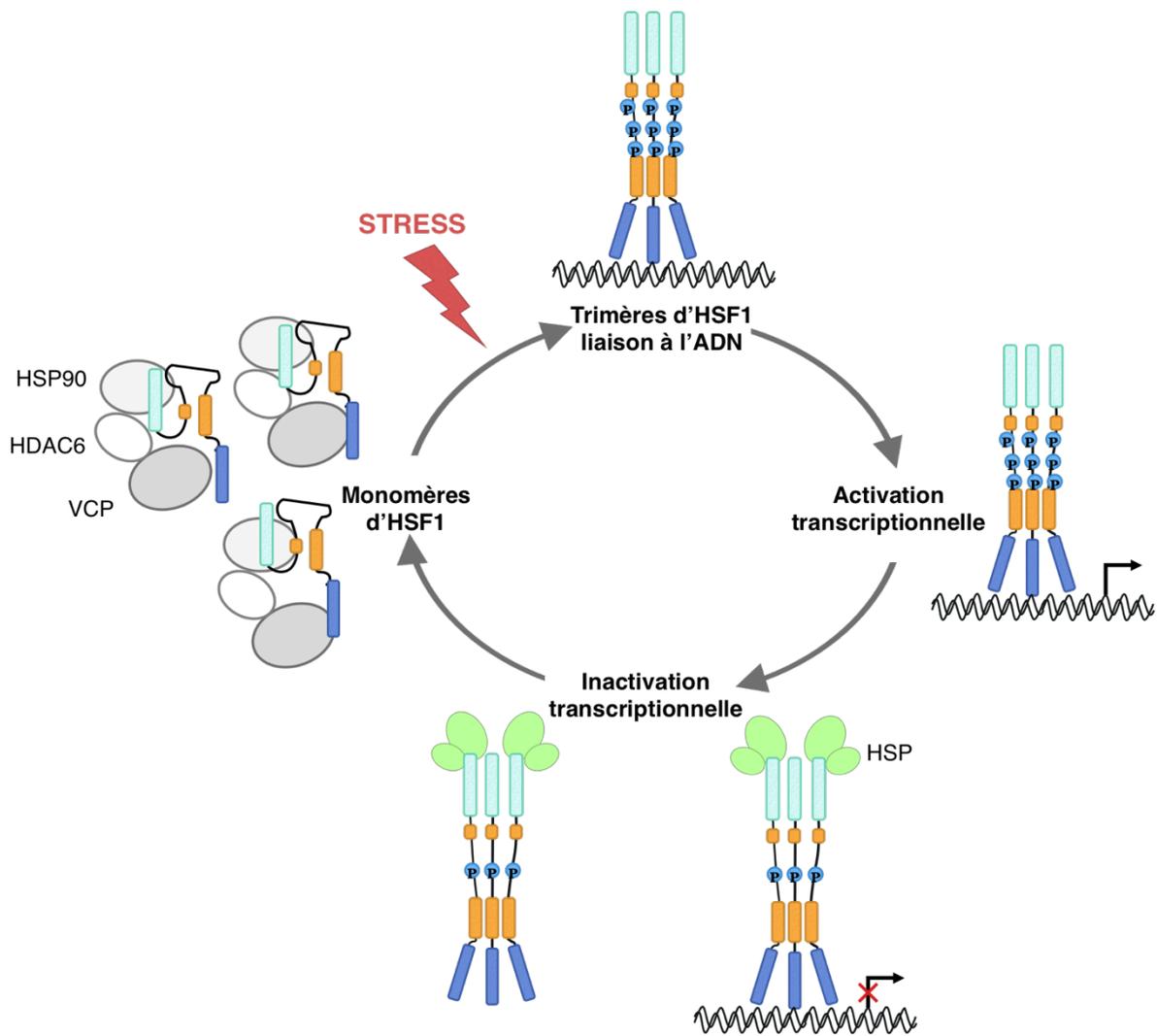


Fig 1.7. Cycle d'activation et d'atténuation d'HSF1 au cours de la réponse au stress. Ce cycle implique la libération d'HSF1 de son complexe répresseur (HSP90/HDAC6/VCP), sa trimérisation, de multiples modifications post-traductionnelles dont une hyperphosphorylation et sa liaison aux HSE. Les protéines HSP exercent un rétrocontrôle négatif sur son activation. (D'après Akerfelt et al., 2010).

### Régulation par ses interactions protéines-protéines

L'activation d'HSF1 en réponse à un stress protéotoxique résulte de l'action combinée de plusieurs mécanismes moléculaires. A commencer par la capacité intrinsèque d'HSF1 à sentir un stress via son domaine RD. Cette propriété a été mise en évidence par un facteur de transcription mutant, composé du domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et du domaine de *transactivation* de VP16, reliés par le domaine RD de HSF1 (DBDgal4-RDhsf1-TADvp16). Dans ce système, le domaine RD seul de HSF1 est suffisant pour induire l'activation de ce mutant en réponse à une élévation de température (Budzynski et al., 2015).

Le complexe répresseur d'HSF1 est un mécanisme senseur supplémentaire d'une anomalie dans l'homéostasie protéique. Effectivement, dès l'accumulation de protéines endommagées, le facteur HSF1 est très rapidement libéré des protéines de ce complexe, et ce en particulier à cause de leur recrutement par les protéines déstructurées ou polyubiquitynilées. Une fois libéré, HSF1 peut former des trimères et s'accumuler dans le noyau. De façon intéressante, les mécanismes diffèrent en fonction de la nature du stress. Dans le cas d'une réponse à l'inhibition du *protéasome*, l'histone déacetylase HDAC6 se lie aux protéines ubiquitynilées entraînant la libération de son partenaire, la protéine p97/VCP. Par son activité ségrégase, elle dissocie alors le complexe inactif HSF1/HSP90 (Boyault et al., 2007). Mais dans le cas d'un stress thermique, HDAC6 n'est pas impliquée dans l'activation d'HSF1. En revanche sa liaison aux protéines ubiquitynilées contrôle le retour d'HSF1 sous sa forme inactive au cours de la période de récupération qui suit un stress (Pernet et al., 2014). De même, en excédent, HSP70 interagit avec la forme active d'HSF1 et entraîne son retour à une forme cytoplasmique inactive.

Les mécanismes de la régulation fine d'HSF1 entraînent également des différences dans la HSR en fonction de processus biologiques. C'est notamment le cas du vieillissement où l'HDAC1, dont l'expression augmente avec l'âge des cellules, diminue la capacité d'HSF1 à se fixer à ses séquences cibles et ce de façon indépendante de son activité déacetylase. HDAC1 réprime ainsi la capacité des cellules à répondre au stress en fonction de leur âge (Zelin & Freeman, 2015).

### Régulation par des modifications post-traductionnelles

La régulation fine de l'activation d'HSF1 se fait aussi via un grand nombre de modifications post-traductionnelles dont une majorité consiste en l'ajout de groupements phosphates. Plus de 20 sérines (S), à l'intérieur de son domaine RD, sont phosphorylées en réponse à un stress [Fig 1.6]. Cette hyperphosphorylation est corrélée, dans le temps, à son activation. Néanmoins elle n'est pas nécessaire à l'activation transcriptionnelle d'HSF1 et semble même la diminuer puisqu'un mutant d'HSF1 ne pouvant être phosphorylé dans son RD a une meilleure capacité de *transactivation* que le facteur de transcription sauvage (Budzynski et al., 2015). Par contre, l'hyperphosphorylation d'HSF1 pourrait permettre une régulation stress-dépendante spatiale et temporelle beaucoup plus fine.

Les modifications post-traductionnelles d'HSF1 ont également un rôle important dans sa régulation au cours de la récupération. En effet, un grand nombre de modifications post-traductionnelles diminuent l'activité de ses domaines TAD et DBD. La phosphorylation de la sérine 121, par exemple, inhibe la *transactivation* et favorise la liaison d'HSF1 et HSP90, donc le

retour d'HSF1 sous une forme inactive. Cette inactivation est également favorisée par la phosphorylation de la sérine S303 qui, de façon coopérative, permet l'ajout d'un groupement SUMO par SUMO-1 sur la lysine (K) K298 (Hietakangas et al., 2003).

Enfin, le rôle de l'acétylation d'HSF1 dans sa régulation est tout autant important. Dans des cellules humaines non stressées, ce facteur de transcription est protégé d'une dégradation par le *protéasome* grâce à son acétylation par l'acétyltransférase EP300 sur trois de ses lysines : K118, K208, et K298. Cette stabilisation permet de réguler le *pool* d'HSF1 activable, tandis que la déacétylation de ces lysines lors de la récupération d'un stress, comme celle de K118 par la déacétylase SIRT1, inhibe la liaison du facteur HSF1 sur ses séquences cibles et conduit en même temps à l'atténuation de la HSR par sa déstabilisation (Raychaudhuri et al., 2014). D'autres acétylations au niveau du DBD de HSF1, comme l'acétylation de K80, ont directement un effet négatif sur la liaison d'HSF1 à l'ADN et permettent aussi l'atténuation de la HSR (Raynes et al., 2013).

En conclusion le facteur HSF1 est très finement régulé dans l'espace et dans le temps. Il intègre ainsi un très grand nombre de voies de signalisation pour les retranscrire en une réponse rapide et adaptée au stress en présence. Le facteur HSF1 doit également être finement régulé car c'est un facteur important dans la carcinogénèse et le développement de maladies dégénératives.

### **3. Les foyers nucléaires de stress**

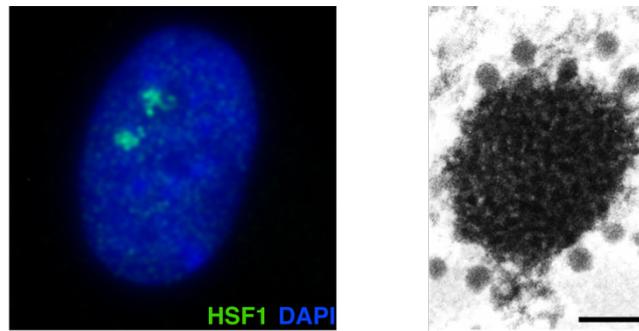
En plus de toutes les cibles génomiques décrites précédemment, HSF1 cible de très larges régions génomiques chez l'Homme et quelques primates, ce qui conduit à son accumulation en granules nommés *foyers nucléaires de stress* ou nSBs (*Nuclear Stress Bodies*). Ces foyers sont à la base de mes travaux de thèse et sont donc plus amplement décrits dans cette partie, à commencer par leur présence unique chez l'Homme, leur caractère fortement transcrit et pour finir leurs rôles potentiels.

#### ***3.1. Une caractéristique des cellules humaines***

##### *L'accumulation d'HSF1 sous forme de foyers nucléaires*

La grande particularité de la HSR chez l'Homme est la formation de foyers HSF1, au sein du noyau. Comme dans les autres espèces eucaryotes, HSF1 forme des trimères nucléaires dans les cellules humaines soumises à un stress. Cependant, en plus de ses cibles génomiques habituelles,

il s'accumule massivement sous forme de granules qu'on nomme *foyers nucléaires de stress*, nSBs (nuclear Stress Bodies) [Fig 1.8, gauche].



**Fig 1.8. Les foyers nucléaires de stress (nSBs).** (Gauche) Visualisation des foyers HSF1 par immunofluorescence dans des amniocytes humains soumis à un stress thermique. (Droite) Visualisation des sites ciblés par HSF1 après un stress thermique en microscopie électronique à transmission. (barre d'échelle : 0,1  $\mu\text{M}$ ). (D'après Chiodi et al., 2010).

Ces granules, distincts de tous les autres foyers identifiés au sein du noyau, se forment très rapidement lorsque des cellules en culture sont soumises à un stress thermique de 43°C, puis disparaissent à 37°C lorsque les cellules récupèrent. Associés à l'activation du facteur HSF1, ils sont induits par un grand nombre de stress et présents dans tous les types cellulaires humains (Valgardsdottir et al., 2007).

L'observation *in vivo* de leur formation en microscopie photonique a conforté l'idée qu'ils se formaient sur une cible génomique particulière. En effet lorsque les cellules sont soumises à des stress consécutifs on peut observer que le facteur HSF1 s'accumule toujours aux mêmes emplacements au sein du noyau, avec une rapidité accrue (Jolly et al., 1999). Observées en *microscopie électronique à transmission* (MET), ces structures sont caractérisées par une organisation sphérique très dense de 0,3 à 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre [Fig 1.8, droite]. Elles sont fréquemment localisées à la périphérie du noyau ou des nucléoles et entourées de plus petites structures rondes qui forment un halo (Chiodi et al., 2000).

#### Les nSBs : une cible chromatinienne

Le nombre de granules formés par HSF1 dans les cellules humaines en culture en réponse à un stress est corrélé à leur ploïdie, suggérant également qu'ils correspondent à l'accumulation du facteur HSF1 sur des cibles chromatinienne. Néanmoins, ces foyers ne sont pas localisés aux sites de transcription des cibles les plus connues d'HSF1 : *hsp70* et *hsp90* (Jolly et al., 1997). Ils correspondent à son accumulation sur de très larges régions d'ADN identifiées par des expériences de reconstitution de granules *in vitro*. Celles-ci qui consistent en l'incubation d'un

facteur HSF1 recombinant sur des étalements métaphasiques de cellules humaines. Elles ont montré qu'HSF1 a la capacité de se fixer sur les régions génomiques humaines composées de séquences Satellite II (SATII) et Satellite III (SATIII). Ces deux types de séquences sont présentes sur des *loci* juxtaposés aux centromères : les régions péri-centriques. En faible quantité (50 ng), HSF1 cible spécifiquement une de ces régions située aux *loci* 9q12, c'est aussi la région ciblée *in situ* par HSF1 dans des cellules normales, on parle de *foyers primaires* (Eymery et al., 2010; Jolly et al., 2002). En quantité plus importante (5µg) toutes les régions composées de SATII et SATIII sont ciblées par HSF1, ce qui correspond aux régions péri-centriques des chromosomes 1, 4, 5, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 21, 22 et Y [Fig 1.9]. C'est également le cas *in situ* dans les cellules tumorales, ou dans celles qui surexpriment HSF1, on parle alors de *foyers secondaires*. Le nombre de foyers, ainsi que leurs cinétiques dépendent à la fois du type cellulaire et de l'intensité du stress auquel les cellules sont soumises. On observe également ces foyers lorsque que l'on augmente les quantités d'HSF2, qui forme des hétérotrimères avec HSF1 et l'active, ce qui suggère que les variations quantitatives d'HSF2 pourraient jouer un rôle dans la formation de foyers dans différents contextes physiologiques (Lecomte et al., 2013).

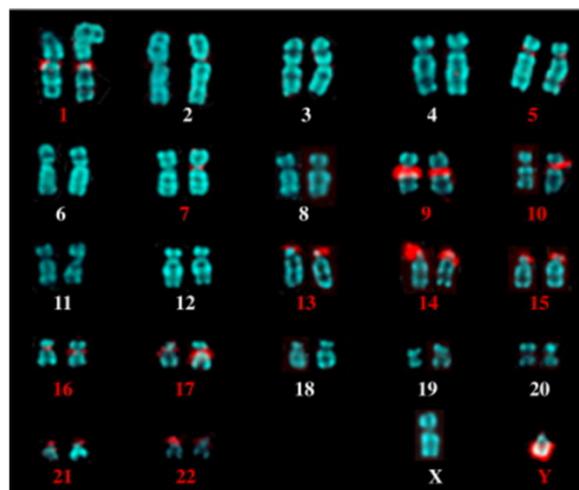


Fig 1.9. Régions chromosomiques capables d'être ciblées par HSF1. Reconstitution de granules HSF1 (rouge) *in vitro* sur un étalement de chromosomes métaphasiques de cellule humaine mâle marqués au DAPI. (D'après Eymery et al., 2010).

### Les séquences ciblées

La nature des séquences ciblées par HSF1 au niveau des régions péri-centriques est à l'origine de la formation exclusive des nSBs dans certaines espèces. Très polymorphiques, ces séquences ne sont présentes que chez quelques grands primates. Leur sélection argue pour une fonction

biologique importante (Jarmuz et al., 2007). Ce sont des séquences dites répétées en tandem, disposées sous forme de grands blocs d'ADN, soit jusqu'à plusieurs dizaines de mégabases (Mb). Les séquences SAT seront plus amplement décrites au cours de ce manuscrit. Il est important pour les nSBs de savoir que les régions juxtacentromériques SATIII capables d'interagir avec le facteur HSF1 sont formées de la répétition d'un motif de 5pb : GGAAT. Elles sont présentes sur plus de 13 chromosomes autosomes et forment un nombre de répétitions particulièrement abondant aux régions péricentriques des chromosomes 9 et Y (Tagarro et al., 1994). Pourtant, dans les cellules normales femelles, seuls les *loci* 9q12 sont la cible des nSBs.

Quelle est la base structurale de la liaison d'HSF1 aux régions SATIII ? On sait que ses domaines TRIM et DBD seuls sont nécessaires et suffisants au ciblage de ces régions répétées *in situ* (Jolly et al., 2002). A partir d'un clone génomique contenant 159 paires de bases (pb) de répétitions SATIII du chromosome 9, il a été également montré que ce motif est suffisant pour permettre à HSF1 de se fixer *in vitro* (Jolly et al., 2002). Des données plus récentes indiquent néanmoins la présence d'éléments HSE au sein d'une séquence de 60 Kb de la régions 9q12 (observations non publiées).

### **3.2. Une transcription active**

#### *HSF1 transcrit les SATIII en réponse à un stress*

A l'inverse des cibles génomiques d'HSF1 dans les autres espèces, les régions répétées de type SATIII sont de grandes régions dépourvues de gènes et de structures promotrices particulières (observations non publiées). Néanmoins, en investiguant la capacité transactivatrice de ce facteur de transcription fort, notre équipe a en premier lieu remarqué que la fixation d'HSF1 sur ces régions conduit au recrutement qu'un grand nombre d'acteurs de la machinerie transcriptionnelle. Parmi eux l'ARN Polymérase II (ARN PolII) et l'Histone Acetyl-Transférase (HAT) CBP/p300 (Jolly et al., 2004; Rizzi et al., 2004). Ce recrutement est associé à une hyperacétylation des histones, une marque caractéristique d'une activité transcriptionnelle décrite plus loin, mais aussi à l'activation transcriptionnelle de ces régions (Jolly et al., 2004; Rizzi et al., 2004). Plus récemment, nous avons également montré que la fixation d'HSF1 induit le recrutement d'autres HAT comme Gcn5 et TIP60. L'acétylation de ces régions entraîne un recrutement sélectif de protéines à *bromodomains*, dont nous avons montré qu'elles jouaient un rôle important dans le recrutement de l'ARN PolII [Annexe 2].

### Les transcrits SATIII

HSFI activé entraîne donc la transcription massive de régions répétées en tandem dites *non-codantes*, à l'époque considérées comme de l'*ADN Poubelle* jamais actif. Cette observation a été faite par *hybridation fluorescente in situ* ARN (FISH ARN), DOT BLOT et Northern Blot. Il s'en suit l'accumulation de longs ARN non-codants sens (lncRNA). Ce qui est connu de ces lncARN SATIII-S est que :

- ils sont composés en grande partie du motif de base des séquences SATIII, répété en tandem (Eymery et al., 2010; Jolly et al., 2004),
- ils ne possèdent pas une séquence unique d'après ce qu'indique leur clonage et leur séquençage (Valgardsdottir et al., 2005)
- ils ont une taille hétérogène estimée soit entre 2kb et 5kb (Rizzi et al., 2004), soit à plus de 10kb (Jolly et al., 2004).
- ils sont en partie capés et polyadénylés (Valgardsdottir et al., 2005),
- ils s'accumulent au moment de leur transcription sous forme de foyers nucléaires parfaitement colocalisés aux foyers HSFI,
- ils sont très stables, restant localisés au niveau de leur *locus* de transcription longtemps après la dissociation d'HSFI des SATIII, et ce même si la transcription est artificiellement bloquée après un stress,

Ces ARN sont des acteurs actifs dans la formation des nSBs. Ils sont à l'origine du recrutement massif de facteurs régulateurs d'épissage dont SRSF1 et hrp30c qui ont tous deux la capacité de fixer ces ARN *in vitro*. Le recrutement de SRSF1 *in situ* nécessite la présence d'un domaine RRM2 (RNA Recognition Motif), suggérant leur recrutement direct par les ARN SATIII-S qui possèdent en outre une séquence pour laquelle ce domaine a une haute affinité (Chiodi et al., 2004; Metz et al., 2004). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de l'ARN PolIII montre que l'accumulation des facteurs d'épissage dépend de la présence d'ARN (Valgardsdottir et al., 2005). L'accumulation de HAP (hnRNP A1), un autre facteur régulateur d'épissage, a également été montrée par immunomarquage en microscopie électronique. 1 heure après un stress thermique d'1 heure à 42°C, plus de la moitié des facteurs HAP marqués sont recrutés aux nSBs (Chiodi et al., 2000; Weighardt et al., 1999). Tout comme pour SRSF1 ce recrutement est induit *in situ* par un domaine RRM2 (Chiodi et al., 2004; Metz et al., 2004).

Il est difficile à l'heure actuelle de déterminer si les ARN SATIII-S peuvent être soumis à un épissage en raison de leur nature répétée. Jusqu'à maintenant aucune preuve solide de leur épissage n'a encore été avancée et l'absence des protéines du *spliceosome* au sein des nSBs n'argue pas en ce sens. Néanmoins le séquençage d'une partie de ces ARN a permis de distinguer deux groupes d'ARN rassemblés par homologie, sur la bases de l'identification de blocs de séquences présentant 100% d'homologie. Ces données peuvent suggérer à la fois l'existence d'un épissage alternatif et celle de grands blocs de séquences dupliquées au sein de ces ARNs (Valgardsdottir et al., 2005).

### La transcription des SATIII

Ces ARN sont-ils spécifiques du stress thermique ? Une large gamme de stress a été étudiée en ce qui concerne la formation des nSBs, et ceux-ci semblent transcriptionnellement actifs tant que la machinerie transcriptionnelle est fonctionnelle. Par contre le nombre de nSBs formés dépend à la fois de la ploïdie des cellules stressées, du type de stress et de son intensité. C'est également le cas du pourcentage de cellules en culture qui répondent au stress (Sengupta, Parihar, & Ganesh, 2009). De façon intéressante, le pourcentage de cellules activées est inversement corrélé au nombre de foyers présents dans chaque cellule. Par exemple dans les cellules HeLa, l'*Ibuprofène* entraîne la formation de nSBs dans la quasi totalité des cellules mais le nombre de foyers est restreint. En revanche la *puromycine*, molécule antibiotique, entraîne la formation de 20 foyers par cellule, mais ce dans moins de 50% des cellules. Ces différences pourraient en partie dépendre de l'intensité du stress, puisque dans les cellules HeLa le nombre de foyers HSF1 augmente avec l'intensité d'un stress thermique (Eymery et al., 2010). La transcription des SATIII répond ainsi de façon dose-dépendante au stress subit par les cellules. De même, la cinétique d'apparition des foyers varie selon la nature du stress utilisé : apparition précoce en réponse à un stress thermique et tardive en réponse à un stress oxydatif (Valgardsdottir et al., 2007). Jusqu'à présent, seul un autre facteur de transcription qu'HSF1, le facteur TonEBP (Tonicity Element Binding Protein), a été identifié dans le cas d'un choc osmotique comme capable de former des foyers et d'induire l'accumulation d'ARN SATIII (Valgardsdottir et al., 2007).

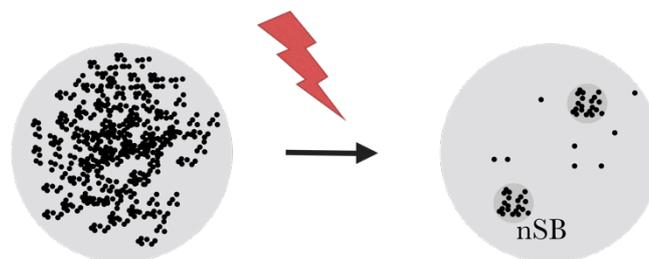
En plus de leur expression dans des cellules en culture soumises à un stress, ces ARN SATIII sont fortement accumulés dans la plupart des tissus tumoraux. Leur accumulation a été détectée pour la première fois par l'analyse du transcriptome de tumeurs du poumon à partir de puces à ADN spécifiques des régions centromériques et péricentriques (Eymery et al., 2009). Cette étude a également permis de montrer que ces transcrits ne sont pas accumulés dans les tissus sains,

excepté pour les testicules où une surprenante accumulation d'ARN SATIII anti-sens est observée (ARN SATIII-AS, riches en motifs ATTCC et non GGAAT comme dans le cas des ARN sens). Une étude à plus large échelle a montré que ces ARN, ainsi que des ARN de type SATII, sont largement accumulés dans d'autres types de tumeurs (adénocarcinomes du pancréas, du rein, du colon, des ovaires et de la prostate) où leur présence semble associée à un mauvais pronostic (Ting et al., 2011). Ces résultats font de ces ARN un biomarqueur potentiel des cellules tumorales. Souvent activée dans les cellules tumorales, la voie de signalisation HSF1 pourrait être impliquée dans l'induction de ces ARN dans les cellules cancéreuses (Tilman et al., 2012). Cependant la formation de foyers HSF1 *in vivo* chez l'Homme n'a encore jamais été prouvée.

### 3.3. Le rôle des foyers nucléaires de stress

Parce que les nSBs sont présents uniquement chez les humanoïdes, il est difficile de comprendre l'avantage que ces ARN répétés confèrent lors d'un stress. Mais leur sélection, leur amplification, leur induction massive dans des conditions spécifiques ainsi que leur régulation spatio-temporelle fine sont autant d'indices qui suggèrent un rôle essentiel des nSBs en réponse au stress. Au vu de la littérature, ces transcrits pourraient (i) avoir un rôle de *tampon*, séquestrant les facteurs importants pour l'activité transcriptionnelle et la régulation de l'épissage, (ii) réguler la réponse immunitaire face aux cellules tumorales, *mimant* des transcrits du « non-soi », (iii) réguler la structure associée aux régions péri-centriques modifiant ainsi leur fonction.

#### Un rôle tampon



**Fig 1.10. Séquestration massive de facteurs aux nSBs lors de la HSR.** La transcription des SATIII en réponse au stress pourrait impacter rapidement et de façon transitoire la concentration intracellulaire de facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle et celle de l'épissage alternatif, tous deux représentés par des points. (D'après Biamenti et al. 2010).

Un rôle potentiel des nSBs suggéré depuis longtemps est celui de *tampon*, c'est-à-dire que les nSBs pourraient réguler la concentration intracellulaire d'un grand nombre de facteurs au moment du stress en les séquestrant [Fig 1.10]. En effet, la première observation lors d'un stress thermique est que l'accumulation du facteur HSF1 aux régions SATIII entraîne un recrutement massif des facteurs impliqués dans la régulation et l'activation de la transcription mais aussi de l'épissage. Par

exemple on observe une déacétylation globale du noyau, médiée par HSF1 en réponse au stress. D'une part cette déacétylation est expliquée par une activité des HDAC (Histones Déacétylases) en complexes répresseurs avec le facteur HSF1 (Fritah et al., 2010). Mais d'autre part cet effet pourrait être accentué par la déplétion des HAT de l'ensemble du noyau puisqu'elles s'accumulent massivement au niveau des régions SATIII, en complexe activateur avec HSF1. Les facteurs régulateurs de l'épissage alternatif sont également massivement recrutés aux nSBs. Par exemple plus de la moitié des protéines HAP marquées sont accumulées au niveau de ces foyers au moment du stress (Chiodi et al., 2000). Ce qui pourrait expliquer a variation global de l'épissage alternatif observé il y a longtemps dans les cellules soumises à un stress thermique.

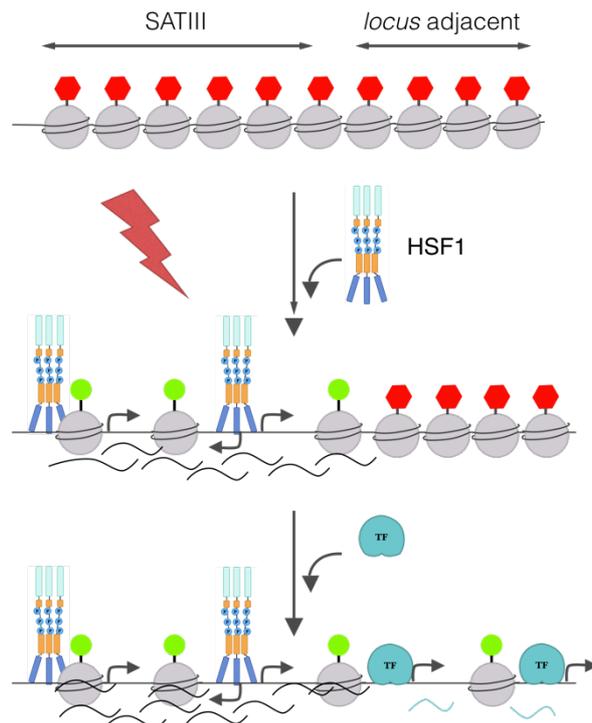
### Un rôle dans la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses

Comme décrit plus tôt, les ARN SATII et SATIII sont fortement accumulés dans les cellules tumorales (Ting et al., 2011). Tout dernièrement, une étude a montré que ces transcrits participent à l'augmentation progressive du nombre de répétitions de type SAT au sein du génome. En effet ils sont pris en charge par une reverse transcriptase (RT) qui conduit à la formation de duplexes ARN/ADNc. Les ADNc sont ensuite incorporés au sein de l'ADN génomique, plus particulièrement au niveau des régions SAT répétées déjà existantes. C'est la RT hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) qui semble être responsable de ce mécanisme puisqu'elle immunoprécipite avec les transcrits SATII. Cette expansion n'est pas reproduite dans le cas des séquences  $\alpha$ -SAT pourtant elles aussi parfois déréprimées dans les cancers, suggérant un mécanisme spécifique en fonction des séquences (Bersani et al., 2015). C'est ainsi que des cellules colorectales cancéreuses présentent une nette accumulation de ces séquences répétées, dont le nombre a également été corrélé à un mauvais pronostic. L'inhibition de ce mécanisme de propagation des SATII entraîne effectivement un ralentissement de la croissance tumorale des cellules en culture 3D et des xenogreffes chez la souris.

La transcription de ces séquences chez l'Homme semble également réguler la réponse du système immunitaire face aux cellules cancéreuses (Tanne et al., 2015). Généralement signe de la présence de pathogènes, la présence de transcrits riches en AU, comme les transcrits SATII et SATIII, stimule la réponse immunitaire liée au *non-soi* ainsi que la réponse innée en induisant directement l'activation du système phagocytaire et la production de cytokines pro-inflammatoires. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle, au cours de l'évolution, ce type de répétitions n'a pas été sélectionné que ce soit par la majorité du génome humain actif ou par les virus bien adaptés à l'espèce humaine. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'injection de transcrits répétés

SATII provoque à elle seule l'activation du système immunitaire. Ces séquences auraient donc pu être sélectionnées pour permettre à l'organisme de repérer les cellules avec une dérégulation épigénétique globale, *mimant* la présence d'un pathogène. Cependant ce système peut également avoir un effet négatif sur le pronostic des cancers dans la mesure où la présence de SATII entraîne le recrutement et la rétention de monocytes et de macrophages associés aux tumeurs, processus connu pour favoriser la formation de tumeurs agressives, métastasées, et pouvant échapper au système immunitaire.

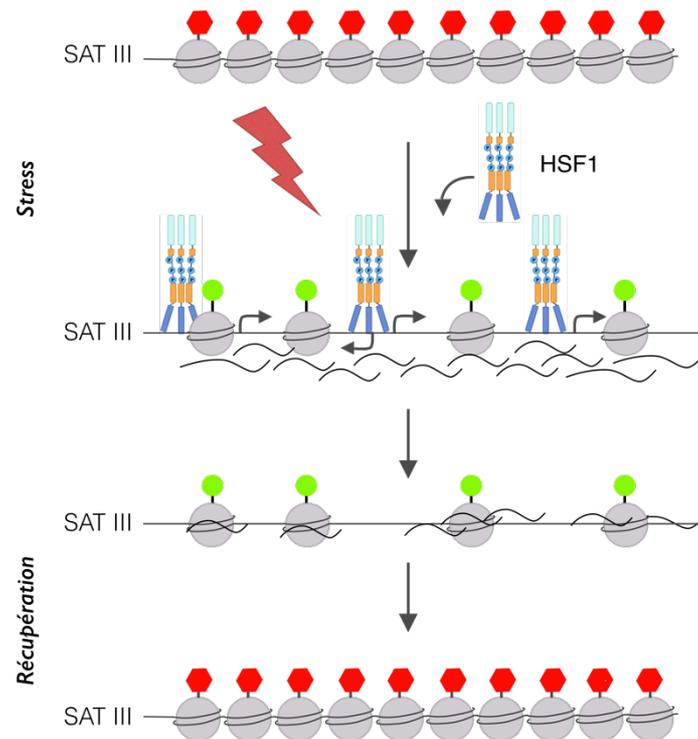
### Un rôle dans la régulation de la chromatine



**Fig 1.11. La transcription des SATIII impacte les régions géniques localisées à proximité.** Les régions SATIII pourraient constituer des pôles répressifs au sein du noyau. Leur activation par HSF1 en réponse au stress entraîne leur transition d'un état chromatinien inactif vers un état actif (respectivement symbolisés par les hexagones rouges et les ronds verts). Cet état chromatinien actif pourrait ensuite être propagé aux loci adjacents en *cis* mais également en *trans*. (D'après Biamonti et al., 2010).

La dernière hypothèse proposée ici est celle d'un impact de ces ARN dans la régulation de la structure de la *chromatine* (Biamonti et al., 2010; Eymery et al., 2009) [Fig 1.11]. C'est une fonction récurrente des lncARN en général. En ce qui concerne les transcrits SATIII, ils proviennent d'une région qui a normalement une structure très compactée et réprimée, localisée très près des centromères. En conditions normales, ces grandes régions pourraient donc être des pôles répressifs agissant en *cis* et en *trans* sur les territoires voisins. Cet effet a été décrit la première fois chez *Drosophila melanogaster* sous le nom de *position effect variegation* ou PEV (Wallrath et al., 1995). Cet effet consiste en une propagation de la répression transcriptionnelle à un gène situé à

proximité de larges régions d'ADN réprimées. L'activation transcriptionnelle des larges régions SATIII en réponse à un stress pourrait donc avoir un effet drastique sur la régulation les régions d'ADN voisines. Cependant aucun effet n'a été détecté sur les gènes proches de ces régions positionnés en *cis*. L'identification, par exemple par Chromatine Hi-C, des régions d'ADN proches des SATIII *en trans* ainsi que l'étude de leur régulation transcriptionnelle en réponse au stress pourrait apporter un éclairage.



**Fig 1.12. Régulation de la structure des régions péricentriques.** Alors que les régions péricentriques SATIII sont dans un état chromatinien actif (rond vert) en réponse au stress, les transcrits péricentriques SATIII accumulés pourraient permettre leur retour à un état chromatinien inactif (hexagone rouge) lors de la récupération au stress. (D'après Biamonti et al., 2010).

Chez *S.Pombe* comme chez *Mus Musculus*, la transcription des régions péricentriques en lncRNA est également impliquée dans la mise en place d'une structure répressive au niveau des régions péricentriques (Hall et al., 2002; Probst et al., 2010). Une des hypothèse en ce qui concerne ces transcrits est donc qu'ils auraient un rôle important dans la régulation et la mise en place d'une structure compacte et réprimée nommée *hétérochromatine* [Fig 1.12]. Importante pour mon projet de recherche cette structure chromatinienne est plus amplement décrite dans la suite de ce manuscrit.

## **II- La structure chromatinienne des régions péricentriques.**

Les nSBs, au centre de mon travail de thèse, correspondent donc à l'accumulation massive du facteur de transcription HSF1 sur les régions 9q12 du génome humain, associée à une importante transcription. Ce mécanisme est surprenant dans la mesure où ce *locus* est vide de gènes, composé de répétitions en tandem de type SATIII, et que ce type de séquences est connu pour être organisé en une structure extrêmement compacte et très peu perméable à la transcription : *l'hétérochromatine constitutive péricentrique*. L'objectif de cette partie est de décrire les caractéristiques de cette organisation structurale de l'ADN en *l'hétérochromatine constitutive* ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués. Puis de souligner l'importance du caractère d'*hétérochromatine péricentrique* des régions 9q12, et les acteurs essentiels à la structuration de ces *loci*.

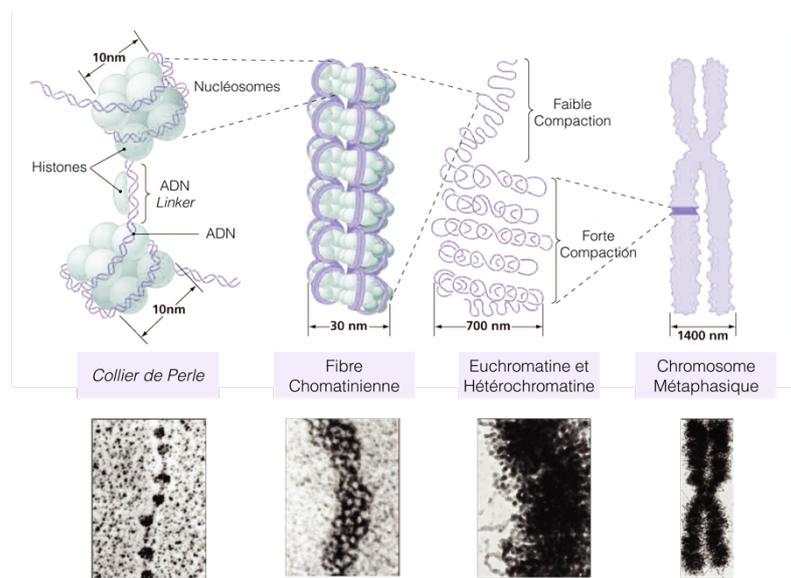
### **1. De l'ADN à l'hétérochromatine constitutive :**

L'ADN est une molécule universelle présente dans les cellules sous la forme d'un très long polymère structuré en hélice double brin. Parce qu'il constitue le support de l'information génomique, il doit être à la fois protégé, compacté, régulé et organisé dans le noyau des cellules eucaryotes. Dans chacune des cellules humaines, c'est plus de deux mètres de polymère d'ADN qui sont compressés dans quelques micromètres ( $\mu\text{m}$ ) d'espace, avec un taux de compaction estimé à plus de 10000. Le niveau d'organisation est tel que malgré cette compaction, chaque nucléotide de l'ADN reste accessible à la réplication ainsi qu'à la transcription. C'est au moment de la division cellulaire que l'ADN est le plus compacté, il est alors structuré en *chromosomes métaphasiques* afin que chaque cellule fille hérite exactement de la même information génique. C'est Walther Flemming, en 1880, qui a décrit ces structures pour la première fois et les a caractérisés de *corpuscules cellulaires très affins pour les colorants basiques* d'où les noms de *chromosomes* et *chromatine*. Mais c'est plus récemment que les liens entre la structure et les différentes fonctions de cette organisation, au regard de la nécessité de compaction, de protection et de régulation du génome ont été explorés.

#### **1.1. La structure de la chromatine**

*La fibre chromatinienne* ou *chromatine* est une fibre composée de l'ADN génomique associé à de l'ARN et des protéines. Son aspect très hétérogène dans le noyau des cellules interphasiques est le reflet de ses différents niveaux hiérarchiques de repliement (*pour revue* : Li et al., 2015). L'unité

fondamentale de la chromatine est le *nucléosome* et son état le plus compacté le *chromosome métaphasique* [Fig 1.13].



**Fig 1.13. Organisation structurale de la fibre chromatinienne.** Représentation schématique et leur visualisation en MET des différents niveaux d'organisation de la fibre chromatinienne, de son unité de base, le nucléosome, à sa forme la plus compactée, le chromosome métaphasique.

### La structure primaire : le nucléofilament

- Le nucléosome

Le nucléosome a été identifié pour la première fois en 1970 par l'observation la fibre chromatinienne au microscope électronique à transmission. Depuis, sa structure a été finement caractérisée à 1,9 et 2,8 angström par des analyses cristallographiques aux rayons X (Davey et al., 2002; Luger et al., 1997). Il s'organise en un complexe de huit protéines histones, H3, H4, H2A et H2B, chacune présente en deux copies, autour desquelles s'enroule un fragment d'ADN d'environ 147pb sur environ 1,65 tours d'hélice gauche. Sa hauteur est de 5,5 nanomètres (nm) et son diamètre de 10nm, ainsi complexé un fragment d'ADN est 6 fois plus compacté que s'il était nu.

Les protéines histones cœurs sont des petites protéines basiques (de 11 à 17 Kilobases (Kb)), toutes constituées d'un domaine globulaire et d'une queue N-ter. C'est le domaine globulaire des histones, extrêmement structuré, qui permet la formation de l'octamère d'histones et son association à l'ADN. La queue N-ter est beaucoup plus flexible, très basique et contient beaucoup de résidus lysines (K) et arginines (R) positifs. A l'extérieur du cylindre compacte formé par les domaines globulaires, elles sont très sujettes à des modifications post-traductionnelles, qui

régulent finement l'interaction avec l'ADN mais aussi celle entre les nucléosomes. L'absence de spécificité de séquence s'explique par le fait que les bases azotées n'entrent pas en contact avec les protéines histones. En effet l'interaction se fait par les groupements phosphates et les désoxyriboses de l'ADN.

- Le nucléofilament

Les nucléosomes sont reliés entre eux par un fragment d'ADN dit *linker* de moins d'une centaine de pb. La longueur varie en fonction des espèces mais aussi en fonction du type cellulaire étudié. La fibre formée par le polymère d'ADN enroulé régulièrement autour des octamères d'histones forme une structure dite en *collier de perle* de 11 nm : le *nucléofilament* [Fig 1.13].

- Le chromatosome

Interagissant avec l'octamère d'histones et le fragment d'ADN, une autre protéine histone, l'histone H1, stabilise le double tour d'ADN ainsi que la structure secondaire que forme l'association des nucléosomes entre eux. Il n'entre pas en contact avec les histones de cœur mais empêche le **glissement** des nucléosomes. Il a une dynamique d'interaction avec l'ADN plus rapide que les autres protéines histones, estimée de l'ordre de la minute par des expériences de **recouvrement après photoblanchiment** (FRAP) dans des cellules murines et humaines (Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000). Son mode d'interaction avec l'ADN et les nucléosomes est encore controversé, récemment il a été décrit à partir d'une méthode basée sur du **transfert d'énergie par résonance de type Förster** (FRET) en solution, couplée à des gels PAGES, que l'histone H1 se lie à une structure géométrique particulière de l'ADN nucléosomal qui consiste en un nucléosome simple avec un bras d'ADN d'au moins 18pb (White et al., 2016). La fixation de l'histone H1 sur une chaîne de trois nucléosomes modifie leur disposition de telle façon que seul un histone H1 peut se lier au bras d'un nucléosome (White et al., 2016). Cette structure est nommée le *chromatosome*.

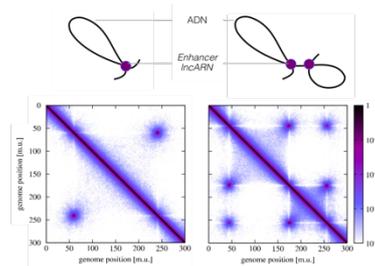
### **La structure secondaire : la fibre de 30 nm**

Les nucléosomes interagissent ensuite entre eux ce qui conduit à la condensation de la fibre de 11 nm en une fibre de 30 nm, très largement observée et analysée *in vitro*, mais dont l'évidence *in vivo* reste encore à démontrer. L'organisation que prendrait cette fibre *in vivo* est également controversée. Elle serait hétérogène et dynamique et prendrait de nombreuses conformations en fonction de facteurs intrinsèques et environnementaux comme la longueur de l'ADN *linker*, la

présence d'histone H1 et la concentration ionique (pour revue: Ozer et al., 2015). Deux principaux modèles représentent l'organisation de la fibre 30nm : en solénoïde ou en zig-zag. Dans le premier la fibre de 30nm forme une hélice simple où deux nucléosomes consécutifs se retrouvent côte à côte. Dans le second modèle, la fibre est une hélice en zig-zag à deux départs, où le contact ne se fait pas entre les nucléosomes voisins mais entre ceux espacés d'un nucléosome (pour revue : Ozer et al., 2015). La structure en zig-zag qui se forme en présence de l'ADN linker court et du facteur H1 serait la plus représentée (Norouzi et al., 2015).

### La structure tertiaire :

Des repliements de la fibre de 30nm sous forme de boucles et d'enroulement forment enfin les structures dites d'ordres supérieurs. Le stade ultime de la compaction correspond aux chromosomes métaphasiques dans lesquels le diamètre de chaque chromatide a été estimé à 840nm. Sa structure flexible et élastique ainsi que sa mise en place sont mal comprises. La *cohésine*, connue pour induire le surenroulement d'ADN circulaire, est un des acteurs nécessaires à cette conformation.



**Fig 1.14. Les Associations Topologiques de Domaines (TAD).** Les TAD sont favorisés par la formation de boucles de chromatine médiées par des enhancers ou des ARNnc. (D'après Hofmann et al., 2015).

Par des techniques de *capture de la conformation chromosomique* (3C) de l'intégralité du génome (HiC), des *domaines topologiques associés* (TAD) de l'ordre de la mégabase (Mb) ont également été mis en évidence dans le noyau des cellules interphasiques. Ces domaines sont des régions d'ADN avec un très fort taux d'interactions, séparées par des frontières très visibles qui seraient définies génétiquement. Par exemple le chromosome X inactif est structuré en deux grands TAD inactifs reliés par une séquence ADN dont la délétion entraîne la perte de l'organisation du chromosome X en deux domaines distincts (Giorgetti et al., 2014; Nora et al., 2012). De façon intéressante, les TAD sont favorisés au sein d'un même bras (p ou q) d'un même chromosome, ce qui confirme des observations antérieures obtenues à partir d'*hybridation fluorescente in situ* ADN (FISH ADN) :

l'existence de *territoires chromosomiques*. Les TAD existent aussi au sein même de ces territoires chromosomiques, favorisés entre autres par l'association d'*enhancers* et des promoteurs, ainsi que d'ARNnc, qui favorisent la formation de boucles chromatiniennes (pour revue : Gorkin et al., 2014; Hofmann et al., 2015).

Dans le noyau des cellules interphasiques, la compaction de la chromatine est très hétérogène. Cette hétérogénéité a été mise en évidence en 1928 par le biologiste Heitz qui a observé que le noyau était composé de deux grands types de chromatine qui correspondent à deux états de compaction distincts. La première est l'*euchromatine* (ou *chromatine vraie*) qui est la plus relâchée et la moins marquée par les colorants. La seconde est l'*hétérochromatine* très compactée, où s'accumulent les colorants basiques. Chacun des types de chromatine a tendance à se regrouper au sein du noyau. Ce phénomène est très visible chez *Mus Musculus* où l'hétérochromatine constitutive forme des structures extrêmement compactes nommées *chromocentres*.

## **1.2. La régulation de la structure de la chromatine : l'épigénétique**

La différence de structure entre les différentes régions chromatiniennes du noyau est finement corrélée à l'expression de l'ADN. En effet plus l'ADN est enroulé autour de nucléosomes et compacté, moins il est accessible à d'autres facteurs tels que les facteurs de transcription et les machineries transcriptionnelles. Les mécanismes moléculaires à la base de cette régulation fine de l'expression de l'ADN sont influençables par l'environnement, réversibles et héréditaires.

L'*épigénétique* dans sa définition la plus large, décrit l'ensemble des mécanismes moléculaires qui régulent finement l'expression de l'ADN sans être associés à une altération du code génétique. Les principales sont : (i) les histones et leurs variants, (ii) les modifications chimiques de l'ADN et des histones ou le *code histone* (iii) Les facteurs du remodelage de la chromatine.

### **Les histones et leurs variants :**

- L'assemblage et le désassemblage des nucléosomes :

Le premier niveau par lequel la structure de la chromatine régule la compaction et l'expression de l'ADN est celui des nucléosomes. Effectivement l'enroulement de l'ADN autour des protéines histones diminue son accessibilité pour un grand nombre de facteurs activateurs de la transcription. Par exemple pour que l'ARN polymérase (ARN PolII) puisse être recrutée au niveau des *Sites d'initiation de la transcription* (TTS) et démarrer la transcription d'un gène, celui-ci doit être

libre de tout nucléosome (Lorch et al., 1987). A l'inverse, la présence d'un nucléosome au TSS est l'évènement précoce d'une répression transcriptionnelle stable. C'est notamment le cas de gènes inactivés dans des adénocarcinomes pour lesquels le repositionnement de nucléosomes aux TSS, identifié par une analyse globale du génome, est à l'origine de leur répression (Hesson et al., 2014). L'exemple de l'ARN PolII peut être rapporté à d'autres facteurs dont l'activité nécessite une liaison à l'ADN. Toujours par des analyses globales du génome humain il a entre autres été montré que le positionnement des nucléosomes est désorganisé autour des sites de liaison des facteurs de transcription et que cette désorganisation est corrélée à l'expression génique. Il est intéressant de noter que les sites de liaison de répresseurs ne montrent pas de désorganisation des nucléosomes (Nie et al., 2014). De façon globale, à l'échelle du génome, les régions d'ADN transcriptionnellement actives sont associées à un taux plus faible de nucléosomes. Et de façon intéressante, une forte activité transcriptionnelle diminue à son tour l'enrichissement en nucléosomes. L'ARN PolII a en effet la capacité de déstabiliser la liaison des nucléosomes à l'ADN par l'induction de *surenroulements positifs* en amont de *surenroulements négatifs* (Liu et al., 1987).

Le positionnement des nucléosomes sur la chromatine est donc un évènement dynamique. Les nucléosomes sont assemblés, désassemblés, déplacés le long de l'ADN ce qui nécessite des mécanismes actifs. Des complexes de remodelage et des chaperons d'histones ont été identifiés. Parmi eux le complexe FACT, pour *Facilitates chromatin transcription*, est le complexe minimal pour permettre *in vitro* la progression de l'ARN PolII sur une fibre chromatinienne. Le complexe FACT humain purifié désassemble les dimères H2A-H2B, ce qui conduit à l'hypothèse que ce complexe pourrait désassembler les nucléosomes en amont de l'ARN PolII pour les réassembler après son passage. D'autres enzymes agissent sur le nucléosome complet, ces complexes de remodelage ATP-dépendants font parti de quatre familles majeures, toutes avec des rôles redondants *in vivo* : SWI/SNF, ISWI, INO80, and CHD. SWI/SNF induit l'éviction des nucléosomes, tandis que les *autres font glisser* les nucléosomes vers des régions appropriées après leur incorporation. Chez la levure, ces quatre familles ont un rôle coopératif. Par exemple dans le cas de l'activation du gène PHO5 en réponse à une privation de phosphate. Dans ce système les quatre complexes induisent l'éviction des nucléosomes dans sa région promotrice et son TSS (pour revue : Teves et al., 2014). De nombreux facteurs existent et permettent par des mécanismes d'action spécifiques la régulation fine de l'enrichissement en nucléosome. Chez la drosophile, la protéine GAF (*GAGA Factor*) s'associe aux promoteurs et les maintient libres de nucléosomes, permettant ainsi le recrutement et le positionnement de l'ARN PolII. Ce facteur est entre autres associé aux *loci* où l'ARN PolII est en pause (Fuda et al., 2015).

- Les variants d'histones :

En plus de cette régulation par les chaperons et les facteurs de remodelage, la dynamique des nucléosomes est modifiée par l'incorporation de variants d'histones. Un grand nombre de ces variants existent et remplacent les histones canoniques au sein des nucléosomes. Différents par leurs séquences génomiques ils stabilisent ou déstabilisent les nucléosomes et leur interaction avec l'ADN. Leurs incorporations par des chaperons spécifiques mais aussi leurs expressions, localisations et fonctions sont très spécialisées, comme le montrent les exemples des variants H2A.Z, CENP-A et TH2B respectivement impliqués dans l'activation transcriptionnelle, la régulation de la structure chromatinienne et la gamétogénèse. Le variant le plus conservé au sein des eucaryotes est le variant H2A.Z qui n'a cependant que 60% d'homologies avec H2A. Il est surtout présent autour des TSS des gènes actifs, permettant la transcription. Son mode d'action est mal connu, mais le renouvellement plus important des nucléosomes qu'il compose pourrait faciliter le recrutement et l'élongation de l'ARN PolII (Yen et al., 2013). CENP-A pour *Centromere Protein A*, est un variant de l'histone H3 qui forme une interface plus rigide et compacte avec l'histone H4. Il est situé aux centromères de tous les eucaryotes, pouvant seul déterminer l'identité des centromères et la formation du *kinétochore* décrit plus loin. Il est donc essentiel à la division cellulaire, sa délétion comme sa surexpression ont un impact direct sur la ploïdie des cellules et donc sur la tumorigénèse et la fertilité (pour revue : Allshire et al., 2009). Enfin, la spermatogénèse est un processus au cours duquel les histones sont progressivement remplacées en nucléoprotamines, permettant ainsi une compaction extrême de la chromatine au sein des spermatozoïdes. Ce mécanisme unique nécessite l'expression de variants spécifiques aux testicules (Govin et al., 2007). L'équipe de S.Kochbin a notamment montré que le variant TH2B (pour testis H2B), en déstabilisant les nucléosomes, est la clef de la dernière étape de transition entre les histones et les protamines (Montellier et al., 2013).

### L'ajout de groupements chimiques :

Un autre mécanisme qui permet de réguler à la fois la compaction de l'ADN et son activation est l'ajout des groupements chimiques sur l'ADN et les histones. Les modifications les plus courantes sont la méthylation de l'ADN ainsi que l'acétylation et la méthylation des histones décrites plus loin. Ces marques épigénétiques ne sont pas les seules, beaucoup ne sont pas encore découvertes et nombre d'entre elles ont des fonctions qui restent inconnues. Des équipes cherchent à identifier ces modifications post-traductionnelles d'histones (PTM pour *post-translational modifications*) par la comparaison des poids moléculaires réels et attendus de peptides d'histones

en spectrophotométrie de masse. C'est notamment ainsi qu'a été découverte la *crotonylation* (Tan et al., 2011).

En plus de leur rôle dans la stabilisation des nucléosomes et la compaction de l'ADN, les groupements chimiques ajoutés sur l'ADN comme sur les histones recrutent des acteurs spécifiques, agissant en synergie ou en concurrence pour l'induction de voies de signalisation complètes d'activation et de répression transcriptionnelle. Ainsi, toutes ces modifications constituent un code complexe nommé **le code histone**. Les principales modifications ajoutées et retirées par des enzymes spécifiques sont détaillées ci-dessous.

- La méthylation de l'ADN :

La méthylation de l'ADN est une modification ancestrale retrouvée chez les bactéries. Seule modification apportée directement à l'ADN, elle correspond à l'ajout d'un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) au niveau des adénines et des cytosines (C). En ce qui concerne les vertébrés, la méthylation de l'ADN a lieu quasiment exclusivement sur les cytosines suivies d'une guanine (G), ou dinucléotides CpG. Ils ont tendance à se regrouper en îlots CpG au niveau des promoteurs et des TSS. Leur méthylation déclenche, de façon indirecte, la formation d'une structure chromatinienne compacte au niveau de ces promoteurs, associée à une répression transcriptionnelle. En effet il a été montré qu'*in vitro* elle participe à une plus grande régularité dans le positionnement des nucléosomes au sein des régions péri-centriques humaines mais elle n'est pas suffisante à une compaction (Osakabe et al., 2015). En revanche, *in vivo*, elle est nécessaire au recrutement d'un certain nombre de facteurs qui initient à leur tour la répression et la compaction de la chromatine. Ces mécanismes sont essentiels à un grand nombre de processus biologique dont on peut citer pour exemple le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, l'empreinte génomique parentale ou encore la formation et la mise en place de la mémoire (Halder et al., 2015).

La méthylation de l'ADN a un fort impact sur les fonctions cellulaires, par conséquent les enzymes qui catalysent la méthylation des cytosines ou 5mC, nommées ADN méthyl-transférases ou DNMT sont, elles aussi, essentielles. Chez les mammifères, 5 DNMT existent, certaines avec des rôles plus spécialisés que d'autres. La première identifiée, DNMT1, est essentielle au développement embryonnaire en assurant la maintenance des 5mC sur le génome au cours des divisions cellulaires. En effet elle interagit préférentiellement avec les brins d'ADN hémiméthylés et s'associe avec les CpG non méthylés pour y déposer un groupement méthyl, propageant ainsi

la marque répressive. Les DNMT3A et DNMT3B méthylent l'ADN *de novo* et peuvent se compléter, elles sont notamment recrutées par d'autres facteurs répresseurs et renforcent l'état répressif de la chromatine. DNMT1 est quant à elle restreinte aux cellules germinales, son absence entraînant une stérilité. La fonction de la dernière, DNMT2, n'est pas encore comprise.

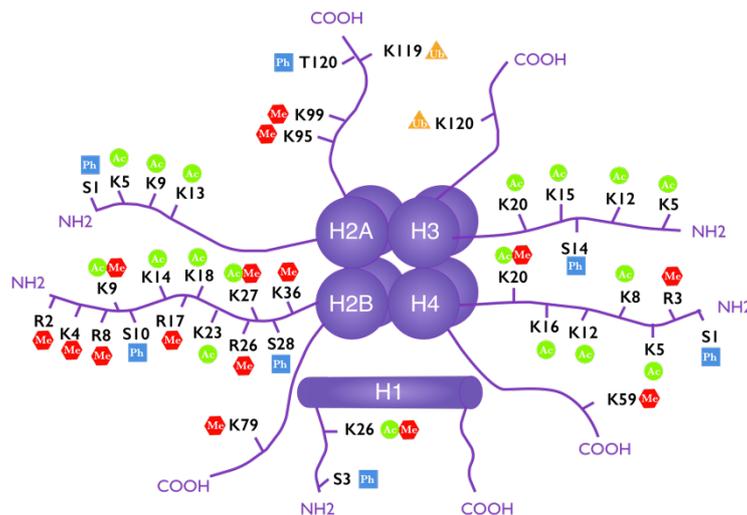
La méthylation de l'ADN est la marque épigénétique la plus stable, son élimination peut être passive ou active. Par exemple, l'absence de méthylation par la DNMT1 du brin néosynthétisé au cours de la réplication conduit à la perte passive de méthylation. Ce mécanisme peut également être simulé par l'utilisation d'homologues non méthylables de cytosines comme la *5-Azacytidine*. Dans ces conditions, la chromatine perd progressivement ses hauts degrés de compaction (Haaf et al., 2000). La perte active des 5mC se fait surtout par l'excision des cytosines méthylées ou de plusieurs nucléotides, remplacés ensuite par les mécanismes moléculaires associés à la réparation de l'ADN : respectivement par les machineries *Base excision repair* et *nucleotide excision repair*. Mais aussi à travers l'action d'enzymes TET (*Ten Eleven Translocation*) possédant une activité déméthylase (Kohli et al., 2013).

La régulation de la méthylation globale de l'ADN influe des traits précis physiques et comportementaux. L'ingestion de nourriture méthylée au stade larvaire chez les insectes dont les fourmis et les abeilles entraîne une hyperméthylation globale du génome qui, en parti par l'intermédiaire de l'inactivation de l'EGFR, conduit respectivement à des fourmis ouvrières de grande taille et à l'évolution des larves d'abeille en reines (Alvarado et al., 2015; Kamakura et al., 2012). De même, chez l'Homme et la souris, un stress prénatal conduit à une augmentation en DNMT1 et 3B associée à une *hyperméthylation* des neurones GABAergique du cortex frontal et de l'hippocampe, entraînant des désordres de type schizophrénie et des troubles bipolaires (Dong et al., 2016; Matrisciano et al., 2013). A l'inverse, une *hypométhylation* globale est retrouvée dans le développement de maladies inflammatoires chroniques comme le Lupus érythémateux systémique et la sclérose en plaques systémique (Matatiele et al., 2015). De façon intéressante, même si une hypométhylation des séquences répétées de type SATII est trouvée dans la plupart des lignées tumorales, elle ne semble pas être la cause mais plutôt la conséquence d'une activation transcriptionnelle, potentiellement induite par la HSR (Tilman et al., 2012).

- Les modifications post-traductionnelles des histones :

En plus des variants d'histones et de la méthylation de l'ADN, les longues queues des protéines histones sont flexibles et comportent un grand nombre de résidus aptes à recevoir des

groupements chimiques qui permettent un contrôle plus spécifique de l'état de la chromatine [Fig 1.15]. Les queues des histones H3 et H4 sont notamment riches en lysines et arginines qui sont tous deux des résidus basiques positifs pouvant être chimiquement modifiés. D'autres résidus, comme les sérines, peuvent être phosphorylés. Une corrélation directe existe entre les PTM, la structure chromatinienne et l'activité transcriptionnelle.



**Fig 1.15. Modifications post-traductionnelles des histones.** Schéma d'un nucléosome composé d'histones de coeur et H1 et des sites des principales modifications post-traductionnelles possibles : l'acétylation (Ac), la méthylation (Me), la phosphorylation (Ph) et l'ubiquitination (Ub). (D'après Tollervey et al., 2012).

**L'acétylation.** Comme décrit précédemment, les résidus lysines et arginines de la queue des histones subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles dont une acétylation. De façon globale, cette marque est associée à une chromatine relâchée et active (*pour revue* : Galvani et al., 2015). Son premier impact sur les nucléosomes est la neutralisation des propriétés basiques et de la charge positive des histones qui interagissent avec l'ADN acide et chargé négativement. Cet impact est visualisable sur la structure cristallographique d'un nucléosome contenant un histone H4 tétra-acétylé authentique au niveau des résidus de lysine (K) K5/K8/K12/K16 à 2,4 angström, comparée à celle, à 2,2 angström, d'un nucléosome non modifié. La comparaison de ces deux structures montre que l'interaction de la queue N-ter avec l'ADN intra- et inter-nucléosomal est clairement réduite quand l'histone H4 est acétylé. La tétra-acétylation inhibe également la formation de la fibre de 30nm. En revanche, la structure fondamentale du

nucléosome n'est pas modifiée, ce qui inclue l'octamère d'histones et la structure visible des queues N-ter (Wakamori et al., 2015).

L'acétylation des histones est un processus hautement dynamique qui dépend de la balance entre les enzymes qui acétylent les histones, les *Histones acétyl-transférases* (HAT), et celles qui retirent le groupement acétyl des histones appelées *histones déacétylases* (HDAC). L'équilibre entre l'activité des HAT et HDAC est essentiel à la bonne acétylation du génome. Un déséquilibre, par exemple par l'inhibition des HDAC avec des drogues, comme la *trichostatine A* (TSA) entraîne rapidement une hyperacétylation globale de la chromatine.

**La méthylation.** La méthylation des résidus arginine (R) et lysines (K) des histones est beaucoup plus complexe. Sa fonction dépend du résidu de l'histone qui est méthylé mais aussi du nombre de groupements méthyles ajoutés et de leurs positions. Les lysines pouvant supporter jusqu'à trois méthyles, les arginines jusqu'à deux mais en position symétrique ou asymétrique. Contrairement à l'ajout d'un groupement acétyle, celui d'un groupement méthyle n'altère pas la charge positive des résidus K et R. En revanche, chaque méthyle ajouté rend les résidus plus hydrophobes. Leur rôle le plus important se trouve cependant dans le recrutement facteurs induisant une activation ou une répression transcriptionnelle de la chromatine.

Les enzymes responsables de l'ajout de groupements méthyles sur les résidus K et R sont respectivement les HKMT (*Histone Lysine Méthyl-transférase*) et les PRMT (*Protein Arginine Méthyl-transférase*). C'est le domaine SET (*Su(var)3-0, Enhancer-of-zest, Tritorax*), qui porte le nom de la première enzyme sur laquelle il a été identifié qui catalyse le transfert d'un groupement méthyle sur la queue N-Ter des histones. Leur enlèvement peut être réalisé par des protéines chaperonnes qui renouvellent les nucléosomes. Le temps de demi-vie des histones méthylés étant quasiment aussi long que les nucléosomes eux-mêmes, on a longtemps cru qu'il n'existait pas d'histone déméthylase. La première *Histone Lysine déméthylase* (KDM1A) a été découverte en 2004 et agit sur H3K4me2 et H3K9me2. Depuis 6 familles ont été identifiées (KDM1-6). La première *Histone Arginine déméthylase* (JMJD6 pour *Jumonji domain-containing 6 protein*) a été découverte en 2007, elle déméthyle les résidus H3R2 et H4R3 (Chang et al., 2007).

Un grand nombre d'histones méthyl-transférases et déméthylases ont été identifiées depuis. Ces enzymes sont très spécifiques des résidus et de la position des groupements méthyles sur ces résidus, ce qui permet une régulation très fine de ces marques épigénétiques. Leurs fonctions sont extrêmement variées, elles impactent à tous les niveaux de la vie d'une cellule.

- Le code histone et ses conséquences :

En plus de leur effet direct sur la structure chromatinienne, toutes ces marques sont lues par des enzymes dites *readers* et induisent des voies complètes de signalisation. La complexité des marques apposées sur l'ADN et les histones, ainsi que leur capacité à entrer en collaboration ou en concurrence a conduit à l'hypothèse d'un code épigénétique nommé le *code histone*. Chaque marque est reconnue par des domaines particuliers, présents au sein d'enzymes qui vont propager les marques épigénétiques ou en ajouter d'autres : les *Writers*, ou à l'inverse en éliminer, les *Erasers*. Ces domaines sont aussi chez des facteurs de remodelage de la chromatine ou impliqués dans la réparation de l'ADN.

Par exemple, l'acétylation des histones recrute des facteurs de remodelage de la chromatine impliqués dans l'activation transcriptionnelles. Ces *readers* contiennent un *bromodomaine* (BRD), présent chez l'Homme dans 46 protéines regroupées en 8 familles (pour revue : Ferri et al., 2015). Parmi les plus connues, la famille BET propage l'acétylation sur la chromatine.

De même, la reconnaissance de la méthylation des lysines se fait par plusieurs domaines : le *chromodomaine*, le *pHD-domain* et le domaine *TUDOR*. La marque H3K9me3 est par exemple reconnue par les protéines de la famille HP1 pour *Heterochromatin Protein 1* qui contiennent un *chromodomain*. Ces protéines, décrites plus loin, s'associent ensuite entre elles ce qui conduit à une compaction de la chromatine, ainsi qu'à la propagation de la marque H3K9me3 sur les régions adjacentes par le recrutement l'HKMT Suv(var)3-9 spécifique de la méthylation de H3K9me3.

Bien d'autres voies entrent également en coopération. La méthylation *de novo* de l'ADN se fait par exemple grâce au recrutement des DNMT par une enzyme capable de lire la marque H3K27me3. Tandis que d'autres signalisations se bloquent mutuellement. Comme la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone 3 par la kinase Aurora B au moment de la métaphase qui inhibe le recrutement des protéines HP1 aux régions péri-centromériques, malgré la présence d'H3K9me3 (Fischle et al., 2005). Chez la levure, les histones chaperonnes ASF1 et HIRA diffusent le long de la chromatine réprimée en association avec les protéines de la famille HP1, elles-mêmes associées avec des complexes HDAC SHREC (*Snf2/HDAC repressor complex*) Clr6. Ce qui conduit à une suppression de la transcription anti-sens via la déacétylation des histones, associée à une augmentation de l'occupation des nucléosomes. Le tout induit un renforcement de la répression transcriptionnelle des régions répétées tout en prévenant la fixation de facteurs liés à l'activité transcriptionnelle comme TFIIIC (Yamane et al., 2011).

### 1.3. Les différents types de chromatine

Toutes les caractéristiques décrites précédemment mènent à la distinction de deux grands types de chromatine : l'*hétérochromatine* et l'*euchromatine*. Cependant, les analyses de l'*épigénome* à large échelle, mettent en évidence une complexité beaucoup plus élevée conduisant à la distinction plus fine de différents sous-types de chromatine notamment en fonction des marques épigénétiques combinées sur chacune d'elles et des facteurs de remodelage en présence. Nous verrons tout d'abord les caractéristiques des deux grands types de chromatine. Puis nous verrons plus en détail quelles sont les différences chromatiniennes au sein de chaque catégorie.

#### L'euchromatine et l'hétérochromatine :

Les deux grands types majeurs de chromatine sont l'euchromatine et l'hétérochromatine. La première est une chromatine relâchée, riche en gènes et qui a la capacité d'être fortement transcrite. A l'inverse, l'hétérochromatine est très compacte, reste pauvre en gène, et n'est pas caractérisée par une transcription active. Elles possèdent à la fois des différences structurales et fonctionnelles [Fig 1.16].

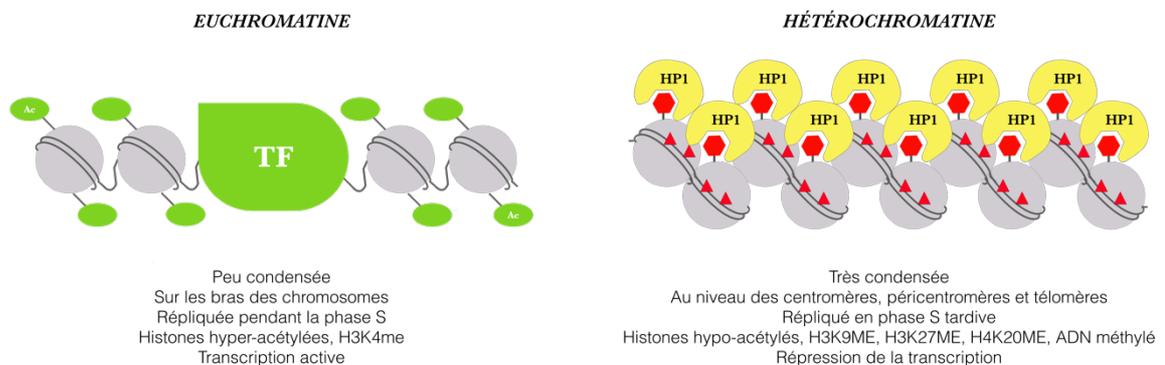


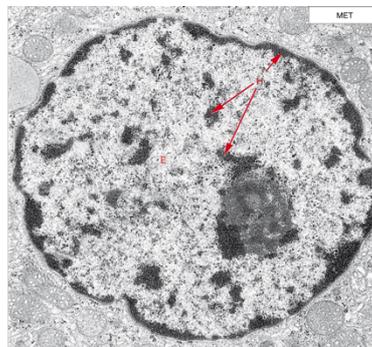
Fig 1.16. Différences majeures entre les deux grands types de chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine.

- Une différence de composition et d'expression transcriptionnelle

Que ce soit par leurs structures ou par leurs marques épigénétiques décrites ci-dessous, l'euchromatine et l'hétérochromatine ont respectivement les caractéristiques typiques d'une chromatine fortement transcrite et d'une chromatine globalement réprimée. L'euchromatine est

très riche en gènes qui sont transcrits pour donner majoritairement des ARN messagers et des protéines. Elle est très accessible et facilement inductible et transcrite. L'hétérochromatine est très pauvre en gènes. Les gènes qui la composent sont des gènes qui ont été réprimés au cours de la différenciation cellulaire et qui ne doivent en aucun cas être transcrits. Elle est majoritairement composée de séquences dites non-codantes c'est à dire qui ne donnent pas d'ARN messagers ni de protéines. Contrairement à ce que l'on a très longtemps affirmé, elle est néanmoins transcrite à un très faible taux en ARN dits *non-codants*.

- Une différence de structure

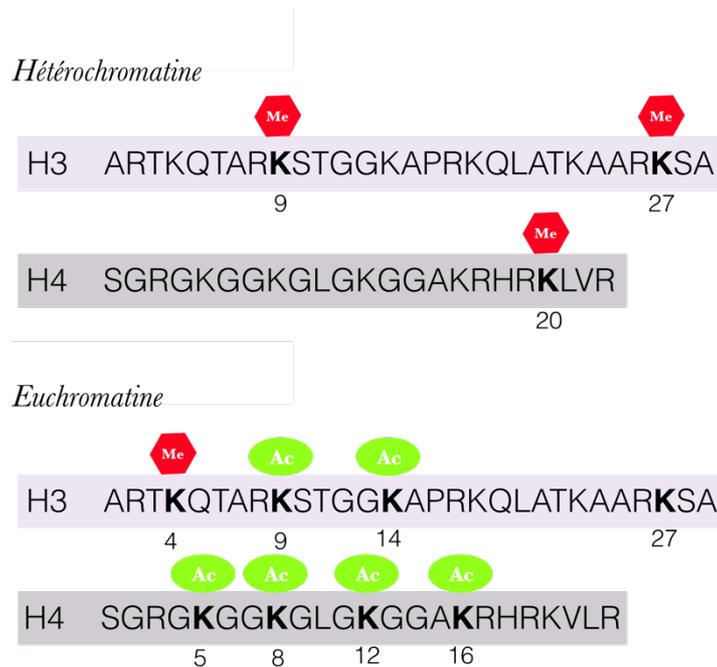


**Fig 1.17. Le contraste Euchromatine/Hétérochromatine.** Chromatine d'un noyau interphasique observée au MET. L'hétérochromatine (H) est en périphérie du noyau et des nucléoles, l'euchromatine (E) est diffuse dans le noyau.

La différence fondamentale à la base de la distinction entre euchromatine et hétérochromatine est leur densité. Très visible au microscope électronique à transmission où l'hétérochromatine est très dense aux électrons tandis que l'euchromatine l'est beaucoup moins [Fig1.17]. La densité plus importante de l'hétérochromatine est confirmée par une résistance accrue aux nucléases, un ADN *linker* plus court entre les nucléosomes et par l'appartenance à des fractions différentes dans des expériences de sédimentation de fractions de chromatine sur gradient de sucrose (Gilbert et al., 2004; Wallrath et al., 1995). Cette expérience a mis en évidence que les régions pauvres en gènes correspondent à des structures tridimensionnelles beaucoup plus compactes que ce soit chez la souris ou chez l'Homme. Cependant une exception existe pour les *loci* 9q12 chez l'Homme, qui sont les régions transcriptionnellement actives en réponse à un stress. Ces régions sont en effet relâchées malgré leur absence de gènes. Ces différences de structures sont aussi retrouvées au sien de gènes inactifs n'appartenant pas à la même catégorie de chromatine : des images en super résolution de gènes transcriptionnellement inactifs appartenant à l'euchromatine ou de gènes appartenant à l'hétérochromatine, réprimés par la marque H3K27me3, montrent que la structure

tridimensionnelle de ceux appartenant à l'hétérochromatine est beaucoup plus compacte et fermée (Boettiger et al., 2016).

- Des différences épigénétiques



**Fig 1.18. Modifications post-traductionnelles d'histones enrichies à l'hétérochromatine ou à l'euchromatine.** Représentation des méthylation (Me) ou acétylation (Ac) caractéristiques des queues d'histones H3 et H4 à l'hétérochromatine ou à l'euchromatine. (D'après Tollervey et al., 2012).

Un enrichissement en marques épigénétiques spécifiques caractérise ces deux types de chromatine [Fig 1.18]. L'euchromatine est globalement marquée par une hypométhylation des îlots CpG correspondant à des promoteurs actifs (Haaf et al., 2000), une hyperacétylation des histones entre autres sur les résidus H3K9, H3K14, H4K5, H4K8, H4K12 et H4K16, ce qui entraîne un relâchement de la structure de la fibre de 30nm (Wakamori et al., 2015) et par la présence d'H3K4me3. Cette marque recrute des facteurs de remodelages qui ouvrent la chromatine comme CHD1 (pour *chromo-ATPase/helicase-DNA-binding*) tout en prévenant la liaison de complexes répresseurs dont l'HDAC NuRD (Flanagan et al., 2005; Nishioka et al., 2002). A l'inverse, l'hétérochromatine est caractérisée par une hyperméthylation des îlots CpG et une hypoacétylation des histones ce qui correspond à une chromatine compacte et réprimée (Haaf et al., 2000). Ses marques caractéristiques sont H4K20me3, H3K9me3, H3K64me3 et H3K27me, elle est également enrichie en facteurs de remodelages répresseurs comme HP1.

- Des différences de cinétiques de réplication

Les propriétés de chaque type de chromatine influencent le moment de la réplication de l'ADN. Le cycle cellulaire se décompose en 4 phases : la phase de croissance G1, la phase de Synthèse (S) de l'ADN, la phase de croissance G2 et la Mitose (M). C'est au cours de la phase S, qui dure en moyenne 8 heures dans les cellules humaines, qu'a lieu la réplication de l'ADN. Alors que la réplication de l'euchromatine commence dès le début de cette phase, l'hétérochromatine est répliquée très tardivement, ce qui peut être un autre événement en lien avec sa plus faible accessibilité. Néanmoins il a été montré que ce n'est pas la raison qui conduit à la réplication tardive du chromosome X inactif des mammifères (Panova et al., 2013).

- Une différence de localisation

Les différences épigénétiques et d'expression de l'euchromatine et de l'hétérochromatine sont également reflétées par des différences de localisation nucléaire. Moins transcrite, répliquée plus tardivement, l'hétérochromatine est rassemblée à la périphérie du noyau et des nucléoles, mais aussi au centre des territoires chromosomiques, où elle est le moins accessible pour les facteurs de transcription [Fig1.17]. L'euchromatine est, quant à elle, dispersée au centre du noyau. Cette même différence est également retrouvée au sein des gènes actifs et réprimés, concentrés à la périphérie du noyau (Levsky et al., 2007). La localisation nucléaire du génome se met en place grâce à la structure de la membrane nucléaire. Elle est composée d'une membrane externe en continuité avec le réticulum endoplasmique et d'une membrane interne associée à un réseau protéique de 10nm à 15nm d'épaisseur : la *lamina nucléaire*, formée principalement par la polymérisation de filaments intermédiaires, les lamines. Ces protéines plus particulièrement associées à l'hétérochromatine sont capables d'interagir avec des facteurs nucléaires. Par conséquent la localisation de l'hétérochromatine en périphérie du noyau est due à des mécanismes actifs : par l'intermédiaire de facteurs spécifiques, l'hétérochromatine interagit avec les protéines de la lamine nucléaire qui tirent l'ADN en périphérie. Par exemple la protéine PRP14 ou *Proline Rich Protein 14*, localisée à la périphérie des noyaux interphasiques, qui interagit avec l'hétérochromatine via HPI lié à la marque H3K9me3 et la tire à la périphérie. De façon intéressante PRP14 diffuse au moment de la mitose et se relocalise rapidement à la chromatine en interagissant avec les facteurs HPI au cours de la télophase, pouvant jouer un rôle important dans l'association de l'hétérochromatine à la périphérie nucléaire en sortie de mitose (Poleshko et al., 2013). La localisation de l'hétérochromatine en périphérie du noyau est également un mécanisme actif de répression transcriptionnelle. En effet la perte d'interaction de la chromatine

avec la lamine conduit à une perte drastique de l'hétérochromatine. Chez l'Homme, le KD de la lamine B1 dans des cellules du cancer du colon conduit à la redistribution de la marque H3K27me3 de la périphérie du noyau vers une localisation diffuse en son centre, à une dérégulation transcriptionnelle, ainsi qu'à une augmentation de la taille des territoires chromosomiques (Camps et al., 2014). Le même phénomène est aussi observé dans des pathologies associées à des anomalies de l'enveloppe nucléaire chez l'Homme (Fiesi et al., 2005). Dans des fibroblastes, l'expression d'une forme mutante de la lamine A caractéristique des cellules des patients souffrant de laminopathies de type *Progeria* entraîne une dérégulation transcriptionnelle de l'hétérochromatine constitutive associée à une perte de marques répressives H3K9me3 et H3K27me3 (Shumaker et al., 2006).

Des territoires de chromatine active et répressive sont également présents sous forme de structures nucléaires. Chez la souris, l'hétérochromatine péricentrique se rassemble sous forme de foyers nommés *chromocentres*, très visibles au DAPI. C'est également ce qui se passe au cours de l'inactivation du chromosome X qui a lieu dans les cellules femelles des mammifères. Le chromosome X inactif forme un territoire très compact, réfractaire à la transcription, nommé *corpuscule de Barr*. Sa mise en place progressive se fait par l'induction d'un long ARN non-codant Xist qui se propage le long du X inactif, s'associe à la protéine chromatinienne SAF-A et pourrait entraîner son oligomérisation, conduisant à la formation d'un territoire très compact en périphérie du noyau (McHugh et al., 2015; Smeets et al., 2014). Ce phénomène semble indépendant de la transcription (Splinter et al., 2011). Les gènes qui sont tout de même ciblés par des facteurs de transcription échappent de ce territoire répressif par la formation active de boucles chromatiniennes. En ce qui concerne les régions actives on observe également le rassemblement des gènes au sein d'usines de transcription et d'épissage. Ces regroupements correspondent aux TAD décrits précédemment, en effet les deux grands types de TAD décrits sont les TAD actifs et les TAD inactifs.

### **Les différents états chromatiniens de l'euchromatine :**

Même si aucun consensus n'a été trouvé pour le moment, l'étude globale de l'épigénome par ***immunoprécipitation de la chromatine*** souligne l'existence de différents états chromatiniens au sein même de la chromatine active qu'est l'euchromatine. En effet les différentes marques épigénétiques activatrices et les facteurs activateurs et régulateurs transcriptionnels semblent s'associer préférentiellement en différentes combinaisons (The ENCODE Project Consortium et

al., 2012), c'est ainsi que commence à s'établir des cartes de la chromatine (Ernst & Kellis, 2013; Ernst et al., 2011; van Steensel, 2011).

### **L'hétérochromatine facultative et constitutive :**

De la même façon que l'euchromatine est composée d'états chromatiniens distincts, l'hétérochromatine peut être scindée en deux grands états, l'hétérochromatine facultative et constitutive, qui diffèrent par leur composition en ADN, par leur enrichissement en marques épigénétiques, mais aussi par leur fonction.

La fonction principale de l'hétérochromatine facultative est la répression génique au cours de la différenciation cellulaire, par conséquent elle est principalement composée de gènes réprimés. En effet, au fil de la différenciation, le transcriptome et le protéome des cellules se spécialisent. Cette sélection se fait progressivement par une méthylation des promoteurs, ou par une absence de transcription, qui conduit progressivement à la déacétylation, à la méthylation de l'ADN ainsi qu'à la triméthylation de H3K27me3 par les complexes *polycomb* (PCR). Un autre composant essentiel à ces structures réprimées est l'ARN non-codant. Dans le cas de l'inactivation du chromosome X, par exemple, HDAC3 est recrutée par le lncARN Xist, initiant la mise en place progressive d'hétérochromatine facultative. Ce mécanisme est effectivement suivi par le recrutement de la HMT EZH2 au sein d'un complexe nommé polycomb 2 (PCR2), responsable de la mise en place de H3K27me3 sur tout l'ensemble du chromosome inactivé. La propagation de ce territoire chromosomique répressif est aidée par la présence d'un grand nombre de transcrits LINE-1 exprimés le long du chromosome X. Alors que l'hétérochromatine facultative est marquée par H3K27me3 et les complexes PCR, l'hétérochromatine constitutive est enrichie en H3K9me3, protéines répressives HP1 et une méthylation de l'ADN. Nécessairement établie dès les premiers stades du développement embryonnaire, elle a des fonctions essentielles dans la conservation de l'intégrité du génome et le déroulement du cycle cellulaire (Saksou et al., 2015).

La mise en place de ces deux types d'hétérochromatine diffère dans le temps et par les mécanismes impliqués. L'étude de la chromatine associée à la périphérie du noyau par l'établissement de cartes des régions d'ADN qui interagissent avec les lamines nucléaires dans des cellules souches embryonnaires de souris et trois lignées de cellules différenciées permet d'identifier deux types d'hétérochromatine : celles qui subissent ou non des changements au cours de la différenciation, respectivement l'hétérochromatine facultative et constitutive (Meuleman et al., 2013). Mais à l'instar des cartes chromatiniennes réalisées pour l'euchromatine la situation

semble plus complexe : une étude plus récente a souligné la présence de 6 types de chromatines distinctes au sein de ces deux compartiments d'hétérochromatine (Zheng et al., 2015).

Alors que l'hétérochromatine facultative est complètement verrouillée à la transcription, l'hétérochromatine constitutive semble être globalement transcrite à un très faible niveau en ARN non-codants (Keller et al., 2012).

En conclusion, la chromatine est très hétérogène dans le noyau des cellules interphasiques tant au niveau de sa composition, de sa structure, de sa localisation, que des marques et des acteurs épigénétiques qui lui sont associés. Toutes ces différences permettent une régulation extrêmement fine de l'ADN, adaptée aux changements intracellulaires comme environnementaux. Dans le noyau des cellules interphasiques, c'est l'hétérochromatine constitutive, qui correspond pourtant au type de régions ciblées par HSFI en réponse à un stress thermique, qui sont les plus compactées et les moins perméables à une transcription massive.

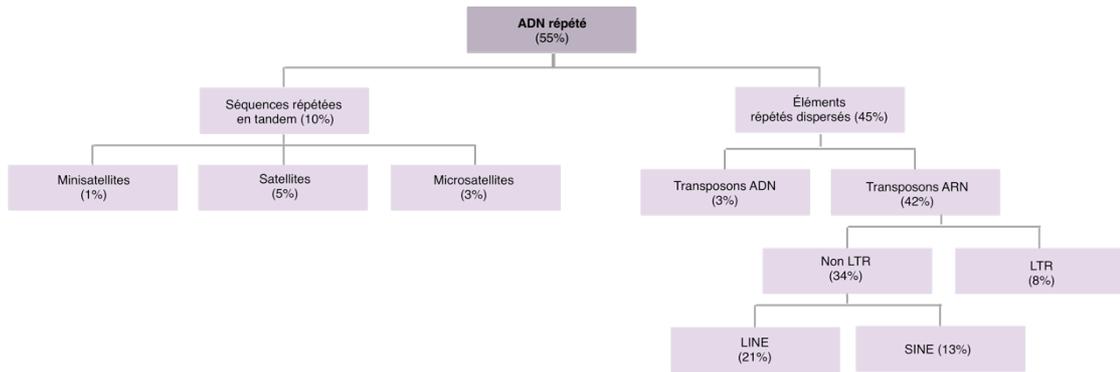
## 2. L'hétérochromatine péricentrique

Les *loci* 9q12 qui sont les sites de nucléation des nSBs sont, en conditions normales, des régions d'hétérochromatine constitutive péricentriques. Alors que nous avons précédemment décrit le caractère d'hétérochromatine constitutive de ces régions, dans cette section, nous nous intéresserons aux trois principaux acteurs qui mettent en place et régulent cette organisation : les régions d'ADN répété, l'enrichissement en H3K9me3 et les facteurs associés *Heterochromatin Protein 1* (HPI).

### 2.1. Les séquences répétées

Au sein même de l'hétérochromatine constitutive, on peut encore distinguer un autre niveau d'organisation en fonction de la localisation et de la composition des différents *loci*. Ce qui est peu surprenant compte tenu du fait que l'hétérochromatine constitutive se forme sur les régions du génome non-codantes et répétées, soit, en ce qui concerne l'Homme, la moitié de son génome.

Ces séquences sont classées en deux catégories [Fig1.19], les *séquences répétées en tandem* et les *séquences répétées dispersées* :



**Fig 1.19. Les séquences répétées du génome humain.** (D'après Jasinska et al., 2004).

- Les séquences répétées dispersées contiennent les *petits éléments nucléaires intercalés* (SINE), les *Longs éléments nucléaires intercalés* (LINE), les *transposons* et les *rétrotransposons*. Les premiers varient entre 130pb et 500pb, les plus abondants chez l'Homme parmi ce type de séquences sont les séquences ALU. Les seconds mesurent environ 6500Kb. Comme leur nom l'indique ils sont présents un peu partout dans le génome [Fig1.20]. Leur expression est finement contrôlée. C'est notamment le cas au moment de la méiose de *Drosophila Melanogaster* où l'absence d'un mécanisme de contrôle des transposons conduit à leur insertion massive dans l'ADN résultant en une stérilité. Ce type de séquences peut également participer à plus large échelle à la répression du génome. Par exemple les LINE facilitent la diffusion d'un territoire répressif lors de l'inactivation du chromosome X chez les mammifères. Les séquences Alu répriment également une partie du génome lors de la réponse au stress, en induisant la transcription anti-sens de gènes par l'intermédiaire d'HSF1.

- Les **séquences répétées en tandem** ou ADN Satellites (SAT) composent les télomères, les centromères et les régions péri-centriques [Fig1.20]. Ce type de régions répétées composent environ 10% du génome humain, elles sont subdivisées en cinq catégories en fonction du motif de base qui les compose :  $\alpha$ -SAT, SATI, SATII, SATIII et  $\beta$ -SAT. La séquence et la distribution des séquences SAT a été déterminée par des *hybridations in situ ADN* à partir d'oligonucléotides fluorescents (FISH ADN).

Ces grands blocs d'ADN répétés sont tous enrichis en H3K9me3 et en protéines HPI, toutefois certaines spécificités existent, liées aux fonctions de chaque compartiment. Brièvement, les séquences  $\alpha$ -SAT ont un motif répété de 171 pb, riche en AT, et sont localisées aux centromères

de tous les chromosomes (Choo, 1989). Elles sont les seules à être enrichies en variants d'histone CENP-A, CENP-B et CENP-C, assurant ainsi une structure propre à l'attachement du kinétochore et à la ségrégation des chromatides sœurs au cours de la mitose comme de la méiose. Les télomères sont composés de *minisatellites* ou  $\beta$ -SAT. Ils ont la particularité d'être riches en TRF2 (*telomeric Repeat Factor 2*), ce qui leur permet de former une structure en forme de boucle, évitant ainsi que l'extrémité des chromosomes soit considérée comme des coupures double-brin de l'ADN. Enfin, les régions qui nous intéressent sont les régions péri-centriques, composées de répétitions de type SATI, SATII, SATIII et  $\beta$ -SAT (Schueler & Sullivan, 2006). Tous les chromosomes humains sont composés d'une région péri-centrique cependant le type de séquences SAT varie en fonction des chromosomes. Les séquences SAT qui composent les régions juxtacentromériques capables d'interagir avec le facteur HSF1 sont les SATIII, formées de la répétition d'un motif de 5pb : GGAAT. Comme décrit précédemment elles sont présentes sur plus de 13 chromosomes autosomes, et forment un nombre de répétitions particulièrement abondant aux régions péri-centriques des chromosomes 9 et Y (Tagarro et al., 1994). La particularité des régions péri-centriques, associée à leur fonction au sein de la cellule, est la formation d'une structure extrêmement rigide et compacte, soutenant les centromères dans leur rôle au cours de la mitose et de la méiose. Cette fonction sera plus amplement détaillée dans la troisième partie de l'introduction.

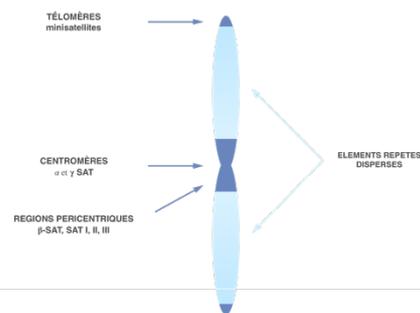


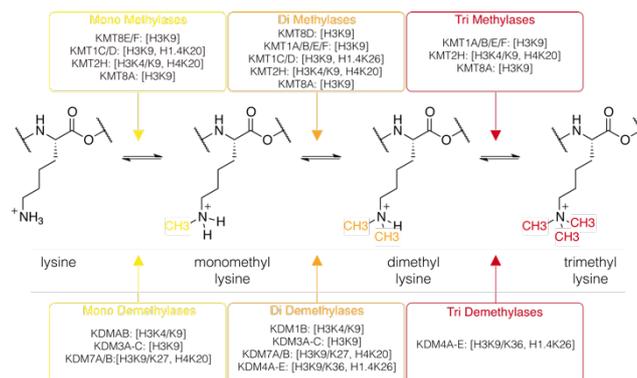
Fig 1.20. Localisations chromosomiques des différentes séquences répétées du génome humain.

Cependant, la mise en place d'une structure rigide et compacte d'hétérochromatine constitutive, associée à leur fonction, ne semble pas dépendre de la séquences d'ADN primaire puisqu'elle est particulièrement polymorphique, mais plutôt à leur nature répétée en tandem ce qui, en revanche, est conservé de *S.Pombe* à l'Homme.

## 2.2. La marque H3K9me3

La marque épigénétique la plus caractéristique de l'hétérochromatine constitutive péricentrique est H3K9me3. Elle est très conservée au cours de l'évolution, présente au niveau des régions péricentriques de *S.Pombe* à l'Homme (*pour revue* : Becker et al., 2016).

L'enzyme KMT1A (anciennement nommée SUV39H1) qui catalyse le transfert de groupements méthyles sur H3K9, est la première KMT à avoir été découverte. Comme les protéines HPI, le rôle majeur de cette enzyme a été étudié dans les mécanismes associés à ceux du PEV, qui consiste en une répression transcriptionnelle d'un gène euchromatique anormalement relocalisé près ou au sein de l'hétérochromatine (Eissenberg & Elgin, 2000). Il existe une interdépendance entre cette marque et d'autres marques répressives.



**Fig 1.21. La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3.** Un grand nombre d'enzymes contrôlent le niveau de méthylation d'H3K9 dans tout le génome : les lysines méthyl-transférases (KMT) pour la méthylation, les lysines déméthylases (KDM) pour la déméthylation. Elles assurent une fine régulation spatio-temporelle de ce résidu. (D'après Black et al., 2012)

### Les enzymes qui catalysent la méthylation d'H3K9

Chez les mammifères, ce sont les familles de KMT avec un domaine SET qui catalysent la méthylation du résidu H3K9 (Rea et al., 2000). Parce qu'elle est associée à des contextes variés (hétérochromatine constitutive, répression génique, introns, ...) un grand nombre d'enzymes ont la capacité d'impacter cette modification post-traductionnelle [Fig1.21]. Les enzymes KMT2G, KMT1A et KMT1B (respectivement SETDB1, SUV39H1 et SUV39H2 dans l'ancienne nomenclature) catalysent sa di- et sa tri- méthylation surtout à l'hétérochromatine. KMT1C et KMT1D (respectivement GPL et G9A) catalysent sa mono- et sa di- méthylation, surtout à

l'euchromatine. Ces deux types d'enzymes sont essentielles au développement des organismes. Pour exemple : un double KO KMT1A/B dans des cellules souches embryonnaires murines induit la perte en H3K9me3 au niveau des régions péri-centriques au profit d'une monométhylation H3K9me et de la triméthylation de H3K27, marque caractéristique de l'hétérochromatine facultative (Peters et al., 2003). Celui de la KMT1C résulte en une baisse drastique d'H3K9me3 dans les embryons, et plus encore au niveau des régions euchromatiques. Dans les deux situations, les embryons présentent des retards de croissance sévères et une mortalité très précoce (Tachibana et al., 2002). La surexpression de KDM4B (anciennement JMJ2B) qui déméthyle les résidus H3K9, est également associée à la perte d'H3K9me3 aux centromères et à l'augmentation des *instabilités chromosomiques* (CIN). Le même phénotype est observé dans des tumeurs du sein (Slee et al., 2012). Les souris KO pour KMT1, quant à elles, ont un développement tumoral accru, tels que des lymphomes (Peters et al., 2001).

Chez *S.Pombe*, cette marque est héritable au cours de la mitose et de la méiose. Néanmoins lorsque qu'elle est artificiellement ciblée à un site ectopique, elle est soumise à un retrait actif assurant qu'aucune transmission non autorisée n'ait lieu (Audergon et al., 2015).

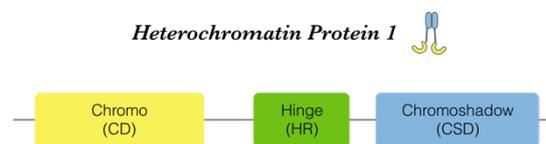
#### **Le rôle d'H3K9me3 au régions d'hétérochromatine constitutive**

Le mécanisme d'action de H3K9me2/me3 est lié à sa capacité à recruter des protéines qui contiennent un *chromodomain* comme HP1. Ces acteurs condensent et propagent ensuite les régions hétérochromatiques. Un lien important existe aussi entre l'enrichissement en H3K9me3 aux régions péri-centriques murines et la méthylation de l'ADN. Dans les cellules souches embryonnaires murines, KMT1A/B et la marque H3K9me3 sont nécessaires à la méthylation de l'ADN via le recrutement de DNMT3B aux régions péri-centriques. Cependant, le KO de DNMT1 ou DNMT3A/B n'a pas d'impact sur l'enrichissement en H3K9me3 aux régions péri-centriques. Ce cross-talk entre la marque H3K9me3 et la méthylation de l'ADN se fait via le recrutement de la protéine HP1 (Lehnertz et al., 2003). Ces données suggèrent que la marque H3K9me3 est le signal à l'origine de la mise en place d'hétérochromatine. C'est également la triméthylation d'H3K9 qui est à l'origine du dépôt des autres marques de l'hétérochromatine péri-centrique H4K20me3 et H3K64me3, renforçant l'impact d'H3K9me3 au moins chez la souris. Cette synergie se fait notamment par l'intermédiaire d'HP1, capable de recruter d'autres facteurs tels que les KMT qui catalysent H4K20me3 (Hahn et al., 2013; Schotta et al., 2002).

### 2.3. Les protéines HP1

Les protéines HP1, pour *Heterochromatin Protéin 1*, sont de petites protéines non-histones d'environ 25KDa (Dalton) impliquées dans le remodelage de la chromatine. Comme leur nom l'indique elles sont préférentiellement localisées à l'hétérochromatine, plus particulièrement aux régions péricentriques. C'est chez *Drosophila melanogaster* que les protéines HP1 et leur fonction majeure a été découverte pour la première fois. Observée par immunofluorescence au niveau des régions hétérochromatiques, HP1 a été identifiée comme un suppresseur dominant du PEV (Eissenberg & Elgin, 2000). Les protéines HP1 permettent le maintien et la propagation d'un état répressif de la chromatine via la reconnaissance des résidus H3K9me2/3 (Bannister et al., 2001). Chez la drosophile, toutes les doubles mutations récessives de cette famille ont des conséquences létales.

A l'exception de *S.Cereviae* qui ne possède ni HP1, ni région péricentrique, tous les eucaryotes expriment des protéines HP1 très conservées. Plusieurs membres sont présents dans chaque espèce eucaryote de *S.Pombe* à l'Homme (Clark et al., 1992; Lomberk et al., 2006). Deux isoformes sont retrouvés chez *S.Pombe* : *switching 6* (Swi6) et *Chromodomain-containing protein 2* (Chp2), cinq chez *Drosophila melanogaster* : HP1a à HP1e, et trois chez les vertébrés : HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  et HP1 $\gamma$ .



**Fig 1.22. Les domaines protéiques des facteurs la famille HP1.** Toutes les isoformes d'HP1 comportent un chromodomain (CD) et un chromoshadowdomain (CSD) reliés par une région Hinge (HR). (D'après Eissenberg et al., 2002).

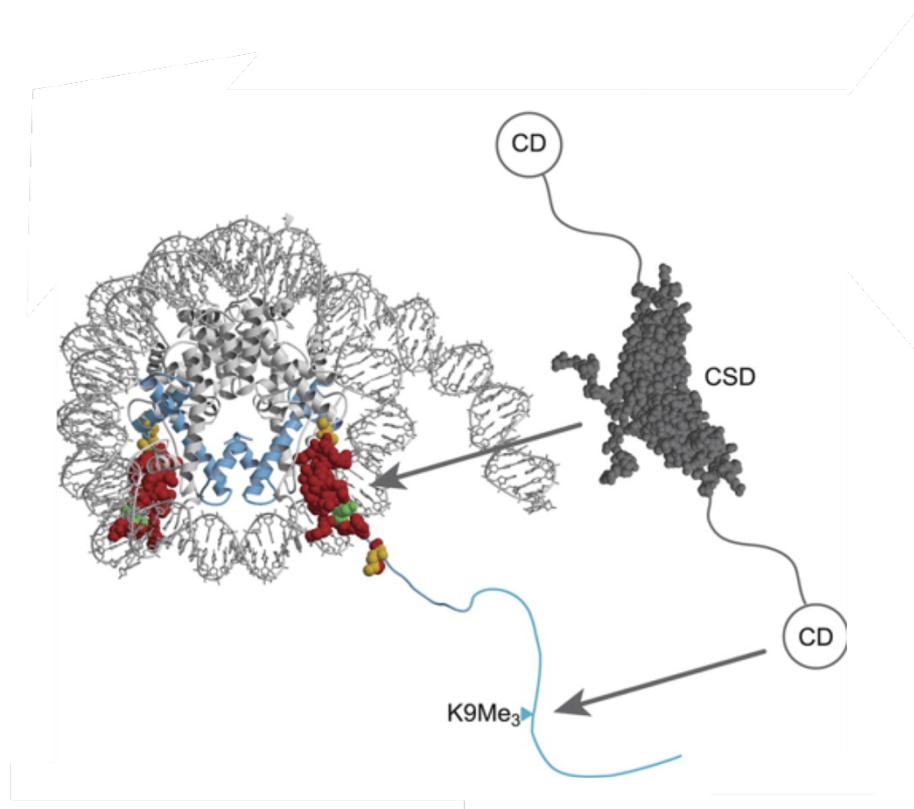
Toutes les isoformes d'HP1 possèdent en N-ter un *chromodomain* (CD) et en C-ter un *chromoshadow domain* (CSD). Ces domaines sont reliés par une séquence plus ou moins divergente : la *hinge region* (HR) [Fig1.22]. Le CD et le CSD sont très conservés inter- et intra-espèces : entre les protéines HP1 $\alpha$  et HP1 $\gamma$  humains on constate respectivement 71% et 87% d'homologie, malgré des différences de fonctions importantes. Cependant ces petites différences semblent suffisantes pour modifier leur fonction puisque des mutations ponctuelles au sein du CSD conduisent à des changements dans la spécificité des ligands ciblés. Néanmoins le CD présent dans le HP1 $\beta$  murin peut remplacer celui de la levure Swi6, sans en modifier la fonction

(Wang et al., 2000). Ces domaines sont reliés par une séquence plus ou moins divergente : la *hinge region* (HR).

Le CD est nécessaire et suffisant à la reconnaissance des résidus modifiés H3K9me2/3 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Le CSD permet les interactions entre les protéines HPI et de nombreuses autres protéines. Le domaine HR régule l'interaction des protéines HPI avec les acides nucléiques.

### La liaison d'HPI à H3K9me

La localisation d'HPI $\alpha$  et HPI $\beta$  aux régions péri-centriques est directement dépendante de la présence d'H3K9me3. En effet une délétion de l'HKMT responsable de H3K9me3/2 conduit à la perte de la localisation péri-centrique de ces protéines hétérochromatiques quelle que soit l'espèce. Ces protéines sont très peu localisées aux centromères puisqu'elles se lient à la marque H3K9me2/3 très peu présente dans ces régions dont les nucléosomes sont majoritairement constitués du variant CENP-A de l'histone H3 (Bannister et al., 2001; Peters et al., 2001; Schotta et al., 2002).



**Fig 1.23. Représentation structurelle de la liaison de la protéine HPI $\alpha$  au nucléosome.** Représentation schématisée d'HPI $\alpha$  (en gris à droite) dont le domaine CD interagit avec la lysine 9 triméthylée de H3 (flèche bleue), le domaine CSD interagit avec le domaine globulaire d'H3 (rouge) via l'H3Y41 (vert) au sein du nucléosome (à gauche). (D'après Richart et al., 2012).

La liaison des protéines HPI à H3K9me3 est régulée par des propriétés intrinsèques et extrinsèques à ces facteurs. Pour commencer, tous les domaines d'HPI jouent un rôle dans son affinité pour l'histone H3 triméthylé : chez *S.Pombe*, l'interaction de Swi6 avec la marque H3K9me3 se fait à l'interface entre deux domaines CD (Canzio et al., 2011). Mais l'étude de la liaison d'HPI *in vitro* sur des nucléosomes reconstitués contenant des H3K9me3 souligne également l'importance des domaines HR et CSD dans la sélection des nucléosomes composés d'H3K9me3 (Mishima et al., 2013). Ainsi, une mutation au sein du domaine CSD peut conduire à une augmentation de l'affinité de la protéine HPI $\alpha$  pour des nucléosomes non-méthylés. Cette interaction entre le CSD et le domaine globulaire de H3 a été caractérisé par *résonance magnétique nucléaire* (RMN) [Fig1.23] (Richart et al., 2012). La régulation de l'interaction avec H3K9me3 se fait également par le troisième domaine de HPI, le HR. Son interaction avec H3K9me3 semble dépendre de son extrémité N-ter ou C-ter qui auraient des effets inverses, l'une augmentant l'affinité de la protéine HPI $\alpha$  pour les nucléosomes H3K9me3, l'autre l'augmentant pour les nucléosomes non méthylés.

Mais l'affinité des protéines HPI pour H3K9me3 peut également être modulée par des modifications post-traductionnelles. Les HPI $\alpha$  murines et humaines sont notamment la cible de plusieurs phosphorylations côté N-ter, de S11 à S14, qui augmentent de plus de 5 fois son affinité pour les nucléosomes composés d'H3K9me2/3 (Hiragami-Hamada et al., 2011).

Cette phosphorylation est nécessaire à la bonne localisation d'HPI $\alpha$  à l'hétérochromatine *in vivo*, mais n'existe pas pour HPI $\beta$  et HPI $\gamma$  qui possèdent d'autres résidus à cette emplacement. Tout comme chez la levure où cette région est composée de résidus qui stabilisent l'interaction avec H3K9me3 sans nécessité d'être modifiés (Canzio et al., 2013).

Le recrutement de HPI aux régions péri-centriques peut également être régulé par des modifications du *code histone* qui empêchent le recrutement d'HPI à H3K9me3. Par exemple ce recrutement est diminué au moment de la mitose par H3S10P et H3K14ac (Fischle et al., 2005; Mateescu et al., 2004), par les phosphorylations d'H3T45 et H3S57 (Jazebi et al., 2014a), ou encore par la phosphorylation de la tyrosine 41 de l'histone H3 et la citrullination de H3R8 (Dawson et al., 2009; Sharma et al., 2012). Certaines protéines HPI sont également localisées au niveau de régions dépourvues d'H3K9me3, ce qui pourrait être en partie expliqué par la capacité du CD d'HPI à lier H1.4K26 méthylé. Comme précédemment, cette interaction peut être inhibée, dans ce cas par la phosphorylation de la serine 27 d'H1.4 (Daujat et al., 2005).

Enfin, la liaison d'HPI à H3K9me3 est verrouillée par son interaction avec la sumoylase SENP-7, rendant l'interaction à l'hétérochromatine péricentrique très stable (Romeo et al., 2015).

### La liaison d'HPI aux acides nucléiques

Les protéines HPI ont également la capacité d'interagir avec les acides nucléiques, sans spécificité pour une séquence particulière, grâce aux résidus basiques de leur domaine *Hinge*. Des expériences *in vitro* montrent que cette affinité est néanmoins plus importante pour l'ARN que pour l'ADN (Meehan et al., 2003). Cette capacité de liaison permet notamment l'enrichissement d'HPI à l'hétérochromatine péricentrique (Muchardt et al., 2002). Chez *Mus Musculus*, des traitements qui conduisent à la dégradation d'ARN induisent entre autres la perte d'HPI hétérochromatique (Maison et al., 2002; Santenard et al., 2010). Mais la liaison d'HPI aux ARN péricentriques semble également entrer en compétition avec les résidus H3K9me3 vis à vis de leur liaison au chromodomain d'HPI, transcrits qu'HPI conduit à la dégradation. Cette compétition expliquerait la nature très dynamique de l'interaction entre HPI et les résidus H3K9me3 observée (Keller et al., 2012).

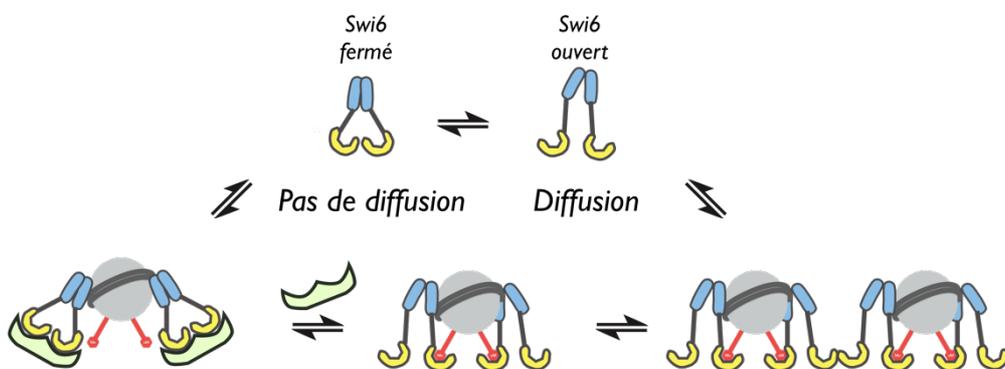
Enfin, les protéines HPI chez *S.Pombe* comme *mus musculus* sont modifiées post-traductionnellement par des groupements SUMO (Maison et al., 2011; Shin et al., 2005). Dans les cellules murines, la sumoylation d'HPI $\alpha$  permet son interaction avec des transcrits hétérochromatiques. Elle est également essentielle à localisation *de novo* d'HPI $\alpha$  aux régions péricentriques. Dans le cas de *S.Pombe*, Swi6 et Chp2 sont toutes deux sumoylées dans leurs domaine CD, ce qui aide à leur activité répressive.

### Condensation de la chromatine

- Chez *S.Pombe*

Chez la levure, le facteur HPI a la capacité de polymériser et de condenser la chromatine ce qui dépend à la fois de l'arrangement des nucléosomes et de la méthylation des histones. En effet la diffusion de Swi6 le long de la chromatine est structurellement couplée à sa reconnaissance de H3K9me3. Comme l'interaction de Swi6 avec la marque H3K9me3 se fait à l'interface entre deux domaines CD, ceci lui permet de former des tétramères sur les nucléosomes. La répression transcriptionnelle et la propagation de l'hétérochromatine *in vivo* augmente quand l'interaction entre deux domaines CD est renforcée (Canzio et al., 2011). L'oligomérisation de la chromatine

est également permise par un changement de conformation de la protéine Swi6 d'un état auto-inhibé vers un état compétent. L'état auto-inhibé est induit par une boucle du CD très ressemblante au peptide de H3 contenant K9 méthylé. En solution, cette boucle est en effet suffisante pour induire l'interaction de deux domaines CD. C'est la liaison de Swi6 à H3K9me3 et à l'ADN nucléosomal qui engendre un changement de conformation de l'homodimère Swi6 vers un état compétent. Le domaine CD libre peut ainsi s'associer avec une autre marque H3K9me2 ou un autre domaine CD et donc polymériser [Fig1.24]. Bloquer le changement de conformation de Swi6 résulte en une inhibition *in vivo* de l'assemblage de l'hétérochromatine et de sa propagation (Canzio et al., 2013).



**Fig 1.24. HPI peut adopter différentes conformations, ce qui régule sa capacité à propager l'hétérochromatine.** Représentation schématique de dimères de Swi6 (CSD en bleu, CD en jaune), dans une conformation ouverte (droite) capable de propager l'hétérochromatine ou dans une conformation fermée (gauche) qui limite la propagation de l'hétérochromatine. Les conformations ouvertes comme fermées peuvent être stabilisées par des interactions protéiques. (D'après Canzio et al., 2014).

- Chez les eucaryotes supérieurs

Contrairement à ce qui est observé chez *S.Pombe*, les domaine CD de la protéine HPI $\beta$  humaine ne semblent pas interagir entre eux. En effet la séquence présente sur la boucle du domaine CD à l'origine du *mime* de l'histone H3K9 qui, comme décrit précédemment, entre en compétition avec H3K9 pour un autre facteur HPI, ne semble pas conservée. Il reste tout de même quelques résidus (RK) présents cette boucle CD de *S.Pombe* qui sont conservés chez les mammifères, mais le reste de la séquence est dégénérée. Néanmoins une carte des modifications post-traductionnelles d'HPI, réalisée par des analyses en spectroscopie de masse, montre justement que ces résidus sont modifiés post-traductionnellement chez l'Homme (LeRoy et al., 2009). Ces

modifications pourraient jouer le même rôle que la boucle CD originale présente chez l'isoforme d'HPI de *S.Pombe*. Il est donc à ce jour difficile de dire si ce mécanisme est conservé chez les eucaryotes supérieurs. Quoiqu'il en soit ces modifications pourraient tout de même permettre de réguler la liaison à la chromatine et l'oligomérisation des protéines HPI. HPI $\gamma$  qui est le moins associé à l'hétérochromatine ne possède d'ailleurs pas ces résidus (*pour revue* : Canzio et al., 2014).

La visualisation de fibres chromatinienne +/- H3K9me/3 +/- HPI $\alpha$  en microscopie électronique montre également que le HPI $\alpha$  humain a un rôle important dans les interactions inter-nucléosomales via son CD et son CSD, pas via son *Hinge*. *In vivo*, chez la drosophile, HPI $\alpha$  peut ainsi engendrer des interactions longues distance entre les chromosomes (Azzaz et al., 2014).

### Interactions protéine-protéine et propagation de l'hétérochromatine

Les protéines HPI ont également la capacité d'interagir avec un grand nombre d'autres partenaires par l'intermédiaire de leur domaine CSD. La structure de ce domaine nécessite qu'un dimère d'HPI soit formé, également via le domaine CSD, ce qui résulte en la formation d'une poche hydrophobe capable de reconnaître chez ses partenaires le motif protéique PxVxL (Brasher et al., 2000).

Via son CSD HPI interagit également avec beaucoup de protéines capables d'induire une répression transcriptionnelle et permettant la formation de territoires répressifs dépourvus d'ARN PolIII. Dont des HKMT comme les KMT1A/B décrites précédemment ou SUV420H2, une KMT méthylant la lysine du résidu H4K20, marque spécifique de l'hétérochromatine constitutive péricentrique (Souza et al., 2009). Mais aussi des HDAC comme HDAC2 et HDAC3, des DNMT dont DNMT3 ou encore des protéines chaperons d'histones dont HIRA, augmentant ainsi l'occupation de l'ADN par les nucléosomes (Yamane et al., 2011). Des protéines comme la cohésine ou des facteurs répresseurs comme pRB sont également impliqués (Nonaka et al., 2002). Chez *S.Pombe*, Chp2 s'associe à des complexes d'HDAC comme SHREC *Snf2/Hdac-containing Repressor Complex*, ce qui induit la déacétylation d'H3K14 et limite l'accès de l'ARN polIII. Swi6 induit quant à lui la répression via les mécanismes dépendants du RNAi dans lesquels les transcrits guident les répresseurs vers leurs *loci* de transcription, mais aussi par le recrutement de Cl4, pour *cryptic loci regulator 4*, qui méthyle le résidu H3K9 (Motamedi et al., 2008). La coopération de toutes ces enzymes consolide la répression de la chromatine et sa compaction. La liaison d'HPI au domaine globulaire d'H3 entre également en compétition avec la liaison du facteur de remodelage SWI/SNF (Lavigne et al., 2009).

Chez les mammifères, l'interaction des protéines HPI avec les KMT1A/B par le CSD conduit à la méthylation active des régions à proximité de celles déjà ciblées par HPI. Chez *S.Pombe* cette propagation se fait également d'un *locus* à un autre, comme des centromères aux *mating types* (Volpe et al., 2002). L'hétérochromatine se propage donc le long des régions d'ADN jusqu'à la rencontre de barrières comme les protéines *insulator* ou des séquences génomiques particulières (Scott et al., 2006).

### **Rôle au niveau des régions péri-centriques et du cycle cellulaire**

La dynamique et la localisation des protéines HPI varie au cours de la mitose. Chez l'Homme, HPI  $\beta$  est quasiment totalement délocalisé des chromosomes mitotiques, tandis qu'HPI  $\alpha$  ne reste alors que très faiblement associé à leurs régions péri-centriques (Hayakawa et al., 2003). Cette dynamique est associée à d'autres modifications post-traductionnelles des histones, dont la phosphorylation d'H3S10, qui diminue l'affinité d'HPI pour H3K9me3. La déplétion de la kinase responsable de cette phosphorylation, Aurora B, conduit au maintien des protéines HPI sur les chromosomes mitotiques (Hirota, Lipp, Toh, & Peters, 2005).

Les protéines HPI ne sont globalement pas associées à des pathologies, mais leur faible niveau d'expression est corrélé à la progression tumorale et à un mauvais pronostic dans la plupart des types de cancers (Maloney et al., 2007). Le facteur HPI  $\alpha$  est notamment considéré comme un facteur suppresseur de métastase. Dans le cas du cancer du sein, HPI  $\alpha$  régule l'invasion des cellules tumorales (Lee & Ann, 2015; Vad-Nielsen et al., 2015). Sa faible expression est associée aux cellules hautement invasives (Kirschmann et al., 2000). Comparé à des tumeurs primitives du colon, son niveau d'expression diminue de plus de 95% dans les cancers du sein invasifs. *In vitro*, sa diminution augmente la capacité métastatique des cellules de près de 50% tandis que sa surexpression la diminue de près de 30%.

### **III- La mise en place et le maintien de la structure hétérochromatique des régions péri-centriques**

#### **1. La mise en place et le maintien de l'hétérochromatine péri-centrique**

Dans les cellules somatiques humaines, l'hétérochromatine péri-centrique est réprimée via l'action de la marque H3K9me3 et des protéines HPI. Ces deux acteurs consolident leur impact sur la chromatine en agissant de concert avec d'autres cascades épigénétiques et ce entre autres via les marques H3K20me3, H3K64me3 et la méthylation de l'ADN (Lange et al., 2013). Les régions péri-centriques sont ainsi maintenues dans un territoire répressif. Mais quel est le premier événement qui détermine l'état chromatinien d'une région d'ADN ? et comment cet état est-il maintenu au cours des divisions cellulaires ? Pour essayer de mieux comprendre ces mécanismes, nous nous intéresserons à deux modèles d'étude : la formation et le maintien de l'hétérochromatine péri-centrique de *S.Pombe* et *Mus Musculus*. Nous nous tournerons d'abord vers les séquences génomiques des régions d'intérêt puis vers les mécanismes connus aujourd'hui.

##### **1.1. L'évolution des régions centromériques et péri-centriques**

Si l'organisation épigénétique des centromères et des régions péri-centriques ainsi que leur fonction dans l'assemblage du kinétochore et la ségrégation de chromatides sœurs sont très conservées au cours de l'évolution, les séquences génomiques sont, elles, très polymorphiques. Seule la conservation d'un motif répété, et riche en A/T pour les centromères, témoigne d'une conservation inter-espèces. Ce paragraphe se concentre sur l'évolution de la structure des centromères et des régions péri-centriques chez les eucaryotes [Fig1.25].

- L'exception eucaryote : *S.Cereviae*

La seule espèce pour laquelle la mise en place du kinétochore est dépendante de la séquence génomique est *S.Cerevisiae*. Pour les autres espèces la mise en place du kinétochore dépend de la structure épigénétique. *S.Cerevisiae* possède une séquence centromérique de 125pb constituée de 3 éléments : Cdel, Cdell et Cdelll. Cdel et Cdelll sont des palindromes imparfaits extrêmement conservés au sein des 16 chromosomes. Une mutation ponctuelle de l'un ou l'autre conduit à des défauts de ségrégation des chromosomes. Cdell n'a pas de séquence conservée mais composée

à plus de 90% de bases azotées A/T et une sa longueur est toujours la même. C'est à cette région que s'associent les variants d'histone centromériques : les homologues de CENP-A et CENP-C. Sa délétion entraîne également des défauts de ségrégation des chromosomes. Même si la chromatine qui flanque les centromères de *S.Cereviae* sur 600pb est compacte, résistante aux nucléases et importante pour la ségrégation des chromosomes mitotiques, elle n'est pas hétérochromatique et n'est pas, par conséquent, considérée comme des régions péri-centriques. Aucune protéine HPI n'a d 'ailleurs été identifiée dans cet organisme.

De *S.Pombe* à l'Homme, les centromères sont flanqués de régions d'hétérochromatine constitutive péri-centrique.

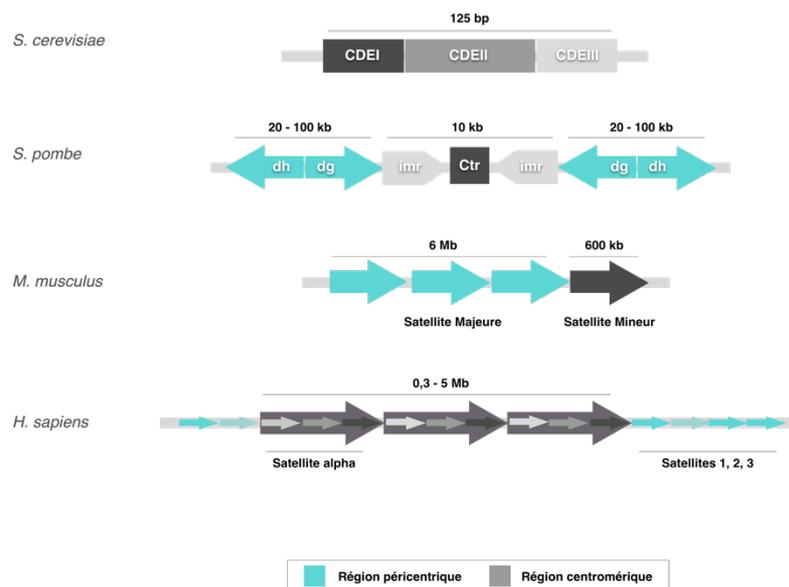


Fig 1.25. Evolution de la composition des centromères et des régions péri-centriques de *S.Pombe* à l'Homme. (D'après Allshire et al., 2009).

- *S.Pombe*

*S.Pombe* possède trois chromosomes avec des séquences centromériques et péri-centromériques de tailles variables : 35Kb, 65Kb et 110Kb. Les centromères appelés *central core region* contiennent deux éléments distincts : le centre de 4Kb, riche en AT mais ni répété ni conservé, entouré des *innermost repeats* (imr) qui sont des répétitions inversées d'une longueur de 6Kb spécifiques à chaque centromère. Le variant centromérique CenH3 se fixe sur toute cette région

centromérique permettant la liaison du fuseau mitotique et la fonction des centromères. Comme chez tous les autres eucaryotes, cette région centromérique est flanquée d'une région péri-centromérique composée de séquences répétées. Nommées *outer repeats*, ce sont des séquences répétées inversées dg/dh de 4,4 à 4,8Kb disposées tête bêche, en symétrie par rapport aux centromères. Le nombre de répétitions varie d'un chromosome à l'autre mais une très forte homologie de séquence existe entre les répétitions dg (99%) ou dh (80%). Ces séquences sont importantes pour le maintien de la cohésion des chromatides sœurs.

Des résultats récents montrent cependant que l'incorporation de CENP-A, nécessaire et suffisante à l'identité des centromères, est séquence-spécifique (Catania, Pidoux, & Allshire, 2015).

#### - *Mus Musculus*

*Mus Musculus* possède deux types de séquences répétées au niveau des régions centromériques et péri-centromériques, respectivement les *Satellites mineures* (SATmin) et les *Satellites majeures* (SATmaj). Les SATmin sont des répétitions multiples d'un motif de 120 pb riche en A/T sur plus de 600Kb. Les SATmaj sont également les répétitions d'un motif riche en A/T, de 234pb, sur plus de 6Mb. Elles représentent 3% du génome murin.

Les chromosomes de *Mus Musculus* sont dits acrocentriques, c'est-à-dire que le centromère est localisé près d'une extrémité du chromosome. Les régions péri-centriques se situent de l'autre côté du centromère.

#### - L'Homme

Comme vu précédemment, les centromères et les régions péri-centriques humaines ne sont pas composés par les mêmes séquences répétées. Les  $\alpha$ -SAT composent les centromères, les séquences de type SATI, SATII, SATIII et  $\beta$ -SAT composent les régions péri-centriques.

Les séquences  $\alpha$ -SAT ont deux façons d'être organisées, de type I et de type II. Seules les  $\alpha$ -SAT de type I ont la capacité de former des chromosomes artificiels fonctionnels. Ces deux types de séquences n'entraînent pas le recrutement des mêmes variants d'histone : alors que CENP-A est localisé aux séquences  $\alpha$ -SAT de type I, le variant CENP-B se lie uniquement aux  $\alpha$ -SAT de type II qui contiennent la CENPB Box (Schueler & Sullivan, 2006).

## 1.2. Le modèle de *S.Pombe*

Comment se fait la mise en place spécifique de l'hétérochromatine *de novo* ? Deux grands mécanismes sont proposés pour la reconnaissance des régions à réprimer : le premier via des protéines, le second via des ARN. Ils recruteraient HPI et/ou une des enzymes nécessaires à l'initiation d'une cascade permettant la formation d'hétérochromatine.

Chez *S.Pombe* comme chez les plantes des mécanismes impliquant les macheries RNAi existent. (pour revue : Castel & Martienssen, 2013).

### La mise en place de l'hétérochromatine constitutive péricentrique

Chez *S.Pombe*, l'hétérochromatine centromérique et péricentrique nécessitent d'être constamment réprimées. Ce qui implique les *machineries RNA interference* (RNAi) et des facteurs de remodelage de la chromatine (Allshire et al., 2015; Motamedi et al., 2008). Les éléments nécessaires au maintien de l'hétérochromatine péricentrique ont d'abord été identifiés dans l'étude de la régulation du *mating tape*, une autre région hétérochromatique. Ces *loci* sont des régions dont la répression épigénétique contrôle le genre (+) ou (-) des levures. L'information génétique du genre (+) est contenue au *locus mat2-P*, celle du genre (-) au *locus mat3-M*. C'est le *locus mat1* actif, qui recombine après la mitose soit avec le locus *mat2-P*, soit avec le locus *mat3-M*, qui détermine le genre. Le criblage de mutants qui ont une expression anormale des *loci mat* a permis l'identification d'acteurs de la répression épigénétique. Parmi eux ont été identifiés (i) Clr6 et les membres du complexe SHREC contenant les KMT Clr2 et Clr3 et une HDAC impliquée dans la déacétylation de H3K14 ; (ii) Clr4 (KMT1A/B) la KMT qui catalyse H3K9me3 (Allshire & Ekwall, 2015) ; (iii) Swi6, la protéine homologue d'HPI ; (iv) des protéines du complexe RITS (*RNA-induced transcriptional silencing*) comme l'argonaute Ago1.

Par la suite, les protéines Clr ont été les premières corrélées à l'assemblage de l'hétérochromatine aux régions péricentriques. Les autres ont suivi. Les données de la littérature indiquent désormais que la répression des centromères se fait via des facteurs de remodelage de la chromatine, en particulier Clr4 et la marque épigénétique H3K9me3, Swi6, et les machineries RNAi et l'ARN PolIII [Fig 1.26]. Les mêmes mécanismes sont conservés dans les eucaryotes supérieurs (excepté pour le RNAi retrouvé jusqu'à maintenant que chez les végétaux). La méthylation de l'ADN, pourtant très présente chez beaucoup d'eucaryotes n'est, elle, pas observée chez *S.Pombe*.

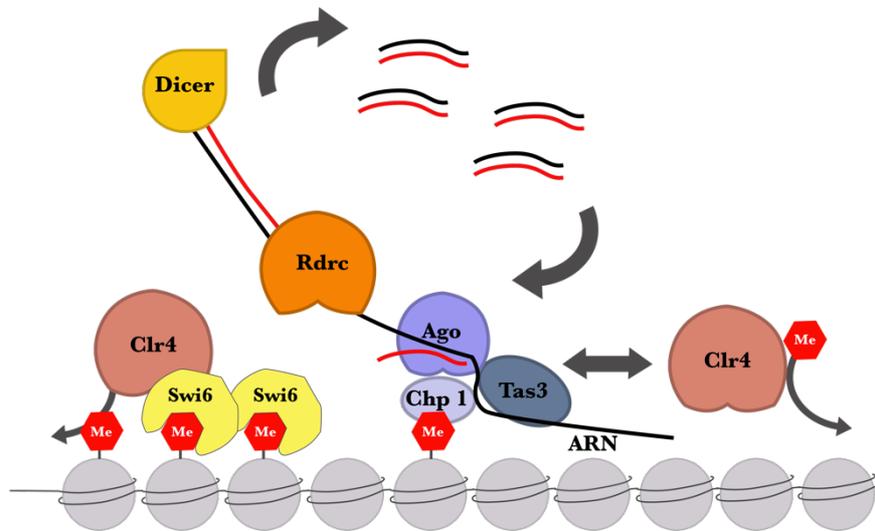


Fig 1.26. Formation de l'hétérochromatine péricentrique chez *S.Pombe*. Les composants essentiels : les ARN péricentriques qui guident la machinerie RITS (Ago1, Tas3, Chp1) vers les régions péricentriques, Rdrc qui génère des ARNdb et DICER qui les mature. Clr4 méthyle H3K9me3, créant une plateforme pour les protéines à chromodomain dont Swi6 et chp1 (D'après Castel et al., 2013).

- Le rôle de la machinerie RNAi

Les ARN hétérochromatiques peuvent également servir de plateforme pour le recrutement des facteurs hétérochromatiques, permettant ainsi un ciblage à partir des régions génomiques (Iida et al., 2008). Le processus de *RNA-interférent* (RNAi) conduit à la dégradation de transcrits via une expression d'ARN double-brin. Ce mécanisme conduit également à une répression transcriptionnelle ou *transcriptional gene silencing* (TGS). De longs ARN double-brins péricentriques transcrits par l'ARN PolII et transformés en de petits fragments d'ARN sont pris en charge par des effecteurs comme Dicer (Dcr1) (Bühler et al., 2006). Ils guident une répression transcriptionnelle, via une modification des histones, aux *loci* dont ils proviennent. Mais aussi guident la machinerie RNAi vers les transcrits homologues. L'ARN PolII a également un rôle dans le couplage de la transcription et des mécanismes de TGS. En effet son inhibition conduit à la perte d'H3K9me2 et de la répression transcriptionnelle des régions péricentriques.

Un deuxième complexe : *RNA-directed RNA polymerase complex* (RDRC) amplifie l'effet du TGS en générant de plus longs ARNnc double-brins via la *RNA-directed RNA polymerase I* (Rdp1) et les transcrits pris en charge par RITS. Les facteurs de remodelage de la chromatine dont le complexe *Clr4-Rik1-Cul4* (CLRC) et SHREC sont également recrutés et entraînent l'enrichissement en H3K9me3. Les protéines à chromodomain Clr4, Swi6 et Chp2 peuvent ensuite jouer leur rôle en propageant et condensant l'hétérochromatine (Fischer et al., 2009).

- Le rôle des complexes de remodelage

Chaque facteur de remodelage a un rôle bien défini : l'hypoacétylation des histones est un prérequis à l'assemblage de l'hétérochromatine. Elle est catalysée par des HDACs dont le membre du complexe SHREC Clr3. Il s'en suit la triméthylation d'H3K9 par Clr4, permettant le recrutement des protéines à *chromodomain* : Swi6, Chp1, Chp2 mais aussi Clr4. Elle-même membre du complexe CLRC, elle peut catalyser la méthylation des résidu H3K9 adjacents. Par les mécanismes décrits précédemment, Swi6 propage l'hétérochromatine et induit sa condensation en oligomérisant. Une autre protéine à chromodomain, Chp1, s'associe à H3K9me3 au niveau des régions péri-centriques. Cette protéine également capable de s'associer aux transcrits via son domaine CD est un membre du complexe *RNA-induced transcriptional silencing* (RITS), nécessaire à la composition des régions péri-centriques en H3K9me3 (Ishida et al., 2012). Ces mécanismes peuvent être inhibés par la marque H3K4ac qui diminue l'affinité de Clr4 et Chp1 pour la marque H3K9me3, ce qui a notamment lieu au cours du cycle cellulaire, rendant l'hétérochromatine beaucoup plus dynamique. En plus de son affinité pour H3K9me3, la protéine Swi6 se lie aux ARN hétérochromatiques via son domaine HR et entraîne leur dégradation (Keller et al., 2012). Ce n'est pas un mécanisme nécessaire à la structure des régions péri-centriques, au contraire il résulte en une plus grande dynamique de la protéine Swi6.

### **Le maintien de l'hétérochromatine constitutive péri-centrique**

L'état hétérochromatique des régions péri-centriques doit être maintenu au cours des divisions cellulaires. L'hétérochromatine péri-centrique suit un cycle dynamique au cours des divisions cellulaires. La phosphorylation de H3S10 en phase de Mitose entraîne la perte de Swi6 à l'hétérochromatine péri-centrique (Chen et al., 2008), marque qui se remet en place au moment de la réplication en phase S. A l'instar de sa mise en place, le maintien de l'hétérochromatine péri-centrique implique la présence de transcrits péri-centriques et la machinerie du RNAi. La décondensation de l'hétérochromatine au moment de la réplication de l'ADN conduit à un pic de transcription des régions péri-centriques via l'ARN PolII. Un long transcrit péri-centrique naissant servirait alors de plateforme de recrutement pour les siRNA et les machineries RNAi RITS et RDCC. Ce mécanisme dynamique éviterait notamment des collusions entre l'ADN POL et l'ARN POLII et des phénomènes de recombinaison homologue.

### 1.3. L'exemple des mammifères

Les différentes marques épigénétiques caractéristiques de l'hétérochromatine péricentrique sont déposées séquentiellement sur la chromatine. L'enrichissement en H3K20me3, H3K64me3 tout comme en 5mC sont dépendants de la présence de la marque H3K9me3 [Fig 1.28]. C'est également cette marque qui forme une plateforme pour le recrutement stable des protéines HPI. Un certain nombre de questions concernant la formation de l'hétérochromatine péricentrique sont encore sans réponses. Notamment comment la marque H3K9me3 se met en place au début du développement embryonnaire précoce ? Parmi toutes les marques H3K9me3 présentes dans le noyau, comment les protéines HPI identifient-elles également les régions péricentriques ?

Dans les cellules somatiques, l'hétérochromatine constitutive est déjà mise en place, seul son maintien et sa propagation peuvent donc être étudiés. Le développement embryonnaire précoce est la seule fenêtre temporelle où les mécanismes de formation *de novo* de l'hétérochromatine constitutive sont abordables. Nous commencerons par l'expliquer par une brève description du développement embryonnaire de *Mus Musculus* puis par celle des mécanismes moléculaires connus responsables de la mise en place de l'hétérochromatine constitutive péricentrique. Le maintien de l'hétérochromatine constitutive sera ensuite discuté chez *Mus Musculus* et chez l'Homme.

#### Le développement embryonnaire précoce de *Mus Musculus* [Fig 1.27] :

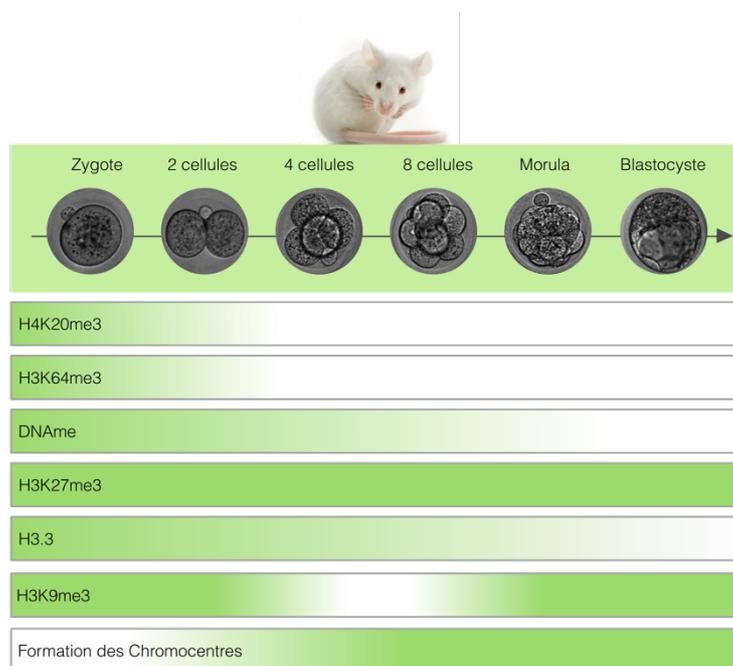


Fig 1.27. Développement embryonnaire précoce murin. Mise en place des marques de l'hétérochromatine constitutive aux régions péricentriques du génome paternel murin et formation des chromocentres (D'après Burton et al., 2014).

- De la fertilisation au stade zygote :

Juste après avoir été fertilisé par un spermatozoïde, l'oocyte entre dans une seconde division méiotique et forme un zygote totipotent. Cette cellule possède deux *pronuclei* haploïdes. Les génomes parentaux sont ainsi maintenus séparés jusqu'au stade 2 cellules. Les régions péricentriques du *pronucléus* mâle, plus large et décondensé, ne possèdent pas de marques épigénétique de l'hétérochromatine, mais sont déjà ciblées par HPI beta. Les régions péricentriques du *pronucléus* femelle organisées en anneaux périnucléolaires, possèdent des marques épigénétiques caractéristiques : H3K9me3, H4K20me3 et H3K64me3 et aussi la protéine HPI beta. La méthylation de l'ADN est elle aussi asymétrique, le génome paternel est hydroxyméthylé tandis que le génome maternel est méthylé (Probst et al., 2007). Des trois isoformes d'HPI, seule la protéine HPI  $\beta$  est présente.

- Du stade zygote au stade 2 cellules :

Une douzaine d'heures après la fertilisation, le zygote entre dans sa première division mitotique. Les régions péricentriques sont structurées en anneaux périnucléaires mais ne portent pas encore les marques épigénétiques caractéristiques. Les régions péricentriques maternelles perdent rapidement les marques H4K20me3 et H3K64me3 tandis que la marque H3K9me3 est diluée progressivement. Les régions paternelles ne possèdent toujours pas de marques de l'hétérochromatine constitutive péricentrique. Toutefois elles sont enrichies en H3K27me3 apportées par le complexe PCR1. Chaque cellule fille possède une copie du génome paternel et maternel, mais les génomes paternels et maternels restent encore séparés, chacun occupant une moitié de la surface disponible.

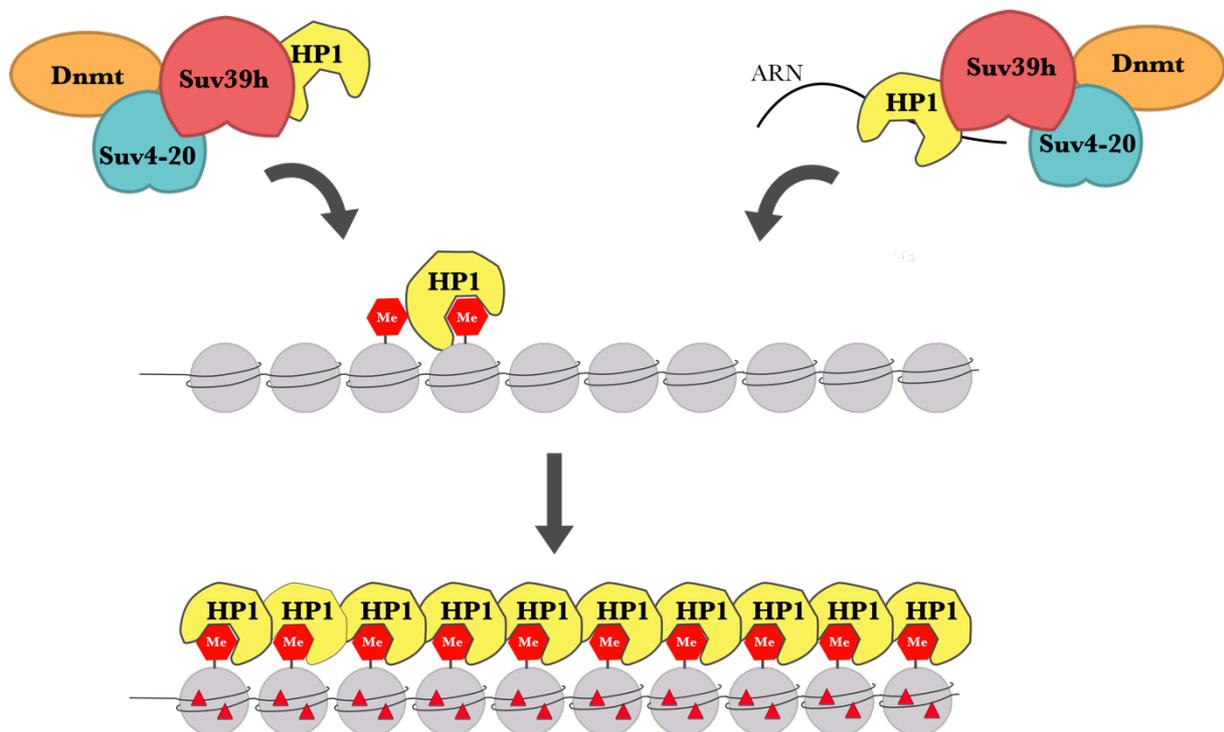
- Du stade 2 cellules au stade 16 cellules :

Des divisions successives ont lieu jusqu'à atteindre le stade blastocyste qui marque la fin du stade préimplantatoire. Seule H3K9me3 est encore présente, elle diminue progressivement jusqu'au stade 8 cellules puis augmente à nouveau à partir du stade 16 cellules. La méthylation de l'ADN diminue elle aussi excepté pour les régions soumises à l'empreinte génomique parentale. A partir du stade 4 cellules, l'hétérochromatine péricentrique commence à s'organiser sous la forme de chromocentres, structures nécessaires à la poursuite du développement embryonnaire (Jachowicz et al., 2013). Les derniers anneaux périnucléolaires disparaissent au stade 8 cellules. C'est également à ce stade que les régions péricentriques paternelles acquièrent le même statut

épigénétique que le génome maternel. Le blastocyste est composé de la masse cellulaire interne (ICM) et du trophoctoderme qui donneront respectivement l'embryon et le placenta (Fadloun et al., 2013).

**La formation de l'hétérochromatine péricentrique:**

En raison de l'absence de marques épigénétiques sur le génome paternel et de la complète réorganisation du génome maternel, le développement précoce, associé la formation des chromocentres est un modèle puissant pour comprendre les mécanismes moléculaires à la base de la formation de l'hétérochromatine constitutive péricentrique. Comme chez *S.Pombe*, ces mécanismes mettent en jeu des transcrits péricentriques et une protéine de la famille HP1. Au stade 2 cellules, une transcription orientée des régions SATmaj corrélée à l'enrichissement du variant d'histone H3.3 est essentielle à l'acquisition et à la consolidation, respectivement pour les génomes paternels et maternels, des marques caractéristiques de l'hétérochromatine constitutive péricentrique.



**Fig 1.28. Formation de l'hétérochromatine péricentrique chez les mammifères.** (gauche) Si la marque H3K9me3 est déjà présente au niveau des régions péricentriques, elle peut permettre le recrutement des protéines HP1, ce qui conduit à celui de Suv39h, de Dnmt et Suv4-20 et par conséquent à l'enrichissement ainsi qu'à la propagation des marques de l'hétérochromatine constitutive. (Droite) En l'absence de la marque H3K9me3, les protéines HP1 seraient guidées par les transcrits péricentriques et recruter Suv39h qui méthyle H3K9. Un site de liaison stable est ainsi créé pour HP1, Suv39h, Dnmt, Suv4-20 qui conduisent la méthylation de H4K20 et de l'ADN (D'après Castel et al., 2013).

Ces transcrits conduisent au recrutement de facteurs de remodelage comme HPI  $\beta$ , en parti via son domaine Hinge, qui peut réprimer, condenser et propager l'hétérochromatine aux régions péri-centriques malgré l'absence d'H3K9me3. Les autres marques (H3K20me3, H3K64me3, 5mC, ...) suivent l'apparition de H3K9me3 (Schotta et al., 2004). En l'absence de ce mécanisme, la structure des chromocentres ne se met pas en place et le développement embryonnaire s'arrête au stade 4 cellules (Jachowicz et al., 2013; Probst et al., 2010.). D'autres acteurs ont été identifiés à partir de ce modèle, dont des variants d'histone ou la protéine ATRX (pour  $\alpha$ -thalassemia mental retardation X-linked protein). La perte de ce facteur essentiel à la répression des SATmaj résulte entre autres en une augmentation des recombinaisons centromériques, des échanges de chromatides sœurs et en un grand nombre d'instabilités chromosomiques.

Le rôle de facteurs de transcription dans le recrutement d'HPI et la mise en place d'hétérochromatine est montrée pour divers promoteurs au cours de la différenciation cellulaire (Nielsen et al., 2001; Ryan et al., 1999). Or les séquences SATmin contiennent des motifs qui permettent l'association de plusieurs facteurs de transcription qui pourraient agir par les mêmes mécanismes. Ils sont exprimés en fonction du type cellulaire comme Gfi1b, Sall1, Zeb1, et les protéines de la famille Pax. Pax3 et Pax 9 contribuent à l'enrichissement en H3K9me3, à la répression transcriptionnelle ainsi que l'intégrité des régions péri-centriques. Leur délétion dans des fibroblastes embryonnaires conduit à leur dérégulation bidirectionnelle (Bulut-Karslioglu et al., 2012). Mais on ne sait pas s'il y a une interaction directe avec KMT1A ni quel est le mode d'action (Bulut-Karslioglu et al., 2012). Au sein des régions péri-centriques humaines, la présence de pentamères GC-riches, correspondant à des sites potentiels de liaison de facteurs de transcriptions, a également été mise en évidence dans une étude globale des séquences génomiques. Cette étude suggère que ces séquences permettraient de réguler spécifiquement la formation et le maintien de l'hétérochromatine péri-centrique (Wada et al., 2015).

### **Le maintien de l'hétérochromatine constitutive péri-centrique**

Le *complexe répresseur polycomb 1* (PRC1) associé à la répression transcriptionnelle de l'hétérochromatine facultative au cours du développement catalyse l'ubiquitination de l'histone H2A (H2Aub). Dans les cellules somatiques murines et humaines, mais pas dans les cellules souches embryonnaires, ce complexe est localisé aux régions péri-centriques où il stabilise leur répression. Il permet entre autres la localisation à l'hétérochromatine des protéines HPI, DEK1 et ATRx (Abdoh et al., 2015; De La Fuente et al., 2015). Le suppresseur de tumeur KLLN est

également impliqué dans le maintien de l'état hétérochromatique des régions péri-centriques. Localisé aux régions péri-centriques de cellules humaines cancéreuses, son KD induit la dérégulation des régions péri-centriques, tandis que sa surexpression entraîne l'augmentation de l'activité de KMT1A associée à un enrichissement global en H3K9me3 (Nizialek et al., 2015). D'autres encore, comme la SUMO-protéase SENP7 stabilisent la protéine HPI $\alpha$  aux régions péri-centriques, verrouillant l'hétérochromatine constitutive péri-centrique (Romeo et al., 2015).

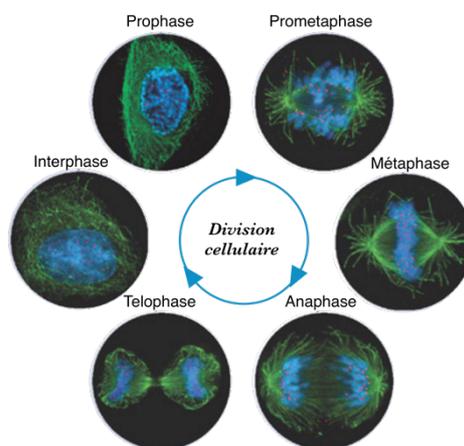
## 2. Garants de l'intégralité du génome

### 2.1. Les étapes clés de la division cellulaire

La division des cellules suit un cycle en quatre étapes : Une première phase de croissance (G1) suivie de la synthèse de l'ADN (phase S), d'une deuxième phase de croissance (G2) et de la division d'une cellule mère en deux cellules filles au moment de la Mitose (M).

#### La mitose

Au cours de la mitose, tous les chromosomes doivent être correctement reconnus et répartis dans les deux cellules filles afin de garantir que chacune d'elle possèdera la totalité de l'information génétique. Dans ce but les chromosomes sont condensés et ségrégués. Cette étape peut durer entre 1 heure et 4 heures et se déroule en cinq étapes majeures : La prophase, la prometaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase [Fig 1.29].



**Fig 1.29. La mitose.** L'ADN des cellules (bleu) suit un cycle de condensation et décondensation au fil des phases de la mitose. Un marquage de la tubuline permet de suivre les fuseaux mitotiques. (D'après Cheeseman et al., 2008).

Au moment de la prophase, la chromatine est compactée jusqu'au stade de chromosome métaphasique afin de faciliter la ségrégation de l'ADN. En parallèle le kinétochore s'assemble sur les centromères, c'est à la prométaphase qu'il s'associe aux microtubules. L'interaction entre les kinétochores et le fuseau mitotique est essentielle à l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale et à la ségrégation des chromosomes. A la métaphase, les chromosomes sont bi-orientés avec, pour chaque chromatide sœur, un kinétochore relié exclusivement à un des pôles du fuseau mitotique. Des *checkpoints* assurent que tous les chromosomes soient ciblés et correctement orientés permettant, lorsque les étapes de contrôles ont été validées, la séparation des chromatides sœurs vers un des pôles du fuseau mitotique. Pour finir, les chromosomes se décondensent au moment de la télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme et la cellule est sectionnée, générant deux cellules filles génétiquement identiques.

### La cohésion des chromatides sœurs

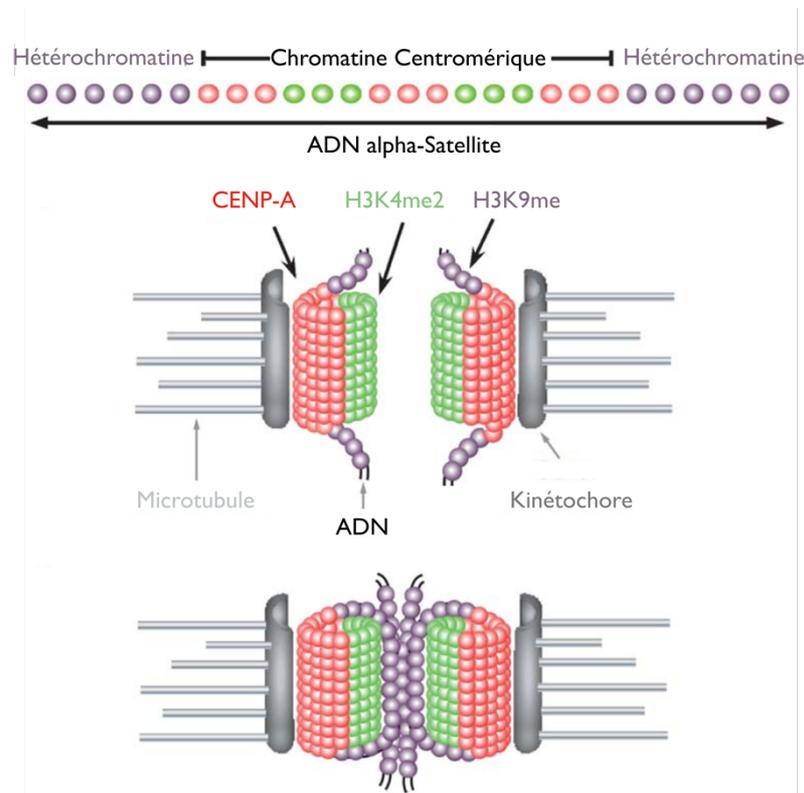
En sortie de phase S chaque chromosome est répliqué et possède deux chromatides identiques : les chromatides sœurs. A peine synthétisées, ces chromatides sont maintenues accrochées l'une à l'autre jusqu'à leur séparation au cours de la mitose : c'est la cohésion (Gerlich et al., 2006). C'est cette cohésion qui est la base du mécanisme moléculaire assurant que chaque cellule fille sera composée d'une chromatide de chaque chromosome après la mitose. Elle assure (i) que les fuseaux mitotiques reconnaissent chaque paire de chromosomes comme telle, (ii) que les forces exercées par les microtubules sur la chromatine conduisent à l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale, (iii) l'orientation bipolaire des chromatides sœurs sur les fuseaux mitotiques via une force opposée à celle des microtubules (Street, 2002).

Cette fonction est assurée par la cohésine qui est un complexe protéique en forme d'anneau composé de trois parties : les protéines Smc (pour *Structural Maintenance of Chromosomes*) 1 et 3 hétérodimérisées, reliées par la klésine (*du grec* : « *fermeture* ») Scc1. Le diamètre interne de cet anneau tripartite serait d'environ 35nm, soit suffisamment grand pour encercler deux fibres de 10nm, appartenant à deux chromatides sœurs, et les maintenir ensemble (Haering et al., 2008). Ce modèle est conforté par la résistance de l'interaction entre la cohésine et la chromatine malgré des conditions salines extrêmement stringentes, alors qu'une coupure de l'ADN par une *nucléase*, ou du complexe protéique par une *séparase*, entraîne la libération des cohésines (Oliveira et al., 2010 ; Uhlmann et al., 1999). Chez *S.Pombe*, le facteur de l'hétérochromatine constitutive Swi6 est également à l'origine de l'adressage de la cohésine aux régions péri-centriques. Ce facteur, comme son homologue chez la souris, entre directement en contact avec une des sous-unité de la

cohésine (Nonaka et al., 2002). En utilisant des chromosomes artificiels de drosophile constitués de longues régions hétérochromatiques distales aux centromères il a été confirmé que la structure hétérochromatique suffisait à induire un enrichissement en cohésine qui persiste au moment de la mitose, mais aussi à créer des points d'ancrages entre les chromatides sœurs (Oliveira et al., 2014).

## 2.2. La fonction des centromères et des régions péri-centromériques dans la mitose et la ségrégation des chromatides sœurs

### La fonction des centromères



**Fig 1.30. Structure des centromères chez l'Homme.** Organisation linéaire des centromères (haut) dont la condensation au moment de la métaphase (milieu) conduit à l'enrichissement en CENP-A vers le kinétochore. La structure de la chromatine conduit également à l'accumulation d'hétérochromatine entre les deux chromatides sœurs (bas) ce qui maintient leur cohésion jusqu'à l'anaphase. (D'après Schueler et al., 2006).

Le centromère est la constriction primaire d'un chromosome dont il joint les deux bras. Sa fonction fondamentale est de servir de plateforme d'assemblage au kinétochore : la structure protéique à laquelle s'attachent les microtubules au moment de la mitose pour tirer les

chromosomes vers chaque pôle de la cellule [Fig 1.30]. Les centromères et les kinétochores sont indispensables à la ségrégation des chromosomes. C'est le variant de l'histone H3 : CenH3, ou CENP-A chez l'Homme, qui définit l'identité des centromères. Il recrute d'autres protéines du kinétochore qui sont chez l'Homme CENP-C, CENP-C, CENP-H, CENP-I et Mis12. Ce complexe est présent aux centromères tout au long du cycle cellulaire. Au moment de la mitose il devient fonctionnel après recrutement d'autres protéines de *checkpoint* ou *motrices*. Au total plus de 80 protéines ont été identifiées chez l'Homme. Présent dès la prophase, il s'associe aux microtubules au cours de la prométaphase et permet l'alignement des chromosomes sur le plan équatorial au cours de la métaphase. Les chromatides sœurs sont séparées pendant l'anaphase et les membranes nucléaires des cellules filles reconstruites autour de leurs chromosomes respectifs durant la télophase (*pour revue* : Cheeseman et al., 2008 ; Schueler et al., 2006).

Les centromères ont un rôle dans la spécification du kinétochore (soit la détermination de la région où assembler le kinétochore sur le chromosome), dans l'assemblage du kinétochore, dans la liaison aux microtubules (dont la génération d'un site d'attachement), dans la dynamique des microtubules aux kinétochores, dans la motilité des kinétochores, et dans la vérification de l'attachement des microtubules à chaque kinétochore pour empêcher l'entrée en anaphase en cas de kinétochores non ou mal attachés, et dans la régulation de l'attachement kinétochore/microtubule afin d'assurer la ségrégation des chromosomes (*pour revue* : Cheeseman et al., 2008).

### La fonction des régions péricentriques

- HPI et le kinétochore

Chez l'Homme, la maintenance de la structure hétérochromatique aux régions péricentriques est essentielle au bon fonctionnement des centromères (Slee et al., 2012).

L'observation des protéines HPI en cellules vivantes montre une dynamique particulière au moment de la mitose, ce qui témoigne d'une activité spécifique. Alors que HPI $\beta$  est présent au niveau des régions péricentriques dans les noyaux interphasiques, il est remplacé par HPI $\alpha$  au début de la métaphase. Ces localisations différentielles ne sont pas médiées par les mêmes domaines : celle de HPI $\beta$  en interphase dépend surtout de la région qui contient son domaine CD, celle de HPI $\alpha$  au moment de la mitose dépend surtout de son domaine CSD (Hayakawa et al., 2003).

Chez l'Homme, HPI est également impliqué dans la stabilisation du kinétochore. C'est un partenaire clef du complexe hMis12, notamment de la sous-unité hMIS14. L'altération de cette interaction résulte en l'absence de AuroraB et Sgo1 aux centromères et donc une disruption du kinétochore (Kiyomitsu et al., 2010). L'interaction entre HPI et Mis12 est conservée de la levure à l'Homme (Obuse et al., 2004). Chez l'Homme, la perte d'HPI conduirait à l'absence de hMis12 aux kinétochores. La relaxation du kinétochore et de la structure des centromères médiée par la perte de Mis12 conduit à des CIN en réduisant la capacité du kinétochore à s'ancrer aux microtubules. De façon intéressante, la réduction de l'hétérochromatine par un traitement TSA a des conséquences différentes en fonction du type cellulaire étudié. Alors que la réduction de l'hétérochromatine par la TSA induit un arrêt cellulaire en métaphase et des CIN dans des cellules non-tumorales. Dans les cellules tumorales la TSA entraîne relocalisation de MIS12 et CENPA aux centromères même si y'a pas de H3K9me3. L'enrichissement en HPI et la perte de H3K9me3 conduisent aussi aux CIN, peut-être que la relocalisation de HPI permet d'assurer division malgré la présence de défauts mitotiques (González-Barrios et al., 2014).

Plus récemment, HPI a également été impliqué dans la formation du kinétochore chez *Drosophila melanogaster* via son association avec le variant d'histone *H2A.V*. Cette interaction est nécessaire à l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale ainsi qu'à la dynamique des microtubules. La surexpression d'HPI, malgré une perte d'*H2A.V*, peut restaurer ce phénotype (Vernì & Cenci, 2015).

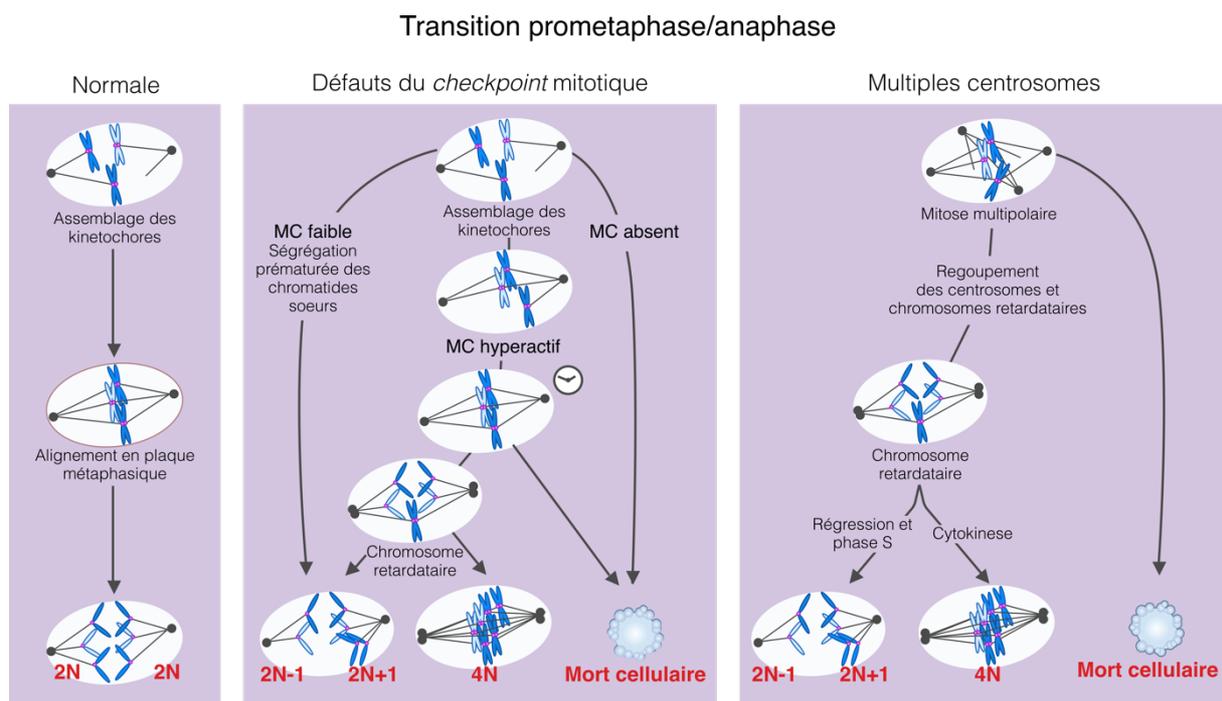
- HPI et la cohésion des chromatides sœurs

Parallèlement à son rôle dans la fonction des centromères, l'hétérochromatine péricentrique joue un rôle également essentiel dans la ségrégation des centromères en raison de son impact sur la cohésion des chromatides sœurs. Chez *S.Pombe*, l'homologue d'HPI SWI6 est à l'origine de l'adressage de la cohésine aux régions péricentriques. Ce facteur, comme son homologue chez la souris, entre directement en contact avec une des sous-unité de la cohésine (Nonaka et al., 2002). L'absence de Swi6 aux régions péricentriques entraîne des problèmes de ségrégation des chromosomes dont des retards de chromosomes sur fuseaux mitotiques (Ekwall et al., 1995). Par l'étude de chromosomes artificiels de drosophile constitués de longues régions hétérochromatiques distales aux centromères il a été confirmé que la structure hétérochromatique suffit à induire un enrichissement en cohésine qui persiste au moment de la mitose, mais aussi à créer des points d'ancrages entre les chromatides sœurs (Oliveira et al., 2014).

Que ce soit par un impact sur la formation même du kinétochore ou en agissant sur la cohésion des chromatides sœurs, la structure hétérochromatique des régions péricentriques est nécessaire pour assurer une division correcte des cellules. Les conséquences de tous ces défauts sont une augmentation de la létalité cellulaire, ou la formation de cellules tumorales.

### 2.3. Les conséquences de défauts de ségrégation des chromosomes : les CIN

Les CIN, ou *Instabilités chromosomiques*, sont des altérations du nombre de chromosomes ou aneuploïdie. Il y a plus de cent ans il était déjà postulé que les CIN pourraient avoir un rôle important dans l'initiation et la progression des cellules tumorales. Depuis, une large quantité de données sur l'aneuploïdie de cellules tumorales corréle les CIN, leurs grades et leurs pronostiques (Kronenwett et al., 2004; *pour revue* : Schwartzman et al., 2010).



**Fig 1.31. Accumulation d'instabilités chromosomiques suite à des défauts de checkpoints mitotiques.** Transition prometaphase/anaphase dans des cellules en absence de défauts de *checkpoint* mitotique (MC) (gauche), avec un trop faible ou trop fort MC (milieu), ou avec de multiples centrosomes (droite). Un MC normal conduit à une ségrégation normale des chromosomes où chaque cellule possède  $2N$  chromosomes. Des défauts de MC ou de multiples centrosomes peut conduire à l'accumulation de CIN (cellules avec  $2N+1$ ,  $2N-1$  ou  $4N$  chromosomes) ainsi qu'à une mort cellulaire. (D'après Schwartzman et al., 2010).

Dans les cellules de mammifères, l'apparition de CIN peut se faire quand les mécanismes de *checkpoint* sont altérés, qu'ils soient affaiblis ou renforcés, conduisant à des sorties précoces de la

mitose et/ou à des ségrégations précoces des chromatides sœurs [Fig 1.31]. Ceci est confirmé par des modèles animaux. Ainsi par exemple des souris KO pour certaines protéines associées aux CIN présentent un ratio plus élevé d'aneuploïdie et développent plus facilement des tumeurs [Fig 1.32]. Il est toutefois plus courant de rencontrer des cellules tumorales avec une suractivation du *checkpoint* mitotique. La raison est qu'un grand nombre de ces acteurs est sous le contrôle de du facteur E2F activé dans beaucoup de cancers. Un autre processus qui mène à l'apparition de CIN est l'amplification des centrosomes. Plus particulièrement présent dans les cellules tétraploïdes où il induit des *chromosomes retardataires* et des erreurs de ségrégation (Silkworth et al., 2009).

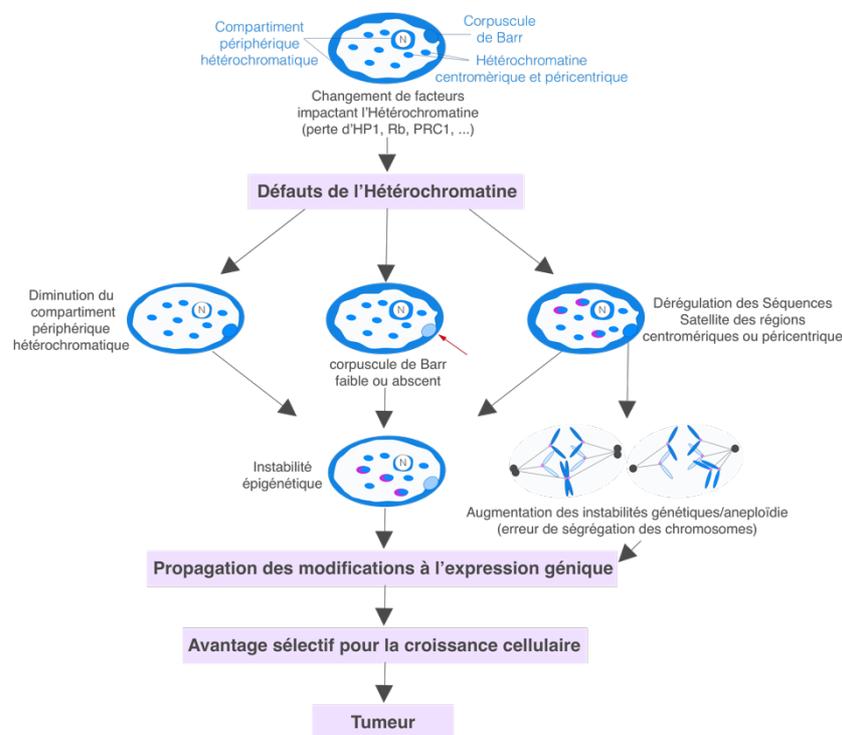


Fig 1.32. De l'instabilité génétique à l'instabilité chromosomique et la formation de cellules tumorales. (D'après Carone et al., 2013).

Identifiables entre autres par des décali de mitose et des micronoyaux, les CIN témoignent de problèmes mitotiques après la mitose comme (i) des *chromosomes retardataires* qui sont des chromosomes persistants dans le plan équatorial au moment de l'anaphase ; (ii) la présence de ponts chromosomiques entre les noyaux des deux cellules filles résultant d'un attachement anormal de chromosomes.

Outre leur impact dans la progression tumorale, les CIN ont une incidence gravissime lors du développement embryonnaire précoce. C'est au moment du développement pré-implantatoire que l'embryon est le plus sujet à ces mutations qui ont des conséquences souvent létales et sont donc associées à une infertilité ou à des anomalies congénitales. Les embryons humains sont particulièrement sujets à l'aneuploïdie, qui est majoritairement le résultat de mitoses anormales lors de la gamétogénèse femelle. Entre 70% et 90% des embryons humains fertilisés *in vitro* présentent des anomalies numériques ou structurales consécutives aux premières divisions préimplantatoires (De La Fuente et al., 2015).

### **3. Les régions péricentriques et la réponse au stress**

#### ***Problématique et hypothèse de travail***

Comme décrit dans l'introduction, la HSR conduit chez l'homme à l'accumulation massive du facteur de transcription HSF1 sur des régions d'hétérochromatine constitutive péricentrique, ce qui induit leur transcription en lncARN (Jolly et al., 2004 ; Rizzi et al., 2004). Les sites de nucléation de ces nSBs se trouvent être les *loci* 9q12 dans les cellules femelles humaines normales (Jolly et al., 2002). Ces régions ciblées et transcrites par HSF1 sont formées d'hétérochromatine péricentrique composée de séquences répétées en tandem de type SATIII.

Les données de la littérature ne permettent cependant pas d'expliquer les mécanismes à la base d'une affinité particulière d'HSF1 pour le chromosome 9. En effet les répétitions de types SATIII sont présentes sur plus de 13 chromosomes autosomes ainsi que sur le chromosome Y et ont la capacité de fixer HSF1 lors d'expériences de reconstitution de granules *in vitro* (Eymery et al., 2010). La seule distinction connue de la région 9q12 reste que, au même titre que la région Yq12 et malgré son appartenance à l'hétérochromatine constitutive péricentrique, elle n'appartient pas à la fraction d'ADN très compacte du génome. Cette caractéristique a été identifiée sur la base d'expériences de sédimentations de fractions chromatiniennes sur gradient de sucrose (Gilbert et al., 2004).

En dehors des cellules humaines en culture, l'accumulation du facteur HSF1 sous forme de granules au niveau des séquences SATIII n'a jamais été décrite. Pourtant de nombreuses études révèlent la présence de transcrits SATII ou SATIII dans le tissu tumoral, mais aussi lors de la gamétogénèse où on les détecte avec une orientation anti-sens (SATIII-AS) et lors du vieillissement. Cependant aucun lien n'a encore été établi entre l'accumulation de ces transcrits

et celle du facteur HSF1 au niveau des *loci* 9q12 (Eymery et al., 2009 ; Ting et al., 2011). Dans ces différents contextes (stress, cancer, sénescence et gamétogénèse) le rôle de l'accumulation de transcrits SATIII n'est pas comprise.

La fonction des foyers nucléaires de stress, en lien avec les réarrangements de la chromatine, est l'une des problématiques majeures de notre équipe. Or jusqu'à présent les conditions dans lesquelles l'accumulation de transcrits péricentriques sont les mieux caractérisées suggèrent qu'elle pourrait jouer un rôle en lien avec la structure des régions péricentriques : rôle tantôt stabilisateur, tantôt déstabilisateur (Keller et al., 2012 ; Probst et al., 2010 ; Santenard et al., 2010).

Dans ce contexte, mon travail de thèse a porté sur la formation des nSBs, ainsi que leurs conséquences sur la structure et la fonction de l'hétérochromatine péricentrique des régions 9q12 dans des conditions de stress. Il s'articule en deux grandes parties :

### **Partie I :**

Dans la première partie de mon travail de thèse, nous avons cherché à mieux comprendre le ciblage des régions SATIII par HSF1 *in situ* et *in vivo*.

- Nous nous sommes intéressés au statut épigénétique des régions péricentriques SATIII en présence et en absence de foyers nucléaires de stress. Nous avons également cherché à caractériser les acteurs nécessaires à l'activation transcriptionnelle de ces régions 9q12. [Annexe 2].

- Nous avons ensuite voulu montrer la relevance des nSBs *in vivo*. Pour cela nous avons cherché la présence de nSBs au sein de coupes testiculaires humaines puisque c'est le seul tissu sain adulte dans lequel des transcrits SATIII sont détectés.

- Ce travail nous a finalement conduit à l'identification d'une cible hétérochromatique aussi importante que le *locus* 9q12 pour le facteur HSF1 dans les cellules normales : le *locus* Yq12. Nous avons cherché à comprendre dans quelle mesure cette cible est une cible de foyers primaires HSF1 lors de la HSR.

## **Partie II :**

Dans un deuxième temps nous nous sommes plus particulièrement intéressés au lien entre la transcription des régions péri-centriques SATIII et les principaux acteurs de l'hétérochromatine péri-centrique humaine : H3K9me3 et HPI  $\alpha$  et  $\beta$ . Nous avons voulu comprendre :

- Quel est le devenir des principaux acteurs de l'hétérochromatine constitutive au cours de la HSR et de sa récupération : sont-ils déstabilisés ou stabilisés par la présence de transcrits péri-centriques ?

- Quels sont les mécanismes associés à la déstabilisation ou à la stabilisation des acteurs de l'hétérochromatine constitutive au niveau des régions 9q12 au cours du stress et de sa récupération ? Quel est le rôle des acteurs généralement associés à l'hétérochromatine constitutive dans la régulation des SATIII lors de la HSR et lors de période de récupération au stress ?

Enfin, grâce à une approche de LNA gapmers nous avons également recherché le rôle possible des nSBs et des transcrits SAT III dans la fonction des régions péri-centriques au cours du cycle cellulaire.



## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

Les matériels et méthodes principaux que j'ai pu utiliser au cours de ma thèse sont détaillés dans ce chapitre.

### **I- Culture cellulaire, stress et drogues utilisées**

#### **1. Culture cellulaire et stress**

##### La culture cellulaire

La culture de toutes cellules a été faite à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans une étuve humide. Les cellules HeLa ou HeLa FUCCI ont pour milieu de culture du DMEM glucose 4,5g/litre, 10% Sérum de veau Fœtal (SVF) décomplémenté, 2% glutamine. Les cellules HT1080 ont pour milieu de culture du EMEM glucose 4,5g/litre, 10% SVF décomplémenté, 2% glutamine. Des cellules hybrides de Hamster contenant le chromosome Y humain (GMO6137Y) et des fibroblastes primaires ainsi que des amniocytes mâles et femelles obtenus par le CHU de Grenoble ont été cultivés dans un milieu RPMI/10 % SVF/2% glutamine/0,1%.

Pour les analyses biochimiques elles ont été placées en boîte 10 cm, pour les analyses *in situ* elles ont étéensemencées sur des lamelles stériles déposées dans le fond de puits de plaque 24 puits.

Les cellules HeLa FUCCI portent des vecteurs qui conduisent à l'émission d'une fluorescence qui varie en fonction des phases du cycle, elles sont décrites dans le premier paragraphe du *chapitre 3, II.3* [Fig 3.28].

##### Le stress et la récupération

Le stress thermique est réalisé par immersion des flasques (pour les études biochimiques) ou de lamelles disposées dans des plaques 24 puits (pour les études en microscopie) dans un bain marie 30 minutes ou 1 heure à 43°C ou 45°C. Les cellules sont ensuite placées (ou non) en récupération à 37°C dans l'étuve jusqu'à 24 heures après le stress.

#### **2. Les drogues utilisées**

##### Inhibition de la transcription

La transcription a été bloquée par incubation des cellules avec 5mM de *triptolide* dilué dans de l'eau 5 minutes avant application du stress (Bensaude, 2011).

## Inhibition spécifique de la transcription des SATIII-S

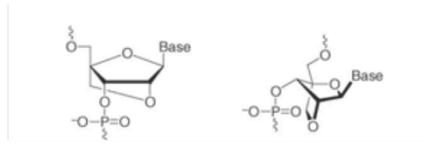


Fig 2.1. Structure des monomères de Locked nucleic acid (LNA). (D'après Kauppinen et al. 2005).

La transcription des SATIII a été spécifiquement bloquée par transfection des cellules avec des LNA-DNA SATIII-S [Fig 2.1]. Dans ce but des LNA-DNA GFP (contrôle) ou LNA-DNA SATIII-S ont été transfectés à une concentration de 0,02mM avec de la *lipofectamine*® *RNAiMax invitrogen* selon les indications du fournisseur. La séquence des LNA-DNA est listée avec les autres oligonucléotides [Tab 2.3]. Le traitement est effectué 5 heures et 30 minutes avant le stress sur des cellules ayant atteint un maximum de 30% de confluence.

### Blocage des cellules HeLa FUCCI en G2

Les cellules ont été synchronisées en G2 par un double blocage thymidine. Des cellules à 20% de confluence ont été soumises à un premier traitement de 2mM final de thymidine pendant 18 heures. Après 3 lavages PBS, les cellules sont ensuite replacées en croissance durant 9 heures avec du milieu de culture. Un deuxième traitement à 2mM final de thymidine de 17 heures est ensuite appliqué. Finalement après 3 rinçages PBS IX les cellules sont incubées avec du milieu de culture pendant une période de 5 heures 30, jusqu'à atteindre la phase G2.

### Préparation des chromosomes métaphasiques

Cultivées en T25, les cellules HT1080 sont incubées 12 heures avec une solution de colchicine à 10µg/mL pour être synchronisées en métaphase. Après centrifugation 5 minutes à 2000RPM, le culot est resuspendu goutte à goutte, sous agitation, dans une solution hypotonique de KCL 0,075M préchauffée à 37°C et la suspension cellulaire incubée à 37°C pendant 20 minutes. Quelques gouttes de fixateur Méthanol-Acide acétique à 3 :1, pré-incubé à -20°C, sont ajoutées aux cellules. Après 5 minutes d'incubation, celles-ci sont centrifugées comme précédemment. Trois cycles successifs de fixations réalisées goutte à goutte sous agitation et de centrifugation sont ensuite réalisés. Les étalements sont finalement obtenus en lâchant une goutte de la suspension cellulaire sur des lames de verres qui sont vieilles 24heures à RT avant marquage.

### 3. La transfection de plasmides

#### Transfection transitoire

La transfection transitoire de protéines a été réalisée sur des cellules à 80% de confluence, 24 heures après ensemencement, avec de la *lipofectamine*® 2000 invitrogen selon les indications du fournisseur. Les vecteurs sont listés [Tab 2.1].

Nom	origine	Qté/puit
HSFI -GFP	équipe	100µg
HSFI -DBD-TRIM-flag	équipe	200µg
HPI alpha -GFP	addgene	100µg
HPI beta -GFP	addgene	200µg
HA-HPI beta $\Delta$ N	addgene	500µg
pcDNA -HA	équipe	100µg
peGFP	équipe	100µg

Tab 2.1. Plasmides. Liste des plasmides utilisés et de la quantité transférée par puit de plaque 24 puits (qsp à 500µg avec un plasmide pBSK).

## II- Analyse in situ

### 1. Marquages fluorescents

#### Immunofluorescence

Des cellules cultivées sur lamelle comme décrit précédemment sont rincées 3 fois 1 minute au PBS1x (Phosphate Buffer Saline) puis incubées 15 minutes en PBS1x/4% paraformaldéhyde. Après 3 nouveaux rinçages PBS les cellules sont perméabilisées 3 fois 5 minutes en PBS1x/0,5% Saponine/0,5% Triton X-100 puis à nouveau rincées 3 fois au PBS1x. Toutes les étapes se déroulent à Température ambiante (RT).

Les cellules sont ensuite saturées 30 minutes à 37°C dans du PBS1x/10% SVF/0,3% Triton X-100 avant d'être incubées en présence de l'anticorps primaire 1 heure à 37°C ou sur la nuit à 4°C en fonction de l'anticorps utilisé. Les anticorps sont dilués dans la solution de lavage PBS1x/2% SVF/0,3% Triton X-100, les dilutions de chaque anticorps sont listées tableau [Tab 2.2]. Après 3 rinçages de 5 minutes avec la solution de lavage préchauffée à 45°C, les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore (Alexa 488 ou

Dylight 549) et lavées comme décrit précédemment avec la solution de lavage. Après 3 rinçages en PBS 1x, les cellules sont incubées avec du DAPI et montées sur lame avec du milieu de montage (Dabco).

Anticorps	Fournisseur	Animal	IF	WB
<b>Immunofluorescence</b>				
<i>Anticorps primaires</i>				
anti-ARNPolII S2	abcam ab5095	lapin	1:200	
anti-Flag	Sigma F3165	souris	1:200	1:1000
anti-H3K9me3	upstate 07-523	lapin	1:250	
anti-H3K9me3	Active motif 39285	souris	1:100	
anti-HA	Covance HA.11	souris	1:1000	1:1000
anti-HP1 alpha	Euromedex 2MOD-1G6-AS	souris	1:500	1:500
anti-HP1 beta	Euromedex 1MOD-1A9-AS	souris	1:200	1:2000
anti-HSF1	stressgen SPA-950	rat	1:100	1:1000
anti-HSF1	Enzo Life ADI-SPA-901	lapin	1:300	1:1000
anti-HSF2	Abcam ab69621	rat	1:200	
anti-Lysine acétylée	upstate 06-933	lapin	1:200	1:1000
anti-SRSF1	Life Technologies 32-4600	souris	1:50	
anti-tubuline	Sigma T5168	souris	1:500	1:5000
<i>Anticorps secondaires</i>				
anti-souris Alexa488	Invitrogen	chèvre	1:500	
anti-souris Dylight549	SantaCruz	chèvre	1:500	
anti-lapin Alexa488	Invitrogen	chèvre	1:500	
anti-lapin Dylight549	SantaCruz	chèvre	1:500	
<b>FISH</b>				
Avidine-FITC	sigma A2050		1:200	
Avidine-TRITC	Sigma A7169		1:100	
anti-Digoxigenin FITC	Enzo 11236800		1:100	
anti-Digoxigenin TRITC	Roche 11661600		1:100	

**Tab 2.2. Anticorps et fluorophores.** Liste des anticorps utilisés pour les immunofluorescences et les Western Blot, ainsi que les concentrations utilisées. De même pour les fluorophores utilisés pour révéler les sondes double brin hybridées FISH ARN et FISH ADN.

### FISH ARN

La FISH ARN est réalisée à partir de sondes d'ADN simple brin couplée à la cyanine3 ou à l'Alexa488, ou à partir de sondes double brin biotinylées. Par lamelle, 100ng de sondes sont précipitées dans 0,1M d'acétate de sodium et 50ng d'ADN de sperme de saumon dans un volume de 50µL d'eau distillée auxquels sont ajoutés 100µL d'éthanol 100%. La sonde est ensuite centrifugée 30 minutes à 4°C à 14000 RPM, le culot rincé dans de l'éthanol 70%, séché, puis

repris dans du 2SSC/25% formamide/20% dextran Sulphate. Dans le cas des sondes double brin, la sonde est ensuite dénaturée 5 minutes à 75°C et conservée sur la glace jusqu'à hybridation.

Les cellules sont traitées comme pour l'immunofluorescence jusqu'à l'étape de perméabilisation incluse, puis, après rinçage en PBS 1x, déshydratées par 3 bains successifs de 3 minutes dans de l'éthanol 70%, 90% et 100%. Après séchage les cellules sont incubées entre lame et lamelle en chambre humide sur la nuit à 37°C en présence de la sonde diluée dans du 2SSC/25% formamide/20% dextran Sulphate.

Dans le cas des sondes simple brin couplées à un fluorophore, les cellules sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans du 2SSC/25% formamide préchauffé à 45°C, puis rincées dans du SSC 1x 15 minutes à RT. Si les sondes sont double brin, couplées à de la biotine ou de la digoxigénine, les cellules sont ensuite bloquées 30 minutes en 10%BSA/2SSC, puis la sonde détectée respectivement à l'avidine ou à l'anti-digoxigénine 30 minutes à 37°C [Tab 2.2]. Elles sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans du 4SSC/0,1%Tween. Enfin les cellules sont marquées au DAPI et montées entre lame et lamelle comme décrit précédemment.

Utilisation	Nom	Séquence
amorces	HSE-HSP REV	5'-GCA CCA GCA CTT CCC CA-3'
	HSE-HSP FOR	5'-CGC CCT GCG CCT TTA AG -3'
	GADPH REV	5'-TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA -3'
	GADPH FOR	5'-ATGGTTGCCACTGGGGATCT -3'
	9q12 Rev	5'- AATCAACCCGAGTGCAATCGAATGGAATC -3'
	9q12 For	5'-TCCATTCCATTCCCTGTACTCGG -3'
	Yq12 Rev	5'-TGGACAGGCCTGGAATAAAGTGGA -3'
	Yq12 For	5'-TCGACACCCAGCCTTCCAGTCA-3'
LNA-DNA	LNA-DNA SATIII-S	5'-TCCATTCCATTCCCTGTACTCGG -3'
Sonde FISH oligonucléotides	14AS	9q12
	21AS	SATIII
Sonde FISH plasmides	pHUR98	9q12
	DYZ1	Yq12
Northern Blot	SATIII-S	5'- AATCAACCCGAGTGCAATCGAATGGAATC -3'
	SATIII-AS	5'-TCCATTCCATTCCCTGTACTCGG -3'

Tab 2.3. Séquences de nucléotides. Liste des séquences de nucléotides mentionnées au cours de ce manuscrit.

### FISH ADN

La FISH ADN est réalisée à partir de sondes d'ADN simple brin couplée à la cyanine3 ou à l'Alexa488. Par lamelle, 100ng de sondes sont précipitées dans 0,1M d'acétate de sodium et 50ng d'ADN de sperme de saumon dans un volume de 50µL d'eau distillée auxquels sont ajoutés 100µL d'éthanol 100%. La sonde est ensuite centrifugée 30 minutes à 4°C à 14000 RPM, le culot

rincé dans de l'éthanol 70%, séché, puis repris dans du 2SSC/50% formamide/20% dextran Sulphate.

Les cellules sont traitées comme pour l'immunofluorescence jusqu'à l'étape de perméabilisation incluse, puis, après rinçage en PBSIX, déshydratées par 3 bains successifs de 3 minutes dans de l'éthanol 70%, 90% et 100%. Après séchage les cellules sont incubées entre lame et lamelle en présence de la sonde diluée dans du 2SSC/50% formamide/20% dextran Sulphate, et l'ADN ainsi que la sonde sont dénaturés 5 minutes à 86°C, puis incubées en chambre humide sur la nuit à 37°C. Puis les cellules sont rincées comme décrit précédemment.

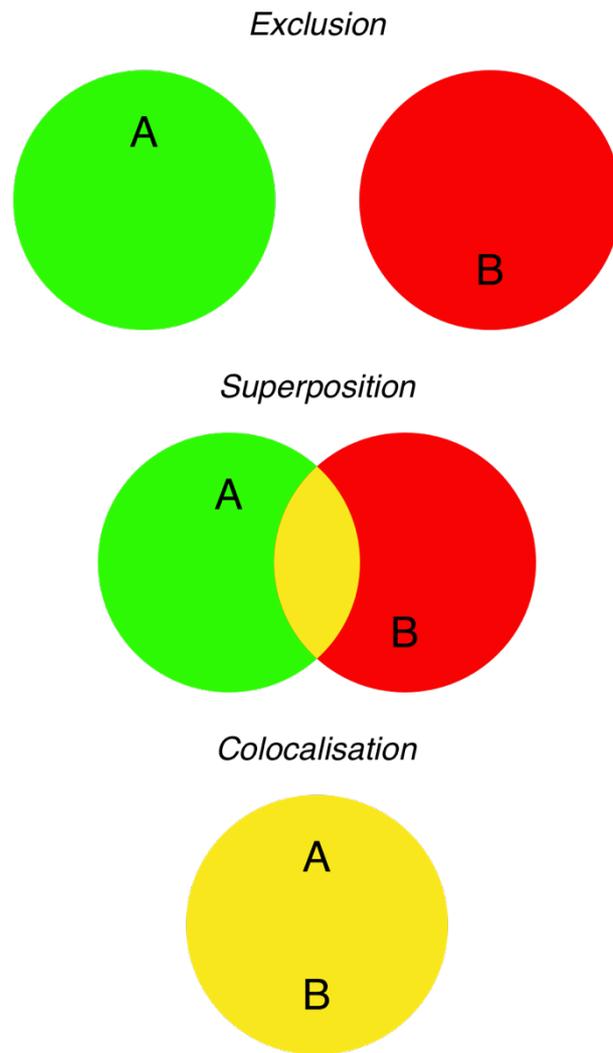
### Co-immunoFISH

Dans le cas d'une codétection ARN/protéine, la FISH ARN est réalisée dans un premier temps puis post-fixée 10 minutes en PBSIX/Paraformaldéhyde 4%. Les cellules sont ensuite rincées sur la nuit en PBSIX à 4°C et l'immunodétection est réalisée à partir de l'étape de blocage.

Dans le cas d'une codétection ADN/protéine, l'immunofluorescence est réalisée dans un premier temps puis post-fixée 10 minutes en PBSIX/Paraformaldéhyde 4%. Les cellules sont ensuite rincées sur la nuit en PBSIX à 4°C et la FISH ADN est réalisée à partir de l'étape de déshydratation.

## **2. Observation microscopique et analyse d'image**

Les cellules montées entre lame et lamelles ont été observées soit avec un microscope droit motorisé *Zeiss AxioImager Z1 pseudoconfocal 3D* par système d'excitation de fluorescence en *lumière structurée ApoTome* (grille dense avec un l'objectif 63x/1.4), soit avec un microscope inversé motorisé *Zeiss Axiovert 200M confocal et biphotonique à balayage laser* (objectif 63x/1.4). Dans les deux cas des sections optiques sont réalisées et analysées sur le logiciel ImageJ pour l'obtention de profils de fluorescence permettant d'identifier la colocalisation, la superposition ou l'exclusion des foyers formés par les protéines d'intérêts marquées par des fluorochromes qui émettent une fluorescence dans deux longueurs d'ondes distinctes.



*Fig 2.2. Analyse de la colocalisation.* Les protéines et les ARN étudiés forment des foyers dont l'exclusion (haut), la superposition (milieu) ou la colocalisation (bas) ont été quantifiées à partir de profils de fluorescence réalisés sur des images de sections optiques.

### 3. Vidéomicroscopie de cellules vivantes HeLa

Les cellules HeLa FUCCI incubées dans un milieu dépourvu de phénol et soumises ou non à différents traitements décrits précédemment (Stress, LNA-DNA, ...) ont été placées sous un vidéomicroscope inversé motorisé *Zeiss AxioVert 200M* à fluorescence rapide complété par un insert chauffant et incubateur CO<sub>2</sub> sous platine. Ainsi maintenues à une température de 37°C en présence de 5% CO<sub>2</sub>, les cellules en récupération au stress ont pu être observées sur une durée de 24 heures à 48 heures avec un objectif Achromat 20x/0,5. Une acquisition d'image a été réalisée toutes les 30 minutes dans les trois canaux d'intérêt (fluorescence rouge, verte ou

contraste de phase). Les séquences d'images obtenues ont été analysées sur ImageJ et la durée de chaque phase du cycle pour une cellule d'intérêt notée.

## 4. Cytométrie en Flux

Pour une T75 de cellules HeLa FUCCI soumises ou non à différents traitements décrits précédemment (Stress, Synchronisation, ...), les cellules ont été rincées au PBS 1x puis trypsinées. Les cellules ont été récupérées et ajoutées au milieu préalablement conservé, puis centrifugées 5 minutes à 200RPM. Après un rinçage et une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 0,5mL de PBS 1x et ajouté à 4,5mL d'éthanol 100% à -20°C tout en vortexant. Les cellules sont ensuite incubées sur glace 20minutes puis centrifugées et reprises dans dans PBS 1x. Après une nouvelle centrifugation les cellules sont reprises dans une solution contenant du DAPI.

La fluorescence des HeLa FUCCI, également marquées au DAPI, a été analysé par un FACS Aria (Becton-Dickinson). 100000 cellules par condition ont été analysées.

## III-Analyses biochimiques

### 1. Analyse Protéique

#### Extraction à l'urée

Les cellules sont décollées mécaniquement par grattage et resuspendues dans 5mL de PBS 1X froid, puis centrifugées 2 minutes à 2000RPM. Le culot est resuspendu dans 1mL de PBS 1X froid. Après centrifugation à 2min à 2000rpm, le culot est resuspendu dans 150µL d'urée 8M, et soniqué dans la glace à 200J puis conservé à -20°C. La concentration protéique de chaque extrait est déterminée par Bradford.

#### Fractionnement cellulaire

Les cellules sont décollées mécaniquement par grattage et resuspendues dans 150µL de tampon de lyse (saccharose 0.34M, Tris/HCl 15mM pH7.4, KCl 60mM, NaCl 15mM, EDTA 2mM, EGTA 0.5mM, spermidine 0.65mM, Triton X-100 0.1%, complete mini, DTT 0.1mM, NaF 10mM) et incubées 30 minutes dans la glace puis centrifugées 5 minutes à 2000RPM. Le surnageant récupéré constitue la fraction cytosolique. Le culot est ensuite repris dans 150µL de LSDB500 (Glycérol 20%, MgCl<sub>2</sub> 3mM, Hepes pH7.9 50mM, complete mini, NaF 10mM, KCl 500mM), incubé 30

minutes dans la glace et centrifugé 5 minutes à 2000RPM. Le surnageant constitue la fraction nucléaire soluble et le culot, repris dans 150ML d'urée 8M constitue la fraction nucléaire insoluble.

### Western Blot

Pour chaque extrait, 20µg de protéines sont déposés sur un gel SDS PAGE 10% ou 15%. La migration est réalisée à 150V et ampérage libre. Après migration les protéines sont adsorbées sur une membrane de nitrocellulose par transfert liquide 1 heure à 100V. La membrane est incubée 30 minutes dans du PBSIX / 5% Lait ou du PBSIX / 10% BSA afin de saturer les sites non spécifiques puis à 4°C sur la nuit sur roue avec l'anticorps primaire dilué selon les indications du fournisseur. Après 3 lavages de 5 minutes dans une solution de PBSIX / 0.02% Tween20 la membrane est incubée 30 minutes à RT avec un anticorps secondaire couplé à la HRP, dilué dans du PBSIX / 0,02% Twee20 / 0,5% lait. Après 3 bains de 5 minutes dans la solution de lavage, la membrane est rincée au PBSIX puis le marquage est révélé avec un kit ECL.

## 2. Analyse Nucléique

### Extraction d'ARN au Trizol

Pour une boîte 10cm à 80% de confluence, les cellules sont décollées mécaniquement et centrifugées 5 minutes à 2000RPM. Le culot est ensuite resuspendu dans 1mL de Trizol et incubé à RT 5 minutes. Après ajout de 200µL de chloroforme, et 15 inversions de tube, les cellules sont incubées 15 minutes à RT et centrifugées 10 minutes à 12000RPM. La phase aqueuse est récupérée et un volume équivalent d'isopropanol est ajouté, ainsi qu'1µl de glycogène à 20mg/ml. Après agitation, et centrifugation 15 minutes à 14000RPM à 4°C, le culot est lavé dans de l'éthanol 70%, séché, et resuspendu dans 10 à 20µl d'H2O RNase-free. L'ARN obtenu est dosé au *nanodrop*.

### Northern Blot

Toutes les solutions sont *RNase-free*. Après extraction et analyse sur gel d'agarose, 20µg d'ARN sont incubés à 65°C dans du tampon MOPSIX/48% Formamide déionisée/2,2M Formaldéhyde. (Tampon MOPSIX : 0,02M MOPS/5mM NaAc/1mM EDTA, pH7). Puis un tampon de charge (Biolabs) et 1µl de Bromure d'Ethidium dilué 5 fois sont ajoutés. Les ARN sont ensuite déposés sur un gel 0,8% agarose/2,2M formaldéhyde et migrent 5 heures à 75V dans du tampon MOPSIX. Après 4 rinçages de 20 minutes dans de l'H2O distillée, puis 30 minutes dans du 20xSSC, l'ARN est transféré sur une membrane de Nylon par capillarité puis séché et *cross-linké* par UV à partir d'un *stratalinker*. La sonde est composé d'ADN simple brin marqué par de l'ATP, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-<sup>3000</sup>Ci/mmol (PerkinElmer). 0,25µL de sondes à 100µM sont incubés dans un mix de 5µL de

tampon 10X, 5 $\mu$ L d'ATP [ $\gamma$ - $^{32}P$ ], 2 $\mu$ L kinase, 37,5 $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Puis incubés à 37°C 30 minutes, à RT 15min et enfin à 65°C 5 minutes. La sonde est ensuite purifiée sur colonne *G-50 Microspin GE* (Healthcare) selon les instructions du fournisseur. Diluée dans du tampon d'hybridation préchauffé à 65°C, la sonde est hybridée pendant 16 heures à 42°C avec la membrane. Puis la membrane est lavée 5 minutes dans du 2SSC/0,1% SDS à RT, 5 minutes dans du 0,2SSC/0,1% SDS et 10 minutes dans du 2SSC/0,1% SDS à RT. Les signaux d'hybridation sont détectés avec le *Phosphorimager PMI* (Biorad).

### RT-qPCR

L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu à partir d'1  $\mu$ g d'ARN et du kit *transcription first strand* (Roche).

L'ADN génomique comme l'ADNc a été analysé par qPCR à partir du kit *Syber Premix Ex Taq* (Takara) et des amorces listées tableau 2. , sur le *Light Cycler* (Roche). Protocole PCR : pré-incubation 10 minutes 95°C puis 45 cycles de 10 secondes 95°C, 10 secondes 56°C, 10 secondes 72°C.

## **3. Analyse de l'interaction protéine/acide nucléique**

### Immunoprécipitation de la chromatine

Les cellules sont *cross-linkées* 10 minutes avec du PBSIX/1% formaldéhyde final. La fixation est ensuite stoppée par 125mM de glycine pendant 2 minutes et les cellules lavées 2 fois dans 1mM PMSF / PBSIX froid. Après centrifugation elles sont resuspendues 10 minutes dans du tampon de lyse cellulaire froid (25mM Hepes pH 7.8/1,5mM MgCl<sub>2</sub>/10mM KCl/1mM DTT/0,1%NP-40 et inhibiteurs de protéases) avant d'être reprises dans du tampon de lyse nucléaire (50mM Hepes pH 7.9/140mM NaCl/1mM EDTA/1% Triton X-100/0,1% Na-deoxycholate/0,1% SDS et inhibiteurs de protéases). Les échantillons de chromatine sont fragmentés par sonication à une taille approximative de 1000 paires de bases. La chromatine soniquée est centrifugée à 4°C 10 minutes à 14000RPM. L'immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps anti-HSF1 (Santa-Cruz, #sc-9144) à 4°C toute la nuit. Des billes magnétiques recouvertes de protéine G (Invitrogen, #100-04D) sont ajoutées pendant 4 heures. Les lavages sont ensuite réalisés 2 fois dans le tampon de lyse nucléaire, 2 fois dans le même tampon supplémenté pour avoir 0,5 M NaCl, 2 fois dans le tampon de lavage (20mM Tris-HCl pH 8.0/250 nM LiCl/1 mM EDTA/0,5% Na deoxycholate) et 1 fois dans du tampon Tris-EDTA. Le *cross-link* est réversé par incubation

des échantillons toute la nuit à 65°C, 1000RPM dans un *thermomixeur*. L'ADN est purifié à l'aide du kit *Invitek* (#1020220300) en accord avec les instructions du fabricant. Les amorces utilisées pour qPCR sont référencées dans le tableau [tab 2.3]. La qPCR est réalisée comme décrit précédemment.

## Chapitre III : Résultats

Comme décrit précédemment, notre équipe utilise le stress thermique pour étudier la réponse au stress protéotoxique médiée par HSF1. Ce stress facile à mettre en œuvre présente l'avantage d'induire une réponse rapide et très facilement réversible. Au cours de mon projet de thèse nous sommes plus particulièrement concentrés sur la formation des nSBs dans les cellules humaines, modèle idéal pour comprendre les changements de structure au niveau de régions d'hétérochromatine constitutive.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse sur l'étude de l'impact de la réponse au stress thermique sur les régions péri-centriques hétérochromatiques sont organisés en deux grandes parties.

- Partie I :

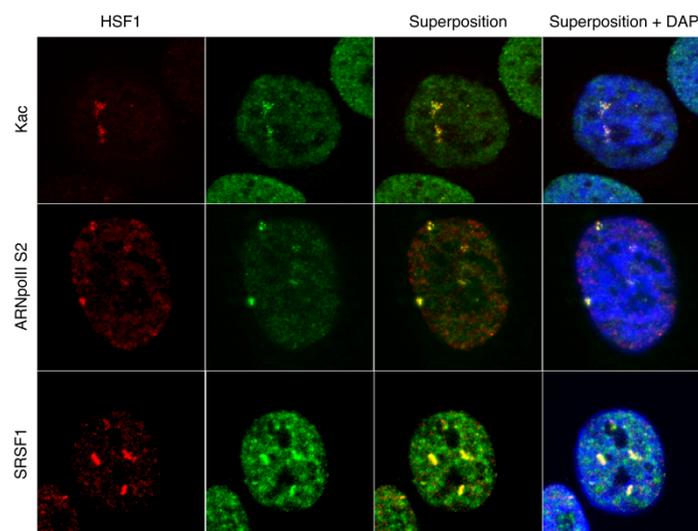
La première partie de ces résultats expose l'identification d'une nouvelle cible hétérochromatique transcriptionnellement active des *foyers primaires* HSF1 dans les cellules mâles : la région Yq12. Et pour la première fois, la confirmation qu'HSF1 peut s'accumuler sur les régions SATIII *in vivo* chez l'Homme.

- Partie II :

La deuxième partie montre l'impact de l'accumulation d'HSF1 sur la structure hétérochromatique des régions péri-centriques SATIII, ainsi que les conséquences fonctionnelles sur le déroulement de la mitose.

## I -Une nouvelle cible pour HSF1 dans les cellules mâles

Les nSBs sont au centre de mon travail de thèse. Leur cinétique dépend à la fois de facteurs intrinsèques (type cellulaire, concentration intracellulaire en HSF1) et extrinsèques (intensité, nature du stress) (Sengupta et al., 2009; Valgardsdottir et al., 2007). Ils sont facilement visualisables en microscopie photonique de part la nature répétée des séquences ciblées. C'est en effet grâce à cette caractéristique que le recrutement des différents acteurs est massif et que la taille des foyers est suffisamment importante (de l'ordre du  $\mu\text{m}$ ) (Chiodi et al., 2000; Jolly et al., 1997). La cinétique de formation des nSBs la plus étudiée est celle induite par un stress thermique à 43°C dans des cellules humaines femelles HeLa (Eymery et al., 2010; Jolly et al., 2004; Rizzi et al., 2004). Dans ces conditions, 1 heure après le début du stress, plus de 95% des cellules HeLa forment des nSBs [Fig 3.1], et la totalité des foyers HSF1 sont déjà hyperacétylés suite au recrutement massif de HAT [Fig 3.1, ligne 1]. Cette hyperacétylation sert de plateforme à des protéines à bromodomaines dont Brd2, Brd3 et Brd4 [Annexe 2] permettant l'accumulation de l'ARN PolII nécessaire à la production ainsi qu'à l'accumulation de transcrits non-codants composés de séquences répétées de type SATIII [Fig 3.1, ligne 2]. Dès 1 heure de stress thermique à 43°C dans ces cellules, tous les nSBs contiennent également des facteurs régulateurs d'épissage comme hnRNP30c ou SRSF1 (Metz et al., 2004; Weighardt et al., 1999) [Fig 3.1, ligne 3].



**Fig 3.1. Les foyers nucléaires de stress.** Des cellules HeLa ont été soumises à un stress d'1 heure à 43°C puis les foyers nucléaires de stress ont été détectés par immunofluorescence anti-HSF1 (rouge), anti-Lysine acétylée (acK, haut), anti-ARN polymérase II phospho S2 (ARNpolII S2, milieu) ou anti SRSF1 (bas).

Malgré la capacité du facteur HSF1 à former des foyers sur tous les chromosomes composés de séquences répétées de type SATIII, la région péricentrique 9q12 a été décrite comme la cible majoritaire dans toutes les lignées cellulaires étudiées (Eymery et al., 2010; Jolly et al., 2002). L'étude, au cours de ma thèse, de la formation des nSBs dans des cellules primaires mâles et femelles nous a permis d'identifier une nouvelle cible hétérochromatique majeure pour HSF1 : la région q12 du chromosome Y, également composée de SATIII (Eymery et al., 2010). Toutefois, la présence de nouvelles cibles génomiques d'HSF1 sur le chromosome Y, en particulier chez la souris au niveau de gènes présents en multiples copies nous a conduit à caractériser la nature des séquences à l'origine de l'accumulation des foyers HSF1 sur le chromosome Y (Akerfelt et al., 2010). Nous avons montré de manière formelle que sur ce chromosome, HSF1 se lie à des séquences SATIII en réponse à un stress thermique et les active. Nous avons par la suite pu montrer pour la première fois un ciblage des séquences SATIII par HSF1 *in vivo* dans le tissu testiculaire, en particulier au niveau des cellules germinales en cours de différenciation. Ces cellules sont connues pour être le siège de remodelages chromatiniens importants.

## 1. La région Yq12 est massivement ciblée par HSF1 en réponse au stress thermique

### 1.1. La région 9q12 n'est pas la seule cible primaire dans les cellules humaines mâles

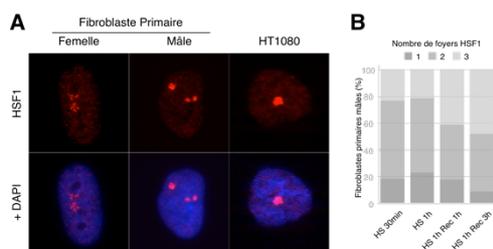
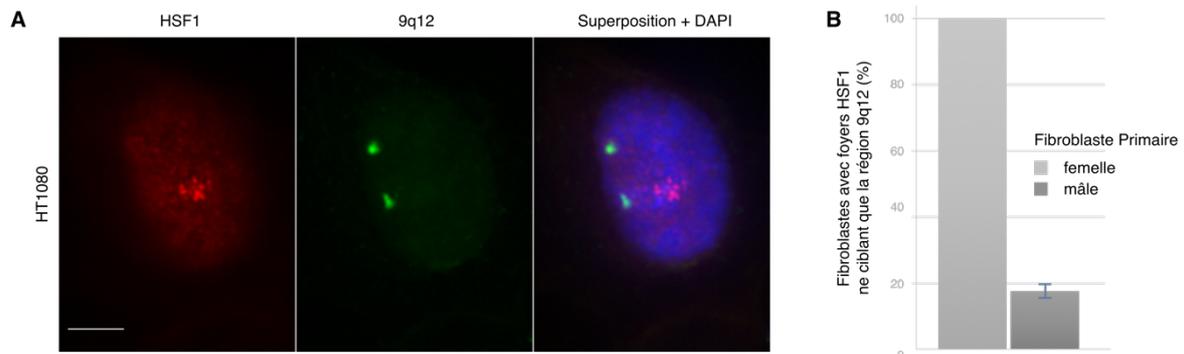


Fig 3.2. Les nombre de nSBs varie selon le genre des cellules. (A) Immunofluorescence du facteur HSF1 (rouge) dans des fibroblastes primaires femelles (gauche) et mâles (milieu) stressés 1h à 45°C ou dans des cellules mâles HT1080 (droite) stressées à 43°C. L'ADN est marqué au DAPI (bleu). (B) Quantification des foyers HSF1 dans des fibroblastes primaires mâles après un stress à 45°C pendant 30 minutes (HS 30min) ou 1 heure (HS 1h) et après une récupération d'1 heure (HS 1h Rec 1h) ou de 3 heures (HS 1h Rec 3h) à 37°C. L'analyse est réalisée sur trois expériences indépendantes (n=150/condition).

Le point de départ de la découverte d'une nouvelle cible hétérochromatique majeure pour HSF1 a été l'étude de la HSR au sein de fibroblastes primaires mâles et femelles. En détectant HSF1 par IF dans ces cellules diploïdes stressées nous avons observé que le nombre de nSBs varie en fonction du genre mâle ou femelle des cellules. La comptabilisation des nSBs confirme la présence d'au maximum deux foyers HSF1 dans les cellules femelles, contre trois dans les cellules mâles [Fig 3.2, A]. Pour cette analyse les cellules ont été soumises à un stress thermique plus intense que celui appliqué à des cellules tumorales, soit à 45°C, afin d'obtenir une réponse de la même efficacité (Jolly et al., 1997). Après 1 heure de stress, elles ont été incubées à 37°C pour récupérer.

Le pourcentage de fibroblastes mâles avec trois nSBs augmente alors progressivement jusqu'à atteindre 47% après 3 heures de récupération [Fig 3.2, B]. Pour savoir si la même caractéristique est retrouvée dans d'autres cellules mâles, la formation de foyers HSF1 a ensuite été analysée dans la lignée tumorale mâle diploïde HT1080. Étonnamment une seule cible majeure d'HSF1 a été observée dans ces cellules après 1 heure de stress thermique à 43°C [Fig 3.2, A].



**Fig 3.3.** La région 9q12 n'est pas une cible unique des foyers HSF1 dans les cellules mâles stressées. (A) Codétection du facteur HSF1 par immunofluorescence (rouge) et des régions 9q12 par FISH ADN (vert) dans les cellules HT1080 soumises à un stress thermique d'1 heure à 43°C. L'ADN est marqué au DAPI. Les foyers HSF1 ne se forment pas au niveau du locus 9q12. (B) Quantification réalisée à partir de l'analyse de fibroblastes mâles ou femelles, stressés 1h à 45°C. Dans les cellules femelles, la totalité des foyers HSF1 colocalise avec le locus 9q12 respectivement identifiés par immunofluorescence et FISH ADN. L'analyse est réalisée sur trois expériences indépendantes (n=250/condition).

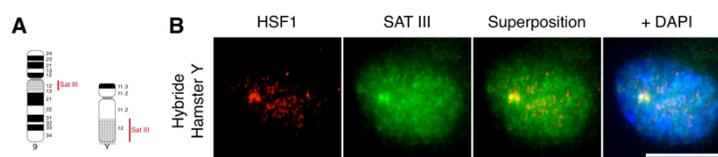
Cette analyse a ensuite été approfondie afin de vérifier que, comme montré dans les cellules femelles, les *loci* 9q12 sont bien les cibles hétérochromatiques majeures d'HSF1 dans les cellules mâles (Eymery et al., 2010; Jolly et al., 2002). Pour cela HSF1 et les régions 9q12 ont été codétectés par IF et *hybridation fluorescente in situ* ADN (FISH ADN) avec la sonde pHUR98 correspondant à une séquence SATIII spécifique du chromosome 9 (Jolly et al., 2002) [Fig 3.3]. Tandis que tous les foyers HSF1 colocalisent parfaitement avec les régions 9q12 dans les fibroblastes primaires femelles [Fig 3.3, B], plus de 80% des fibroblastes mâles ont un foyer supplémentaire, non colocalisé avec le chromosome 9 [Fig 3.3, B]. Ce constat est encore plus flagrant dans la lignée HT1080 où aucune région 9q12 n'est ciblée par HSF1 [Fig 3.3, A].

Ainsi, les cellules mâles, contrairement aux cellules femelles, forment des foyers primaires HSF1 sur un autre locus que celui identifié sur le chromosome 9. Or le chromosome Y, absent des cellules femelles, est également constitué d'une grande région de séquences répétées de type SATIII (Eymery et al., 2010). C'est donc tout naturellement que nous avons cherché à déterminer si la cible supplémentaire d'HSF1 dans les cellules humaines mâles correspondait à la région hétérochromatique SATIII du chromosome Y : la région Yq12 [Fig 3.4, A].

## 1.2. La région Yq12 est une cible du facteur HSF1 dans les cellules mâles

La cible supplémentaire d'HSF1 dans les fibroblastes mâles suggère que le chromosome Y serait la source de *foyers primaires* lors de la HSR. Nous avons commencé par utiliser une approche *in silico* pour confirmer cette hypothèse et analysé une séquence de 40Mb de la région Yq12 disponible sur le site du ncbi. Or en plus d'être majoritairement composée de séquences de type SATIII, cette région contient des HSE canoniques, localisées proches de boîtes TATA (observations non montrées). Suite à ces constatations nous avons utilisé des approches *in situ* pour savoir si ces régions peuvent être ciblées par HSF1. Nous avons abordé cette question en analysant la HSR dans des cellules hybrides de Hamster contenant un chromosome Y humain. Ces cellules présentent l'avantage de posséder un HSF1 très proche de l'Homme, qui se lie aux mêmes séquences cibles, et forme donc des nSBs sur les SATIII des chromosomes humains (Denegri et al., 2002). Elles facilitent ainsi l'étude des SATIII dont l'origine chromosomique est difficile à déterminer.

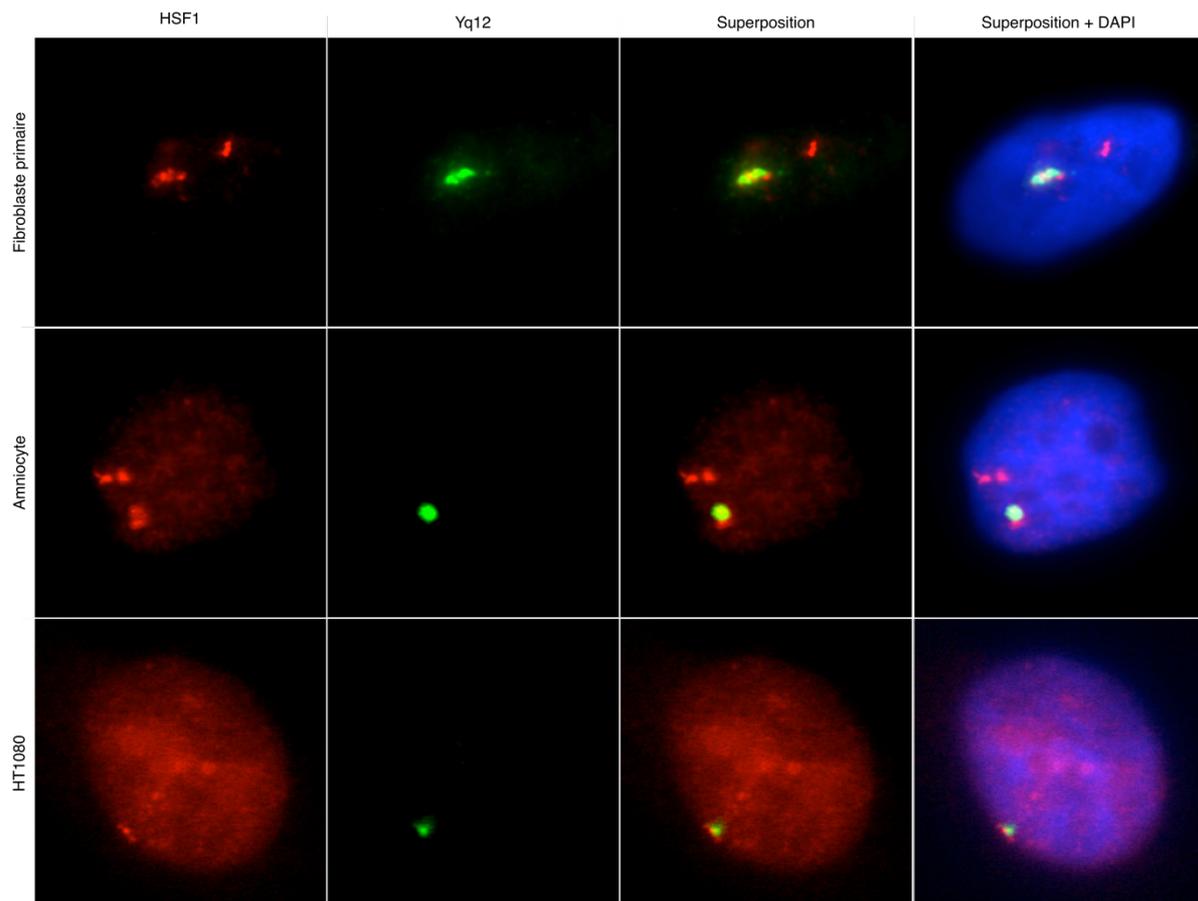
Comme attendu, une immunofluorescence anti-HSF1 dans les cellules hybrides Homme/Hamster stressées montre qu'HSF1 s'accumule en granules uniques localisés sur le chromosome Y [Fig 3.4, B]. Parce qu'HSF1 peut en principe cibler différents types de séquences SAT (SATII, SATIII) sur le chromosome Y, nous avons identifié sa cible exacte sur ce chromosome. A cette fin, HSF1 a été codétecté avec des séquences répétées de type SATIII. Comme montré [Fig 3.4, B], dans ces cellules, les foyers HSF1 se situent exactement au niveau des répétitions SATIII de la région hétérochromatique q12 du chromosome Y humain.



**Fig 3.4. Les séquences SATIII du chromosome Y sont ciblées par HSF1. (A)** Représentation des séquences SATIII présentes au niveau des régions 9q12 ou Yq12. **(B)** Codétection du facteur HSF1 par immunofluorescence (rouge) et des séquences SATIII du chromosome Y humain par FISH ADN (vert) dans une lignée hybride somatique homme : hamster contenant le chromosome Y humain. Barre d'échelle : 15µm.

Grâce à l'identification de la région exacte ciblée par HSF1 sur le chromosome Y nous avons pu utiliser la sonde ADN DYZ1, spécifique de la région Yq12, pour confirmer que ce *locus* est l'unique

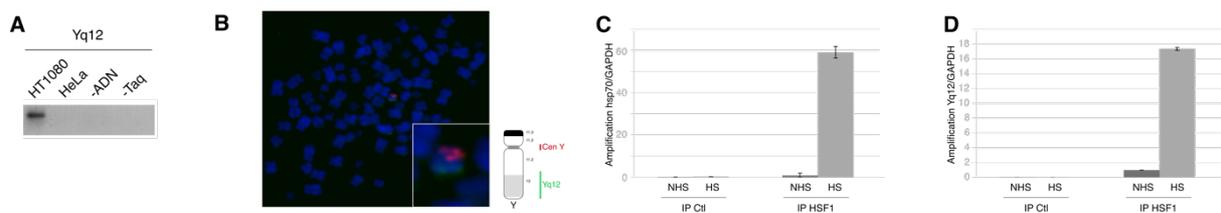
cible supplémentaire des foyers HSF1 dans les cellules humaines mâles. En effet qu'elles soient normales (amniocytes et fibroblastes primaires) ou tumorales (HT1080), toutes les cellules humaines mâles testées présentent des nSBs associés aux *loci* Yq12 [Fig 3.5]. En ce qui concerne la lignée HT1080, l'ensemble des granules HSF1 colocalisent avec la sonde DYZ1 [Fig 3.5].



**Fig 3.5. La région Yq12 est un site majeur de formation des nSBs dans les cellules humaines mâles.** Co-détection du facteur HSF1 par immunofluorescence (rouge) et des régions Yq12 par FISH ADN (vert) dans des cellules humaines mâles stressées. Les cellules normales (fibroblastes primaires (haut) et amniocytes (milieu)) ont été soumises à un stress de 1h à 45°C, les cellules tumorales HT1080 (bas) ont été soumises à un stress d'1h à 43°C. L'ADN est marqué au DAPI (bleu). Barre d'échelle : 15µm.

Enfin, nous avons confirmé par immunoprécipitation de chromatine (CHIP) que le facteur de transcription HSF1 se lie aux régions SATIII du chromosome Y. Cette analyse a été réalisée dans la lignée HT1080 car, dans ces cellules, HSF1 ne cible pas les répétitions SATIII de la région 9q12. Cette lignée constitue donc le modèle idéal, diminuant le risque de signaux non spécifiques. Pour amplifier les régions Yq12 immunoprécipitées, des amorces localisées à moins de 200pb d'une HSE ont été dessinées. Leur spécificité pour les cellules humaines mâles a été testée par PCR sur

des extraits génomiques de cellules HeLa et HT1080 : aucun amplicon n'est obtenu dans le cas des cellules HeLa [Fig 3.6, A]. Le produit amplifié correspond strictement à la région Yq12, comme on peut le voir par hybridation du produit de PCR (amplifié et biotinylé) sur des étalements de chromosomes métaphasiques de cellules HT1080. Détecté par de l'avidine couplé à un fluorophore, cette sonde cible uniquement le chromosome Y, lui-même identifié grâce à une sonde fluorescente spécifique de son centromère [Fig 3.6, B]. Les ChIP HSF1 ont été réalisées dans des cellules HT1080 stressées ou non 1 heure à 43°C. Leur efficacité a été contrôlée par l'analyse en qPCR de l'immunoprécipitation du promoteur du gène *hsp70*. Ces séquences sont amplifiées 60 fois dans les cellules stressées par rapport aux cellules non stressées. Ces résultats ont été normalisés avec la région promotrice du gène de la GADPH [Fig 3.6, C]. Dans les mêmes conditions, l'amplification de la région Yq12 est de 18 fois [Fig 3.6, D]. Aucun produit d'amplification ciblant les régions 9q12 n'est obtenu dans ces cellules (données non présentées).



**Fig 3.6. HSF1 se fixe aux régions Yq12 dans les cellules HT1080 stressées.** (A) La spécificité des amorces de qPCR pour les régions Yq12 a été testée par PCR sur de l'ADN génomique de cellules mâles (HT1080) ou femelles (HeLa). (B) Le produit d'amplification biotinylé (vert) a été cohybridé avec des séquences centomériques du chromosome Y (rouge) sur des étalements métaphasiques de cellules HT1080. (C-D) ChIP anti-HSF1 (IP HSF1) ou IgG contrôle (IP Ctl) dans des cellules HT1080 stressées 1 heure à 43°C (HS) ou non (NHS). Les séquences précipitées ont été amplifiées par qPCR avec des amorces *hsp70* (C) ou Yq12 (D).

Ainsi, ces résultats montrent pour la première fois que les foyers primaires d'HSF1 des cellules normales mâles sont également formés aux *loci* Yq12. La liaison d'HSF1 sur cette région a également été confirmée par ChIP dans les HT1080.

## 2. Les régions Yq12 sont activement transcrites en réponse au stress

Les résultats obtenus précédemment nous ont conduit à nous interroger sur l'importance et le rôle de la cible Yq12 dans les cellules humaines mâles. HSF1 et les autres acteurs des nSBs ont-ils la même affinité pour les régions Yq12 que pour les régions 9q12 ? Pour répondre à cette

question, l'évolution des nSBs a été étudiée *in situ* sur des cellules humaines mâles soumises à un stress thermique.

## **2.1. La région Yq12 est ciblée avec une plus grande efficacité par HSF1 que la région 9q12 lors de la HSR**

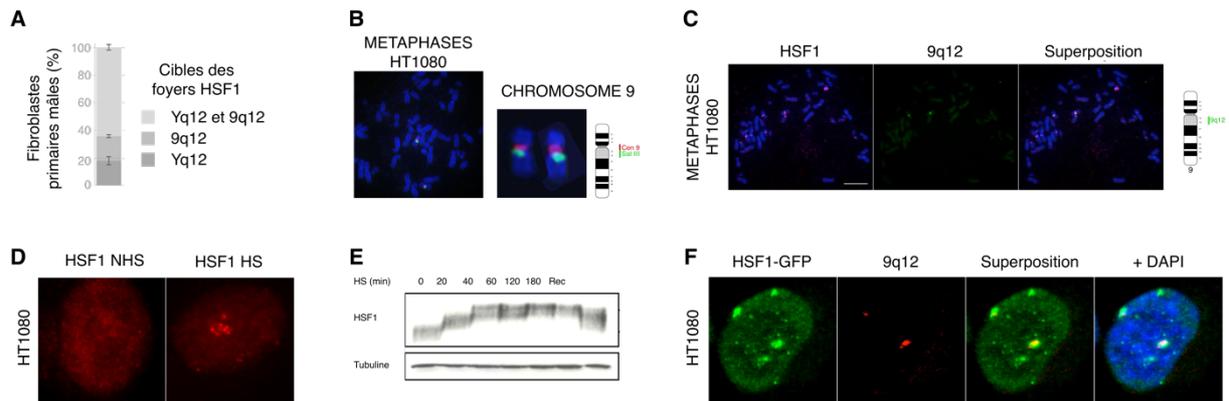
### **Les acteurs des nSBs ont au moins la même affinité pour la région Yq12 que pour la région 9q12 dans les fibroblastes primaires mâles**

Pour déterminer l'importance des régions Yq12 en tant que cibles du facteur HSF1, nous avons en premier lieu étudié la répartition des nSBs entre les régions 9q12 et Yq12 dans les fibroblastes primaires. Dès 1 heure de stress thermique à 45°C, une préférence pour le chromosome Y est visible. Plus de 80% des cellules possèdent à la fois des foyers HSF1 associés aux régions Yq12 et 9q12. Parmi les 20% de cellules présentant un foyer unique, 10% présentent un seul foyer sur la région 9q12 et 10% sur la région Yq12 [Fig 3.7, A]. Or nous nous attendons en principe à ce que les *loci* 9q12 soient deux fois plus ciblés que les Yq12 puisque ces régions représentent deux fois plus de cibles potentielles que les régions Yq12. Ce résultat suggère que la région Yq12 est une cible préférentielle pour la nucléation des foyers HSF1 dans les fibroblastes primaires mâles.

### **Le ciblage unique du chromosome Y dans la lignée HT1080 est complété par la surexpression d'HSF1**

La formation préférentielle des granules HSF1 sur le *locus* Yq12 au détriment des *loci* 9q12 est particulièrement manifeste dans la lignée HT1080, où la région 9q12 n'est jamais ciblée. Afin d'en comprendre la raison nous nous sommes en premier lieu intéressés à la capacité de leurs *loci* 9q12 à être ciblés par HSF1. Nous avons tout d'abord vérifié l'intégrité des régions 9q12 et leur capacité à fixer HSF1 *in vitro*. Pour cela des étalements métaphasiques de cellules HT1080 ont été incubées avec la sonde biotinylée pHuR98 spécifique des régions 9q12. DéTECTÉE avec de l'avidine couplée au FITC, la sonde reconnaît bien les *loci* 9q12 situés juste en dessous des centromères des chromosome 9, marqués en parallèle [Fig 3.7, B]. Une expérience de reconstitution de granules *in vitro* a ensuite été effectuée pour savoir si les régions 9q12 restent capables d'être ciblées par HSF1. Cette approche consiste à incuber une protéine HSF1 recombinante sur des chromosomes métaphasiques avant de la détecter par IF (Jolly et al., 2002). Dans ces conditions, le facteur HSF1 possède les mêmes capacités de liaison à l'ADN que le facteur HSF1 activé par un stress (Kroeger et al., 1993). Or HSF1 cible parfaitement les régions 9q12, le chromosome 9 étant repéré en parallèle par une sonde dirigée contre son centromère [Fig 3.7, C]. La séquence génétique de ces régions n'est pas la cause de la particularité des HT1080. Nous avons ensuite

voulu savoir si les régions 9q12 ont la capacité d'être ciblées *in situ* par HSF1. Ce facteur de transcription couplé à la GFP a donc été transfecté transitoirement puis la localisation des foyers formés lors de la HSR révélée par FISH ADN des régions 9q12. La surexpression de GFP-HSF1 conduit à la formation de nSBs sur les 9q12 des cellules HT1080 [Fig 3.7, F].



**Fig 3.7. Le facteur HSF1 a une affinité plus grande pour la région Yq12.** (A) Répartition des foyers nucléaires de stress dans des fibroblastes primaires mâles stressés 1 heure à 45°C. La quantification est réalisée à partir d'une immunofluorescence anti-HSF1 associée à une FISH ADN ciblant les loci 9q12 ou Yq12. Le pourcentage de cellules est obtenu sur 3 expériences indépendantes (n=150/condition). (B) FISH ADN des régions 9q12 (vert) et des centromères du chromosome 9 (rouge) sur des étalements métaphasiques de cellules HT1080. L'ADN est marqué au DAPI. (C) Reconstitution *in vitro* de granules par incubation d'une protéine HSF1 recombinante sur des étalements métaphasiques de cellules HT1080, visualisée par immunofluorescence anti-HSF1 (vert). Le chromosome 9 est identifié à l'aide d'une sonde spécifique du centromère du chromosome 9 (rouge). L'ADN est marqué au DAPI (bleu). (D) Détection du facteur HSF1 dans les cellules HT1080 non stressées (gauche) et stressées (droite) par immunofluorescence. (E) Analyse de la phosphorylation d'HSF1 par western blot. (F) La surexpression d'HSF1-GFP (vert) dans les cellules HT1080 stressées entraîne sa localisation aux loci 9q12 (rouge) visualisés par FISH ADN. L'ADN est marqué au DAPI (bleu).

Cette expérience nous a donc conduit à envisager qu'une différence du facteur HSF1 endogène pourrait causer l'absence de formation de foyers 9q12 dans ces cellules. Néanmoins le séquençage du facteur endogène à partir de cDNA de cellules HT1080 n'a montré aucune différence avec la séquence HSF1 donnée dans Gencode. L'analyse par Western Blot des variations du poids moléculaire d'HSF1 en réponse au stress thermique ne met pas non plus en évidence de différences de modifications post-traductionnelles en ce qui concerne son hyperphosphorylation ou son acétylation [Fig 3.7, E].

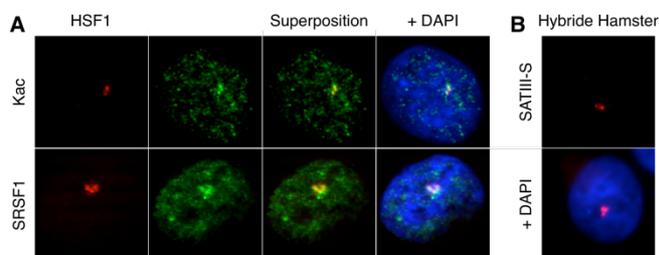
Bien que ces résultats n'excluent pas une différence de modifications post-traductionnelles d'HSF1 non détectée par les anticorps utilisés, une interprétation possible de la particularité de la lignée HT1080 pourrait être (i) une concentration trop faible d'HSF1 endogène, ou (ii) un ratio entre

HSF1 et son complexe inactivateur (HSP-HDAC6-VCP) plus bas que dans d'autres lignées. Ces deux situations (pouvant être complétée par la surexpression d'HSF1) conduiraient à une quantité d'HSF1 actif insuffisante pour cibler plusieurs *loci* de séquences répétées. Ces hypothèses sont renforcées par le fait que le nombre de cibles hétérochromatiques des nSBs est proportionnel à la concentration intracellulaire en HSF1 (Eymery et al., 2010).

Quelque soit l'hypothèse, nos travaux identifient les régions Yq12 comme des cibles majeures du facteur HSF1 en réponse à un stress thermique. Elles sont ciblées par HSF1 avec la même affinité que les régions 9q12 dans les fibroblastes primaires, voire même avec une meilleure affinité, ce qui est également observé dans les cellules mâles HT1080.

## 2.2. Les foyers HSF1 des régions Yq12 sont acétylés et transcrits à l'identique des régions 9q12

Sachant que les régions 9q12 sont transcriptionnellement actives, qu'en est-il des régions Yq12 ? L'évolution des foyers a été suivie par IF dans les cellules mâles et femelles afin de déterminer si ces nSBs ont les mêmes caractéristiques.

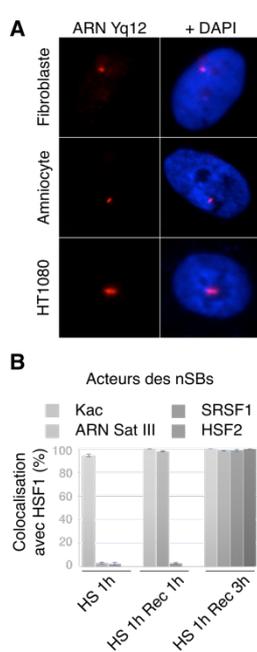


**Fig 3.8. La région Yq12 a la capacité d'être transcriptionnellement active.** Des cellules hybrides Homme/Hamster contenant la région Yq12 humaine ont été stressées 1h à 43°C. (A) Co-immunofluorescence du facteur HSF1 et des histones hyperacétylés (Kac) et d'un facteur d'épissage (SRSF1). (B) FISH ARN réalisé à partir d'une sonde spécifique des séquences ADN SATIII, présentes uniquement sur le chromosome humain.

Dans les cellules hybrides de hamster et la lignée HT1080 stressées 1 heure à 43°C, les foyers HSF1, situés sur les régions Yq12, colocalisent parfaitement avec des foyers d'histones hyperacétylés [Fig 3.8, A]. C'est également le cas avec un facteur régulateur d'épissage : le facteur SRSF1 recruté par les transcrits SATIII [Fig 3.8, A]. L'accumulation de ces transcrits a été mise en évidence par *hybridation in situ sur ARN* (FISH ARN) avec la sonde DYZ1 [Fig 3.8, B].

La même observation est faite dans les fibroblastes primaires et les amniocytes femelles et mâles stressés 1 heure à 45°C : tous les foyers colocalisent avec une hyperacétylation des histones.

L'accumulation de transcrits Yq12 en foyers est également détectée par FISH ARN avec la sonde DYZI [Fig 3.9, A]. De façon plus fine, on peut voir que tous les foyers (9q12 comme Yq12) des fibroblastes mâles présentent la même cinétique d'apparition et de disparition qui se caractérise par une hyperacétylation des histones à 1 heure de stress et une transcription massive associée au recrutement du facteur d'épissage SRSF1 après 3 heures de récupération [Fig 3.9, B]. Le facteur HSF2 est aussi présent après 3 heures de récupération à 37°C [Fig 3.9, B].

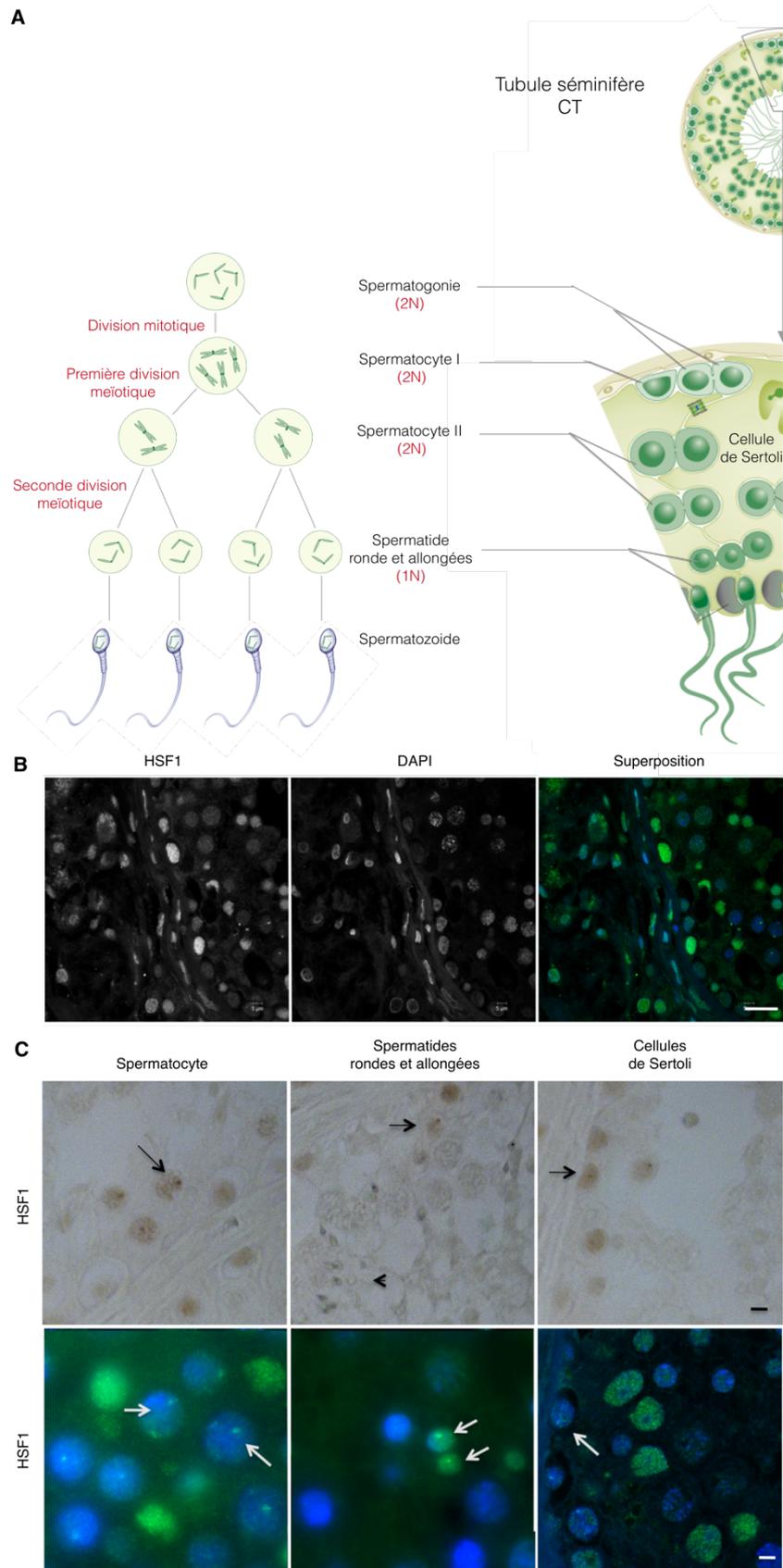


**Fig 3.9. Les régions Yq12 sont transcrites dans les cellules humaines mâles.** (A) Détection des transcrits Yq12 par FISH ARN dans des cellules mâles stressées soit 1h à 45°C pour les fibroblastes primaires et les amniocytes, soit 1h à 43°C pour les HT1080. (B) Quantification des acteurs présents au sein des nSBs dans les fibroblastes primaires mâles après 1h de stress à 45°C (HS 1h) et 1h (HS 1h Rec 1h) ou 3h (HS 1h Rec 3h) de récupération à 37°C. Les foyers ont été détectés par immunofluorescence anti-HSF1, anti-lysine acétylée, anti-SRSF1 ou anti HSF2. Les ARN SATIII-S sont détectés par FISH ARN.

Les foyers nucléaires de stress supplémentaires des cellules mâles, localisés aux régions Yq12, présentent donc la même cinétique d'activation que ceux formés aux régions 9q12 (Jolly et al., 2004; Rizzi et al., 2004). La fixation du facteur HSF1 est suivie d'une hyperacétylation des histones, d'une transcription induisant le recrutement de facteurs d'épissages et enfin de la formation de foyers HSF2 (Sandqvist et al., 2009).

### 3. HSF1 s'accumule *in vivo* sur les SATIII des régions 9q12 et Yq12 au cours de la gamétogénèse

Nous avons par la suite cherché à comprendre la relevance des nSBs *in vivo* chez l'Homme. Pour cela nous avons décidé d'étudier l'accumulation d'HSF1 sous forme de granules en condition



**Fig 3.10. HSF1 forme des foyers in vivo dans le tissu testiculaire humain. (A)** Représentation des différents stades cellulaires présents au cours de la spermatogénèse. **(B)** Immunofluorescence du facteur HSF1 (vert) dans des coupes transversales testiculaires humaines. L'ADN est marqué au DAPI (bleu). **(C)** Identification par Immunohistochimie (haut) et immunofluorescence (bas) des différents stades cellulaires où HSF1 s'accumule sous forme de foyers. Barre d'échelle : 5µm.

physiologique au sein du tissu testiculaire humain. Pour cette étude, une collaboration avec l'équipe de Valérie Mitchell à Montpellier a été établie.

Nous avons choisi ce tissu d'une part parce qu'HSF1 est connu pour y être transitoirement activé et jouer un rôle essentiel à la spermatogénèse des mammifères ainsi qu'à la fertilité mâle (Wang et al., 2004).. Et d'autre part parce que le tissu testiculaire est le seul tissu adulte sain dans lequel la présence de transcrits SATIII a été détectée (même si l'expression est anti-sens) (Eymery et al., 2009).

L'accumulation d'HSF1 au niveau du chromosome Y des spermatides rondes a également été observée chez la souris (Akerfelt et al., 2010). Uniquement présent au moment des méïoses I et II, il disparaît à partir des spermatides allongées. Cette accumulation correspond cependant à son ciblage et à sa régulation de gènes présents en multicopies sur le chromosome Y : les gènes SRY. Cette activation a lieu à un moment où la majorité de la chromatine est fortement réprimée.

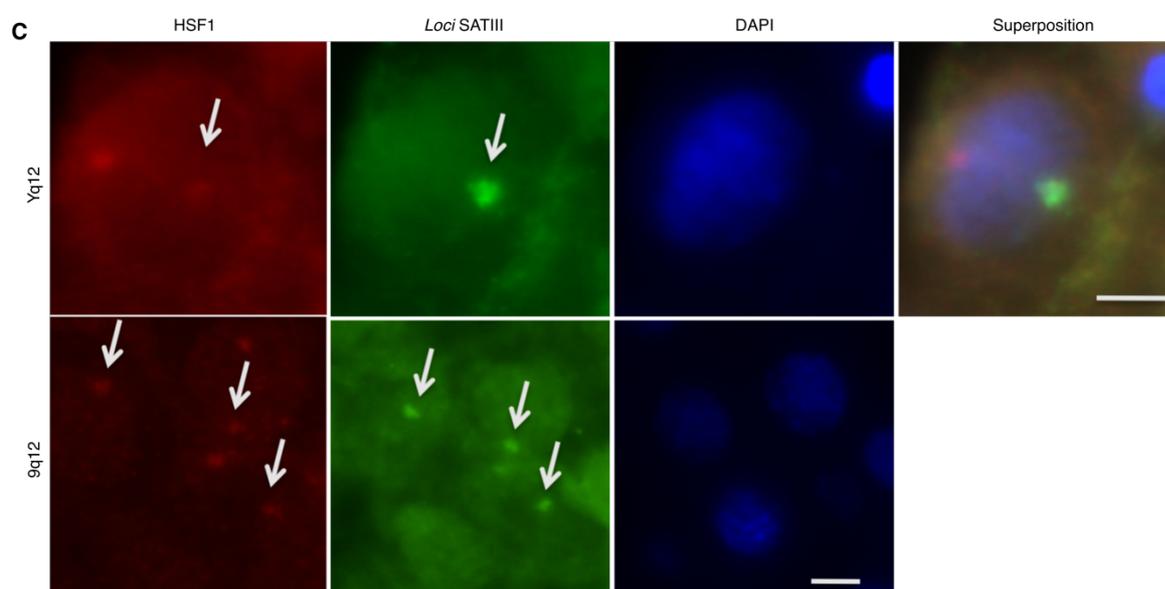
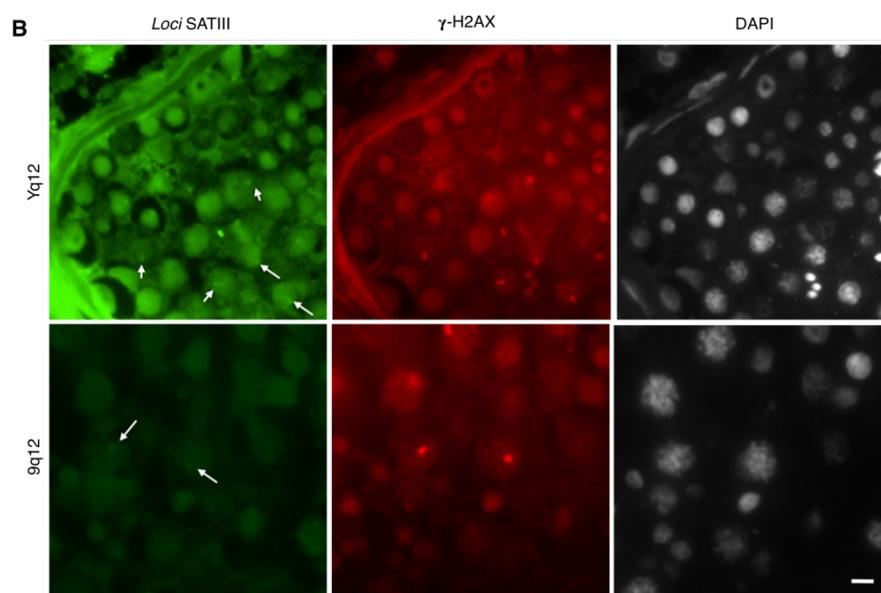
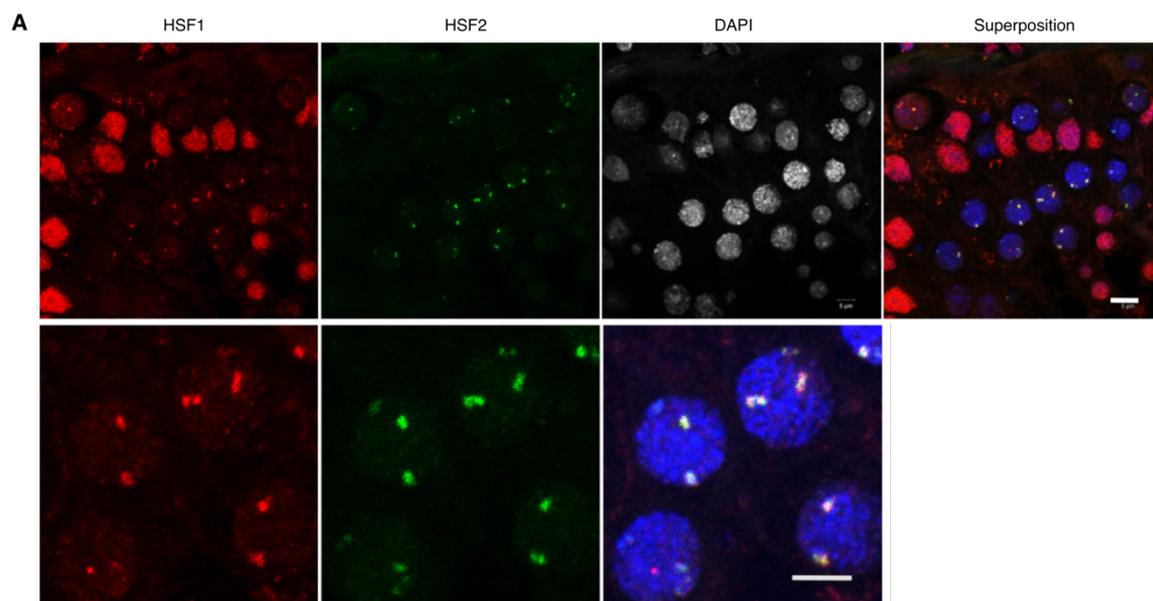
### **3.1. HSF1 forme des foyers dans les testicules humains**

Dans un premier temps nous avons observé la formation de foyers HSF1 et HSF2 dans le tissu testiculaire par une technique d'immunohistochimie. Ces foyers sont plus particulièrement détectés dans les spermatocytes et les spermatides rondes et allongées, à l'instar de ce qui est observé chez la souris. Ils sont également présents dans les cellules de Sertoli [Fig1.10, A]. Le nombre de foyers détectés dans ces cellules oscille entre un et trois, ce qui pourrait suggérer que les foyers HSF1 sont formés au niveau des *loci* SATIII 9q12 et Yq12, comme montré précédemment lors de la réponse au stress.

Dans un second temps, nous avons montré par IF qu'HSF1 colocalise avec HSF2 au sein de ces foyers, suggérant la formation d'hétérotrimères HSF1/HSF2 (El Fatimy et al., 2014; Sandqvist et al., 2009). Cette colocalisation est retrouvée dans tous les types cellulaires où les foyers HSF1 ont été préalablement observés : spermatocytes, spermatides rondes et cellules de Sertoli.

### **3.2. HSF1 cible les régions 9q12 et Yq12 dans les testicules humains**

Les résultats obtenus précédemment, combinés aux données de la littérature, suggèrent qu'HSF1 et HSF2 forment des foyers au niveau des loci 9q12 et Yq12 dans le tissu testiculaire. Cette



**Fig 3.11. HSF1 et HSF2 ciblent les loci 9q12 et Yq12 in vivo dans le tissu testiculaire humain.** Coupe transversale de tissu testiculaire humain dont l'ADN est marqué au DAPI. (A) Co-immunofluorescence des facteurs HSF1 (rouge) et HSF2 (vert). (B) Co-détection du facteur gamma-H2AX (rouge) par immunofluorescence et des loci Yq12 (haut) et 9q12 (bas) par FISH ADN (vert). (C) Co-détection des loci Yq12 et 9q12 par FISH ADN (vert) et du facteur HSF1 par immunofluorescence (rouge). Barre d'échelle : 5µm.

---

hypothèse a donc été testée par une codétection d'HSF1 en IF et des régions 9q2 et Yq12 en FISH ADN. La spécificité de la sonde Yq12 a été validée par une codétection avec  $\gamma$ -H2AX, présent sur ce chromosome au niveau de la vésicule sexuelle.

Comme dans le cas des fibroblastes primaires et des amniocytes mâles soumis à un stress thermique, des foyers HSF1 colocalisent avec la région 9q12 et avec la région Yq12 [Fig1.11]. A notre connaissance il s'agit de la première observation montrant l'existence de foyers HSF1 *in vivo* chez l'Homme. Ce résultat conforte également les données identifiant les régions Yq12 et 9q12 comme cibles majeures des foyers HSF1.

### **Conclusion**

A notre connaissance, il s'agit de la première description de l'existence d'une cible SATIII autre que la 9q12, identifiée comme cible primaire des foyers HSF1 lors de la HSR. Comme pour les loci 9q12, la fixation d'HSF1 sur les Yq12 induit l'hyperacétylation et la transcription de ces régions en ARN SATIII.

Cette observation est confortée par la présence de foyers HSF1/HSF2 sur ces deux cibles SATIII dans le tissu testiculaire humain. C'est également le premier report de foyers HSF1 sur les SATIII *in vivo* chez l'Homme. Ces foyers sont plus particulièrement retrouvés dans les spermatocytes, spermatides rondes et cellules de Sertoli, qui sont le siège de remodelages chromatiniens importants.

La présence d'une cible supplémentaire pour l'Homme a-t-elle une signification fonctionnelle particulière au regard de la réponse au stress cellulaire et dans le cadre de la spermatogénèse ? La nature même du chromosome ciblé a-t-elle une importance ? A l'inverse, est-ce uniquement le fait de transcrire l'une ou l'autre de ces régions péricentriques qui est importante en réponse au stress thermique ?

C'est au rôle de la transcription des régions péricentriques en réponse à un stress thermique que nous nous sommes intéressés dans la suite de ce travail.

## **II- La transcription des SATIII par HSF1 cause la perte de la structure hétérochromatique des régions 9q12 associée à une instabilité génomique**

Si les régions d'hétérochromatine constitutive ont longtemps été considérées comme totalement verrouillées à la transcription c'est parce qu'elles ne sont majoritairement transcrites qu'à *bas bruit*. Seule l'hétérochromatine constitutive localisée au niveau des régions péri-centriques semble avoir la capacité d'être massivement transcrite, et ce dans des conditions physiologiques particulières. Chez *Mus Musculus* cette transcription a lieu lorsque l'hétérochromatine péri-centrique nécessite d'être structurée, comme au moment du développement embryonnaire précoce. Les ARN issus de cette transcription participent à la mise en place de l'hétérochromatine en coopérant avec deux acteurs clés de l'hétérochromatine HPI et H3K9me3 (Probst et al., 2010 ; Santenard et al., 2010).

En raison de la difficulté à trouver un modèle d'étude adéquat, on ne sait pas si la transcription des régions péri-centriques est également nécessaire à la mise en place de l'hétérochromatine constitutive chez l'Homme (Biamonti & Vourc'h, 2010). Parce que l'hétérochromatine péri-centrique est massivement induite lors de la HSR, nous avons utilisé ce modèle pour mieux comprendre le lien entre sa transcription et les différents acteurs associés à l'hétérochromatine péri-centrique (Valgardsdottir et al., 2005). Puis nous nous sommes intéressés aux conséquences fonctionnelles de cette transcription massive lors de la HSR.

Nous avons dans un premier temps montré que la transcription des SATIII-S lors de la HSR cause la perte spécifique de l'hétérochromatine péri-centrique (HPI $\alpha$ , HPI $\beta$  et H3K9me3), la dissociant d'un rôle potentiel dans le maintien et à la mise en place de la structure d'hétérochromatine constitutive aux régions 9q12 au moment du stress. L'absence d'HPI $\alpha$ , HPI $\beta$  et H3K9me3e aux *loci* 9q12 est maintenue longtemps pendant la phase de récupération qui suit un stress. Cependant ces acteurs jouent un rôle clé dans la répression et/ou l'élimination des transcrits SATIII nucléaires présents dans les deux orientations. Nous pensons que les ARN SATIII-AS pourraient également participer à la remise en place des marques répressives aux régions péri-centriques, lors de la période de récupération à un stress. Enfin, par l'inhibition spécifique de la transcription des SATIII-S nous avons montré que cette transcription a des conséquences fonctionnelles extrêmement délétères pour les cellules. Dans les cellules tumorales elle conduit à des retards de mitoses

associés à l'accumulation de phénomènes d'instabilité génomique, dont une polyploïdie. L'accroissement d'instabilités génomiques médiée par la transcription des SATIII pourrait potentiellement expliquer la corrélation de ces ARN à de mauvais pronostics dans les cancers, via la sélection des cellules adaptées à une croissance anormale (Carone et al., 2013; Schwartzman et al., 2010; Ting et al., 2011). Mais dans les cellules normales l'accumulation des ARN SATIII pourrait être une réponse visant à bloquer la progression du cycle cellulaire le temps de réparer les dommages causés par un stress.

## **1. La transcription des SATIII en réponse au stress thermique induit la perte de la structure hétérochromatique des régions péri-centriques 9q12**

Lors de la HSR, les régions péri-centriques 9q12 sont hyperacétylées et fortement transcrites en lncARN SATIII-S (Jolly et al., 2004; Rizzi et al., 2004). Ces deux caractéristiques sont antinomiques à celles d'une structure d'hétérochromatine constitutive, caractérisée par la présence de la marque H3K9me3 et de facteurs associés HP1  $\alpha$  et  $\beta$  (Lachner et al., 2001). Au cours de ma thèse nous nous sommes donc intéressés au caractère hétérochromatique des régions péri-centriques ciblées par HSF1 en réponse à un stress. Pour cela nous nous sommes concentrés sur les acteurs majeurs de l'hétérochromatine constitutive : H3K9me3 et les facteurs HP1  $\alpha$  et  $\beta$ .

**Dans ces conditions nous avons cherché à comprendre quel est le statut et le rôle des acteurs de l'hétérochromatine constitutive dans la régulation des régions péri-centriques de type SATIII au cours du stress et de sa récupération ?**

### ***1.1. Le stress thermique entraîne une perte d'HP1 $\alpha$ et d'H3K9me3 spécifiquement aux régions péri-centriques 9q12***

Pour pouvoir ultérieurement comprendre le rôle des acteurs hétérochromatiques dans la régulation des nSBs nous avons en premier lieu confirmé leur enrichissement aux régions 9q12 dans des cellules non stressées. En effet des différences au sein des modifications épigénétiques entre les régions hétérochromatiques péri-centriques ciblées par HSF1 et celles qui ne le sont pas pourraient être à l'origine de leur ciblage préférentiel. D'autant plus que leur structure tridimensionnelle semble différer des autres régions péri-centriques. Une approche de sédimentation sur gradient de succrose a mis en évidence que les *loci* 9q12 comme Yq12 sont

les seules portions du génome humain composées d'ADN répété en tandem qui ne sont pas catégorisées comme des fibres d'ADN très compactes (Gilbert et al., 2004).

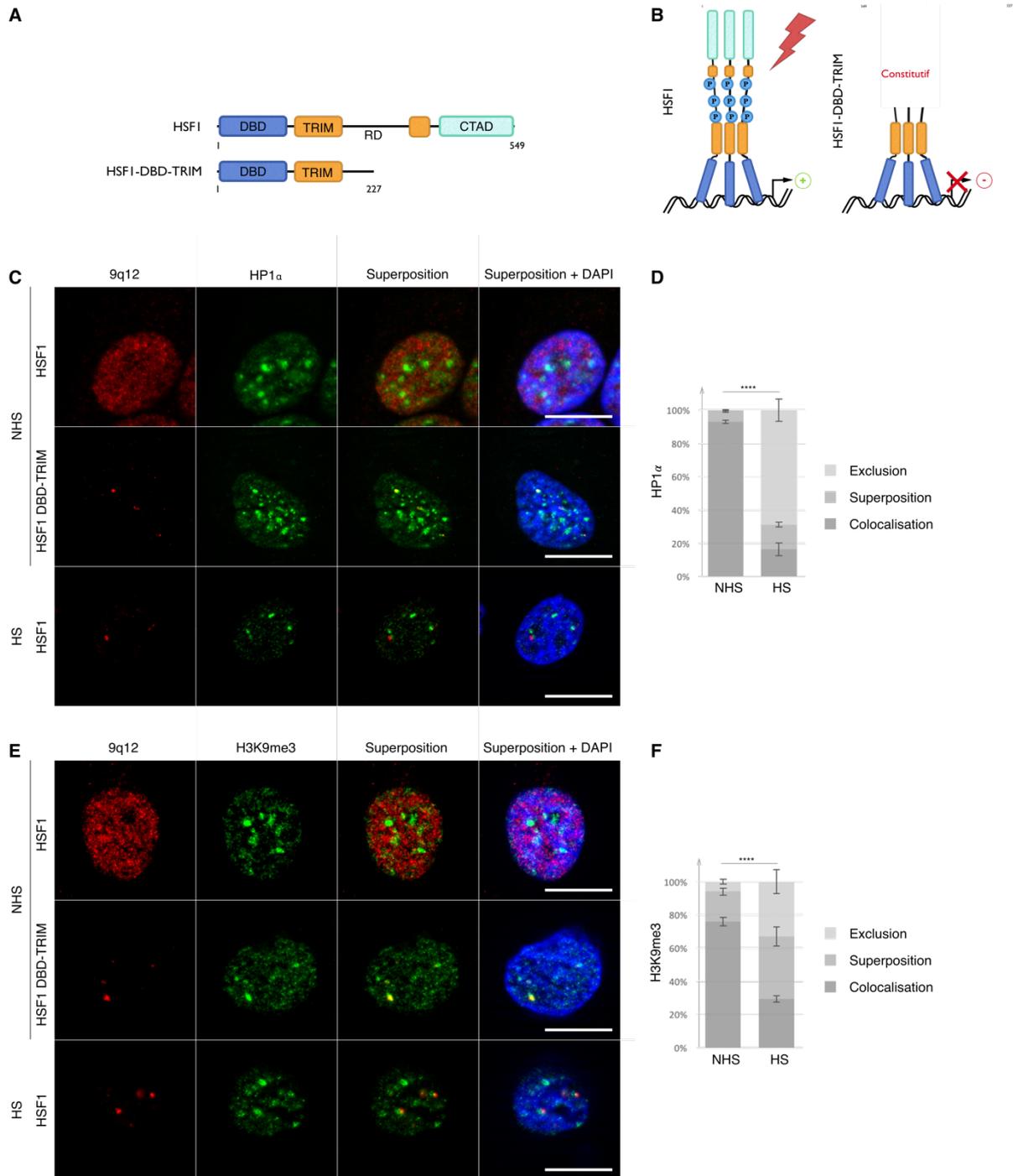
**Qu'en-est-il alors du statut épigénétique des régions 9q12 en absence de stress ?** Ces régions sont-elles enrichies en modifications des histones et acteurs spécifiques de l'hétérochromatine constitutive péricentrique ? Ou sont-elles caractérisées par la présence de marques différentes susceptibles de favoriser leur activation transcriptionnelle lors d'un stress ?

**Quel est également le statut épigénétique des régions 9q12 dans les cellules stressées ?** Observe-t-on une évolution des marques épigénétiques avant et après un stress ? Ces variations sont-elles spécifiques aux régions 9q12 transcrites lors de la HSR ?

### Les régions 9q12 perdent HPI $\alpha$ et H3K9me3 au cours du stress thermique

Pour commencer, nous avons entrepris la caractérisation du statut épigénétique de la chromatine péricentrique du *locus* 9q12 en conditions normales. Nous avons préféré une approche *in situ* afin de nous affranchir du problème de spécificité lié à la présence de répétitions de type SATIII sur un grand nombre de chromosomes qui ne sont pas les cibles d'HSFI. Le *locus* 9q12 a été visualisé dans les cellules non stressées grâce à la transfection transitoire d'un mutant de la protéine HSFI fusionné à la GFP, le mutant HSFI-DBD-TRIM (Jolly et al., 2004). En effet ce mutant correspond à la protéine HSFI déletée de ses domaines de régulation et d'activation [Fig 3.12, A], par conséquent, il forme constitutivement des trimères capables de se fixer à ses séquences cibles sans en activer la transcription [Fig 3.12, B]. Il agit également comme un dominant négatif dans les cellules stressées en empêchant la fixation de la protéine HSFI endogène.

C'est par cette approche, qui permet d'éviter l'étape de dénaturation de l'ADN associée aux FISH ADN, que nous avons déterminé par IF si HPI  $\alpha$  et H3K9me3 étaient localisés aux régions 9q12 dans des cellules HeLa non stressées [Fig 3.12, C à F]. La colocalisation, la superposition ou l'exclusion des foyers HSFI-DBD-TRIM et des marques de l'hétérochromatine constitutive ont été analysées à partir de sections optiques obtenues soit sur un microscope à épifluorescence associé à un module d'illumination structurée soit sur un microscope confocal. La quantification a ensuite été réalisée à partir des profils de fluorescence des protéines d'intérêt, sur 3 expériences indépendantes [Fig 3.12, C et E]. En absence de stress, les marques HPI  $\alpha$  et H3K9me3 colocalisent respectivement avec 93% et 76% des foyers HSFI-DBD-TRIM [Fig 3.12, D et F].



**Fig 3.12. Le locus 9q12 perd les marques caractéristiques de l'hétérochromatine constitutive en réponse au stress thermique.** Les régions 9q12 sont visualisées par l'immunofluorescence du facteur HSF1 endogène dans les cellules HeLa stressées 1 heure à 43°C (HS), ou du mutant HSF1-DBD-TRIM transfecté de façon transitoire dans les cellules non stressées (NHS). **(A)** Représentation des domaines des facteurs HSF1 (haut) et HSF1-DBD-TRIM (bas) qui est caractérisé par une déplétion des domaines de régulation (RD) et de transactivation (CTAD). Les domaines présents sont ceux responsables de la liaison à l'ADN (DBD) et de la trimérisation (TRIM). **(B)** Lorsqu'elle est activée, la protéine HSF1 forme des trimères qui lient les régions 9q12 et induisent leur transcription (gauche). Constitutivement, le mutant HSF1-DBD-TRIM trimérise et se lie aux régions 9q12, bloquant leur activation transcriptionnelle (droite). **(C à F)** L'enrichissement en HP1 alpha et H3K9me3 aux loci 9q12 a été analysé par immunofluorescence dans les cellules stressées ou non. Il n'y a pas de variations dans la distribution globale de ces deux marques hétérochromatiques lorsque les cellules sont transfectées avec le mutant HSF1-DBD-TRIM (rouge). La colocalisation, la superposition ou l'exclusion des foyers marquant les régions 9q12 à ceux d'HP1 alpha **(C et D)** et H3K9me3 **(E et F)** ont été quantifiées à partir de sections optiques réalisées grâce à un microscope à épifluorescence associé à un module apotome. Les analyses ont été réalisées sur 3 expériences indépendantes (n=150 loci par expérience). Barre d'échelle : 15  $\mu$ m.

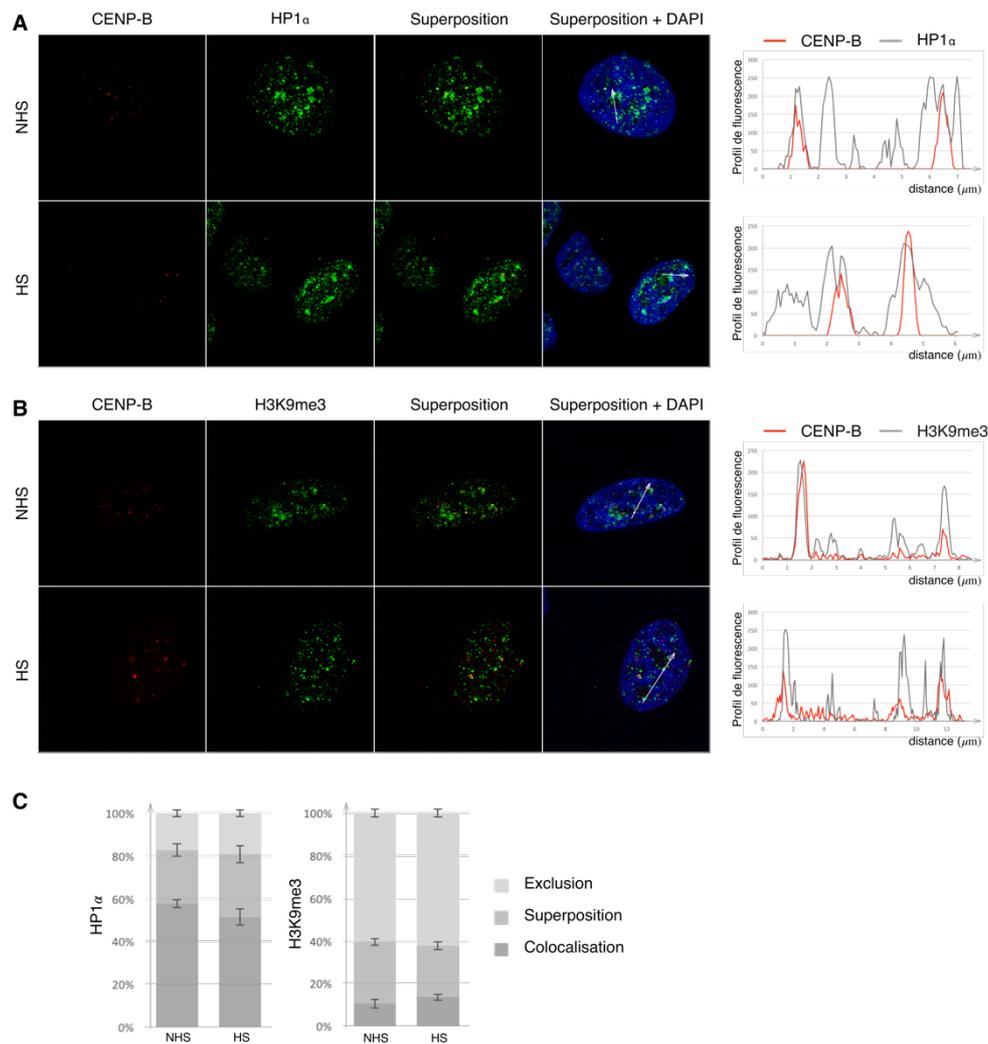
Dans l'équipe, la composition des modifications épigénétiques de la région 9q12 des cellules HeLa a été étudiée à plus large échelle [Annexe 2]. Le criblage des principales marques hétérochromatiques identifiées à ce jour met en avant l'absence de la marque H4K20me3 aux *loci* 9q12. Cependant l'absence de marque H4K20me3 ayant été également observée aux *loci* 1q12 non transcrits sous stress, l'absence de cette marque ne peut pas être considérée comme un élément déterminant du ciblage préférentiel des 9q12 par HSF1. Malgré l'absence d'H4K20me3, la présence d'H3K9me3 et d'HP1  $\alpha$  révèle le caractère hétérochromatique des *loci* 9q12 dans les cellules HeLa non stressées.

Sachant que l'activation du facteur HSF1 lors de la HSR conduit à l'accumulation de marques épigénétiques caractéristiques d'une chromatine transcriptionnellement active sur les régions 9q12, nous nous sommes interrogés sur le devenir des marques d'hétérochromatine constitutive dans ces conditions. L'enrichissement d'H3K9me3 et HP1  $\alpha$  aux régions péri-centriques ciblées par les nSBs a donc été déterminée par co-IF avec la protéine HSF1 endogène dans les cellules HeLa stressées 1 heure à 43°C. La colocalisation a ensuite été quantifiée sur les profils de fluorescence de trois expériences indépendantes obtenus comme décrit précédemment [Fig 3.12, C et E]. Seulement 17% et 30% des foyers HSF1 sont alors respectivement enrichis en HP1  $\alpha$  [Fig 3.12, D] et H3K9me3 [Fig 3.12, F].

Lors d'un stress thermique dans des cellules HeLa, la structure chromatinienne des régions 9q12 subit donc un changement drastique de statut chromatinien.

### **La perte d'HP1 $\alpha$ et H3K9me3 au cours du stress thermique est spécifique aux régions 9q12**

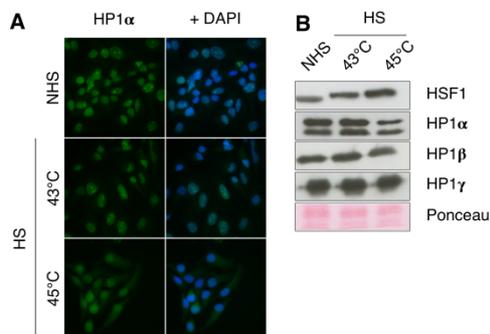
Selon les données de la littérature, en réponse à un stress thermique intense, les protéines HP1 diffusent globalement dans le noyau et perdent le marquage granulaire typique de leur localisation à l'hétérochromatine (Eymery et al., 2009; Velichko et al., 2011). De plus, les cellules soumises à un stress subissent un remodelage global de leur chromatine (Fritah et al., 2010). Cependant ce n'est pas ce qu'on observe dans les cellules HeLa soumises à un stress thermique modéré. Ces informations nous ont donc conduit à évaluer la spécificité de la perte des marques d'hétérochromatine constitutive au niveau des sites de nucléation des nSBs. **Est-ce une conséquence globale du stress thermique qui concerne toute l'hétérochromatine constitutive ? ou s'agit-il d'une réponse spécifique à ces régions, en lien avec leur activation transcriptionnelle par HSF1 ?**



**Fig 3.13.** L'enrichissement d'HP1 $\alpha$  et d'H3K9me3 aux régions enrichies en CENP-B ne diminue pas dans les cellules soumises à un stress thermique modéré. L'enrichissement en HP1 $\alpha$  (A) et H3K9me3 (B) au niveau des régions enrichies en CENP-B a été analysé par immunofluorescence dans des cellules HeLa contrôles (haut) ou stressées 1 heure à 43°C (bas). Les centromères ont été visualisés par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-CENP-B (rouge). (C) Les profils de fluorescence de CENP-B, d'HP1 $\alpha$  et d'H3K9me3 (vert) ont été réalisés au niveau des zones indiquées d'une flèche sur les images A et B (Superposition+DAPI). La colocalisation, la superposition, ou l'exclusion des marquages HP1 $\alpha$  (gauche) et H3K9me3 (droite) au niveau des foyers CENP-B sont quantifiées à partir de profils de fluorescence obtenus sur des sections optiques réalisées sur un microscope à épifluorescence associé à un module apotome. Les pourcentages et l'analyse statistique sont réalisés à partir de trois expériences indépendantes (n=150 loci par expérience).

Pour aborder ces questions nous nous sommes d'abord intéressés aux centromères qui, chez l'Homme, sont constitués d'un peu d'HP1 $\alpha$  et d'H3K9me3. Ces régions, non ciblées par HSFI, sont composées d' $\alpha$ -SAT ainsi que de protéines spécifiques comme CENP-B. Cette protéine a donc été codétectée par IF avec HP1 $\alpha$  ou H3K9me3, et la colocalisation analysée par les profils de fluorescence au sein de cellules HeLa stressées ou non 1 heure à 43°C [Fig 3.13, A et B]. Aucune variation des marques hétérochromatiques aux centromères n'a été détectée : au sein de ces cellules stressées ou non, environ 70% des foyers CENP-B sont colocalisés ou superposés à ceux d'HP1 $\alpha$ . C'est le cas de 40% d'entre eux en ce qui concerne H3K9me3 [Fig 3.12, C]. D'autres

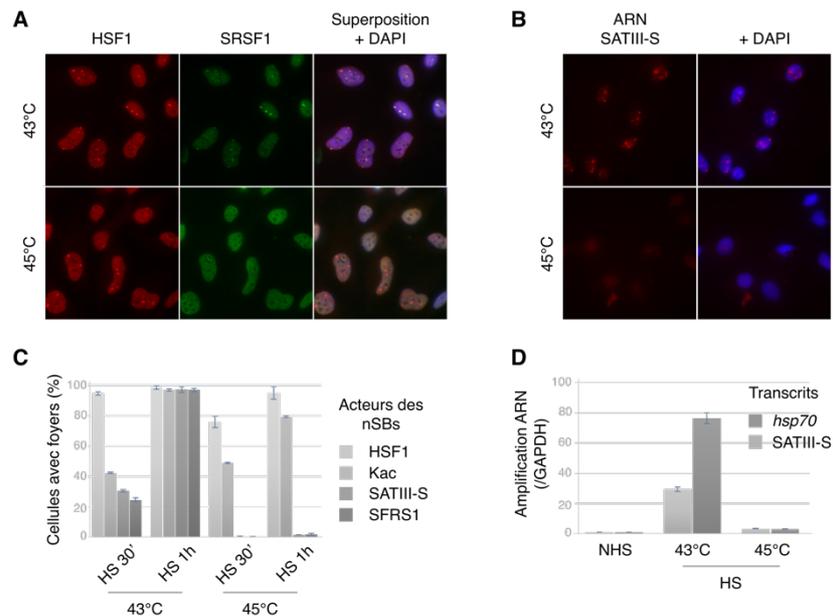
résultats de l'équipe montrent de même que les régions d'hétérochromatine péricentrique 1q12, également non ciblées par HSF1, conservent la marque H3K9me3 au cours d'un stress [Annexe 2].



**Fig 3.14. La distribution d'HPI varie en fonction de l'intensité des stress auxquels les cellules sont soumises. (A)** Immunofluorescence anti-HP1 alpha (vert) dans des cellules HeLa stressées 1 heure à 43°C ou 45°C (HS) ou contrôles (NHS). L'ADN est marqué au DAPI (bleu). **(B)** Extraits chromatiniens de cellules HeLa stressées 1 heure à 43°C ou 45°C (HS) ou contrôles (NHS), analysés par western Blot anti-HP1 alpha, anti-HP1 beta et anti-HP1 gamma. L'anti-HSF1 et le rouge ponceau ont été respectivement utilisés comme témoin positif de la réponse au stress et comme témoin de charge.

Ces résultats ne correspondent pas aux données de la littérature, dans lesquelles les protéines HP1 sont globalement diffuses dans le noyau en réponse à un stress sévère, toutefois ces données sont obtenues avec l'application d'un stress thermique à 45°C (Eymery et al., 2009; Velichko et al., 2011). Nous avons vérifié que dans nos mains, les mêmes résultats étaient reproduits et qu'effectivement HP1α diffusait globalement dans les cellules HeLa stressées à 45°C, mais pas à 43°C [Fig 3.14, A]. L'analyse en Western Blot des extraits chromatiniens des cellules HeLa ne montre cependant pas une variation importante d'association des différentes protéines HP1 avec la chromatine [Fig 3.14, B]. Il est à noter qu'à cette température élevée, aucune transcription n'a lieu dans les cellules HeLa [Fig 3.15, A, B], en dépit du fait qu'HSF1 s'accumule aux régions 9q12 et induise l'hyperacétylation de la chromatine [Fig 3.15, C]. Nos observations sont en accord avec les travaux du groupe de G. Biamonti, qui montrent une absence de transcription dans les cellules HeLa en-dessous 41°C et au-dessus de 44°C (Valgardsdottir et al., 2007). De même nous n'observons aucune accumulation de l'ARN Polymérase phospho-S2 et de SRSF1 par IF [Fig 3.15, A et C], ou encore de foyers d'ARN SATIII par FISH ARN [Fig 3.15, B et C], ou d'amplification des ARN par RT-qPCR [Fig 3.15, D]. C'est également le cas pour le gène hsp70, autre cible d'HSF1 lors de la HSR [Fig 3.15, D]. Toutes ses données arguent en faveur d'un problème général de fonctionnalité de la machinerie transcriptionnelle à 45°C, plutôt qu'à une réponse cellulaire au stress spécifique. HP1α retrouve le marquage granulaire caractéristique de sa présence à la chromatine au cours de la récupération des cellules soumise à un stress sévère à 45°C [Fig 3.16, A]. De façon intéressante, à la même période, les foyers nucléaires de stress deviennent

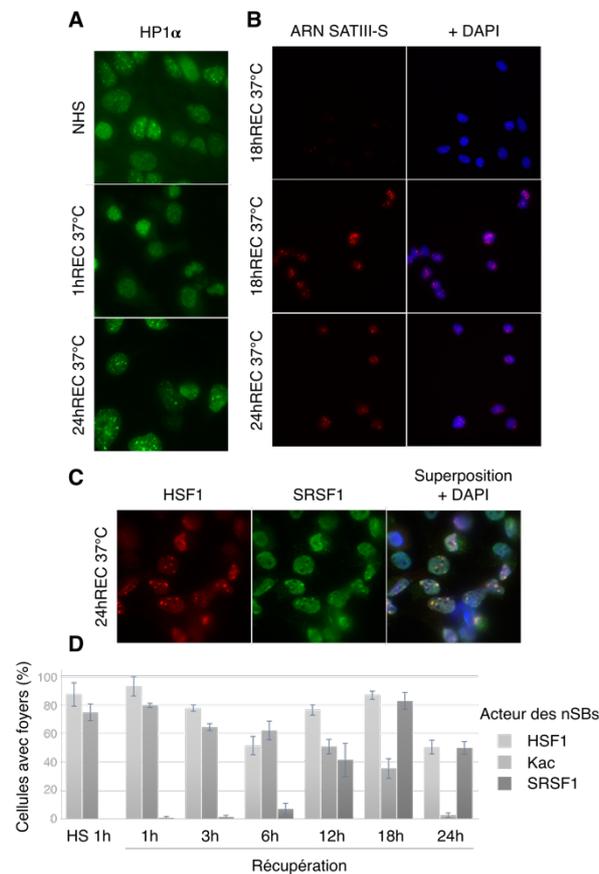
transcriptionnellement actifs, soit après une période de 18 - 20 heures de récupération après stress : les foyers SRSF1 ainsi que les transcrits SATIII apparaissent [Fig 3.16, B, C et D]. Toutefois HPI  $\alpha$  ne colocalise jamais avec les foyers HSF1. Ainsi, à l'instar de ce que nous observons à 43°C, il n'y a donc présence d'HPI  $\alpha$  aux régions péri-centriques 9q12 quand celles-ci sont transcrites.



**Fig 3.15. Les foyers HSF1 formés lors d'un stress thermique intense sont transcriptionnellement inactifs.** Les cellules HeLa ont été stressées 1 heure par un stress thermique modéré (43°C) ou intense (45°C). (A) Co-Immunofluorescence anti-HSF1 (rouge) et anti-SRSF1 (vert). (B) FISH ARN SATIII-S (rouge). (C) Quantification des analyses par immunofluorescence et par FISH ARN (en % de cellules avec foyers) des marqueurs d'intérêt des nSBs. Les analyses ont été réalisées sur 3 expériences indépendantes (n = 300 cellules par condition). (D) Quantification des transcrits SATIII-S et hsp70 par RT-qPCR. Les analyses ont été réalisées sur 3 expériences indépendantes.

Nous pouvons en conclure que des mécanismes différents ont lieu au bout d'1 heure de stress à 43°C ou à 45°C. A 43°C, HSF1 lie l'hétérochromatine péri-centrique et en induit l'activation transcriptionnelle, concomitante à la perte *locale* des marques HPI  $\alpha$  et H3K9me3. A 45°C, HSF1 est activé et fonctionnel, ce qui entraîne la formation des foyers hyperacétylés sur les 9q12. Cependant la machinerie transcriptionnelle et les protéines HPI  $\alpha$  présentent une altération globale, qui n'est réparée qu'après plusieurs heures de récupération. A ce moment seulement, les régions péri-centriques ciblées par HSF1 commencent à être transcrites, et les protéines HPI  $\alpha$  regagnent le reste de l'hétérochromatine, à l'exception des régions péri-centriques activées par HSF1. Pour la suite, nous avons choisi d'appliquer un stress thermique modéré, à 43°C, afin de

nous affranchir des biais possibles liés à une altération générale de l'organisation de l'hétérochromatine et de la machinerie transcriptionnelle.



**Fig 3.16. Les cellules soumises à un stress thermique intense transcrivent les SATIII-S lors de la récupération du stress.** (A) Immunofluorescence anti-HP1 alpha sur des cellules HeLa contrôles (haut) ou stressées (milieu) puis incubées 24 heures à 37°C (bas). (B) FISH ARN SATIII-S (rouge) sur des cellules HeLa contrôles (haut), ou soumises à un stress d'1 heure à 45°C suivi ou non d'une période de récupération de 18 (milieu) ou 24 (bas) heures à 37°C. (C) Co-immunofluorescence anti-HSF1 (rouge) et anti-SRSF1 (vert) dans des cellules HeLa soumises à un stress thermique d'1 heure à 45°C suivie d'une période de récupération de 24h à 37°C. (D) Evolution (en pourcentage) de différents marqueurs des nSBs par immunofluorescence dans les cellules Hela soumises ou non à un stress thermique et à une période de récupération à 37°C. L'analyse est réalisée sur 3 expériences indépendantes (n=300 cellules par expérience).

En conclusion, la transcription des SATIII-S au niveau des nSBs ne semble pas corrélée dans le temps au maintien ou à la mise en place d'hétérochromatine, comme observé chez *S.Pombe* ou *Mus Musculus* (Bühler et al., 2006; Probst et al., 2010; Santenard et al., 2010). Au contraire au moment de la transcription des SATIII, on observe une délocalisation d'H3K9me3 et d'HP1 $\alpha$ . La perte d'hétérochromatine étant limitée aux régions hétérochromatiques ciblées par HSF1, nous

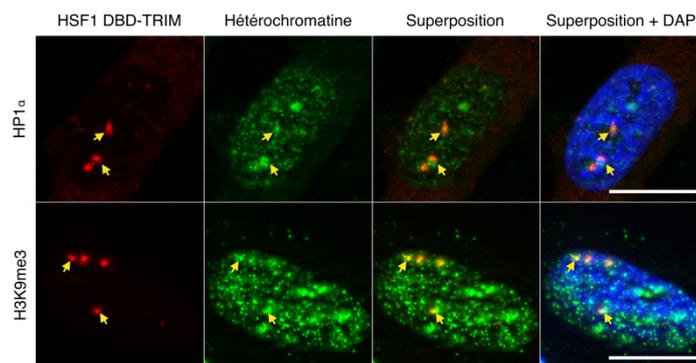
nous sommes ensuite intéressés à la caractérisation moléculaire des mécanismes associés à cette perte.

## **1.2 : La perte d'HP1 $\alpha$ et d'H3K9me3 aux régions 9q12 est dépend de la transcription des séquences SATIII par HSF1 dans les cellules stressées.**

La corrélation observée entre l'activation transcriptionnelle des SATIII par HSF1 et la perte des acteurs de l'hétérochromatine constitutive HP1 $\alpha$  et H3K9me3 aux régions péri-centriques pose la question des mécanismes impliqués : la perte des marques répressives est-elle une conséquence de l'activation transcriptionnelle de ces régions ou, à l'inverse, une ouverture locale et ciblée de l'hétérochromatine des 9q12 est-elle un prérequis nécessaire à leur activation par HSF1 ?

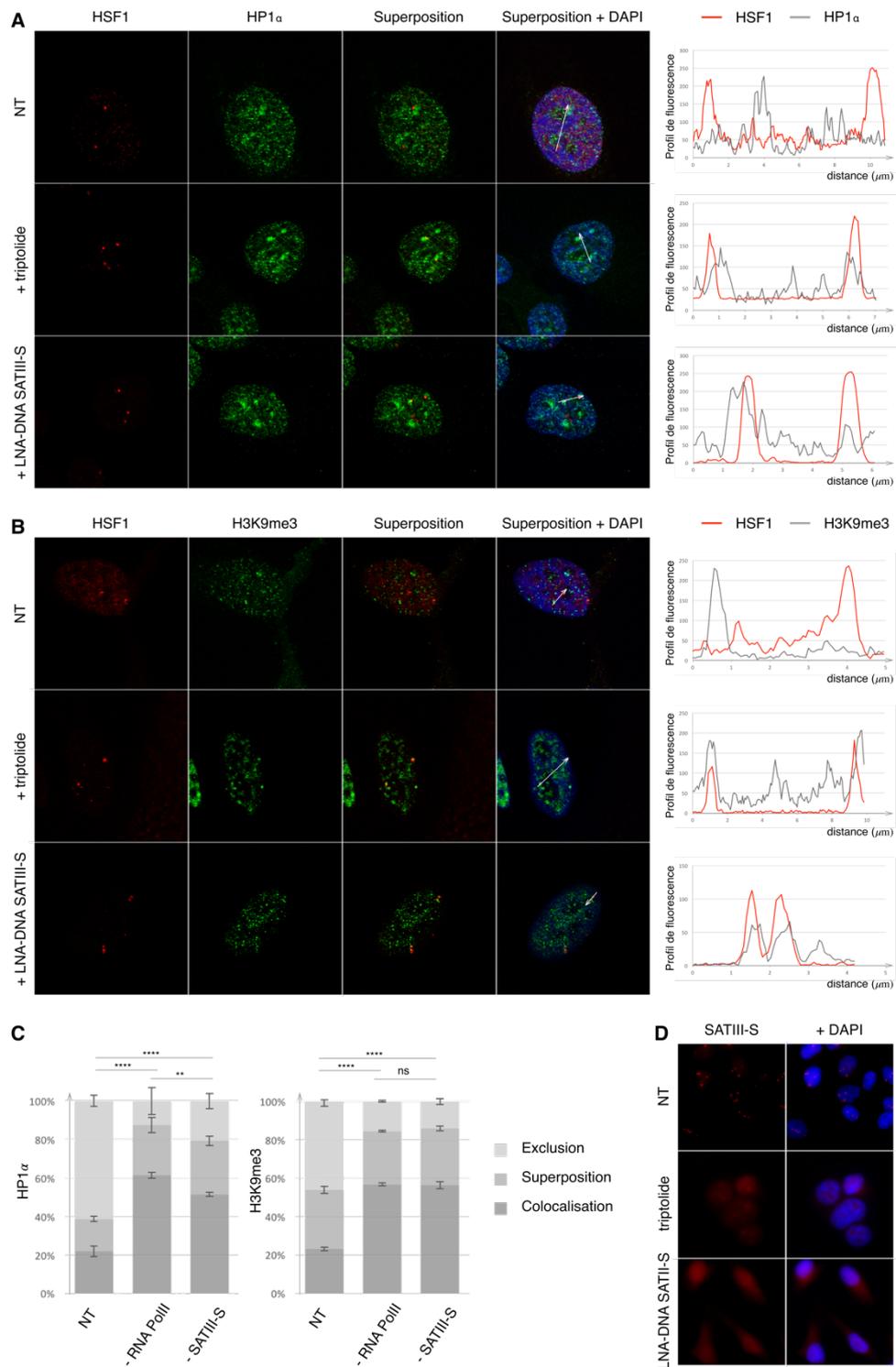
Afin d'aborder ces questions, nous avons conçu différentes expériences permettant d'inhiber le processus d'activation transcriptionnelle des SATIII à chaque étape (liaison d'HSF1, hyperacétylation des histones, recrutement de l'ARN PolIII, accumulation des ARN SATIII), et d'en analyser l'effet sur la perte des marques hétérochromatiques.

### La fixation d'HSF1 aux loci est nécessaire à la délocalisation d'HP1 $\alpha$ et H3K9me3



*Fig 3.17. La formation de foyers HSF1 fonctionnels est nécessaire à la perte des marques hétérochromatiques du locus 9q12 en réponse à un stress thermique modéré. Immunofluorescence (vert) anti-HP1alpha (haut) et anti-H3K9me3 (bas) dans des cellules HeLa transfectées de manière transitoire avec le mutant dominant négatif HSF1 DBD-TRIM (rouge) avant exposition à un stress d'1 heure à 43°C. Barre d'échelle : 15 $\mu$ m.*

Pour connaître l'implication d'HSF1 dans la perte des marques hétérochromatiques aux régions 9q12 nous avons étudié l'enrichissement en HP1 $\alpha$  ou H3K9me3 à ces loci dans des cellules HeLa



**Fig 3.18. La transcription des SATIII cause la perte d'HP1alpha et d'H3K9me3 au locus 9q12 en réponse à un stress thermique.** L'enrichissement en HP1alpha (A) et H3K9me3 (B) au niveau du locus 9q12 a été analysé par immunofluorescence dans des cellules HeLa contrôle ou stressées (haut), traitées ou non avec du triptolide (inhibiteur de l'ARN POLII) (milieu) ou avec des LNA-DNA SATIII-S capables de bloquer spécifiquement la transcription des ARN SATIII (bas). Le locus 9q12 est visualisé par immunofluorescence anti-HSF1 (rouge). Les profils de fluorescence (droite) d'HP1alpha et d'H3K9me3 (vert) correspondent à la zone indiquée d'un trait sur l'image (merge+DAPI). (C) La colocalisation, la superposition ou l'exclusion des marques HP1alpha (gauche) et H3K9me3 (droite) au locus 9q12 ont été quantifiées à partir de profils réalisés sur des sections optiques obtenues avec un microscope à épifluorescence associé à un module apotome. L'analyse a été réalisée à partir de 3 expériences indépendantes (n=150 loci par expérience). (D) Contrôle de l'efficacité des traitements triptolide (milieu) et LNA-DNA SATIII-S (bas) sur l'accumulation d'ARN SATIII-S par FISH ARN (rouge) dans des HeLa stressées 1 heure à 43°C. L'ADN est marqué au DAPI (bleu).

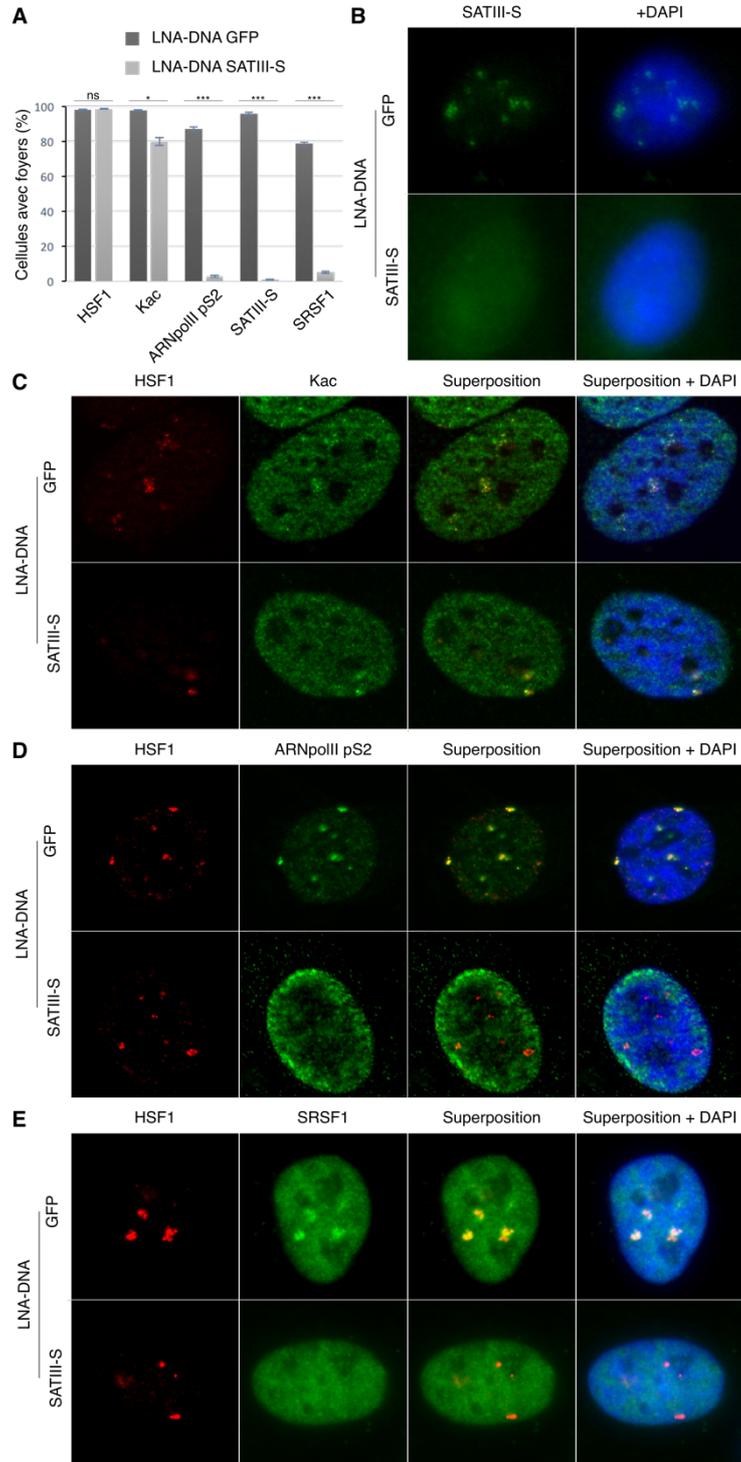
transfectées avec le mutant HSF1-DBD-TRIM fusionné à la GFP. Ce mutant agit comme un dominant négatif en empêchant la fixation du facteur HSF1 endogène aux *loci* 9q12 des cellules stressées. Les foyers HSF1-DBD-TRIM inhibent la perte d'HP1 $\alpha$  et d'H3K9me3 aux *loci* 9q12 lors de la HSR à 43°C [Fig 4.17]. Ce résultat indique que la fixation du facteur HSF1 aux *loci* 9q12 lors de la HSR est la cause de la perte des marques hétérochromatiques. La délocalisation des facteurs HP1 n'est pas un prérequis à la fixation d'HSF1.

### **L'activité transcriptionnelle de l'ARN POLII est nécessaire à la délocalisation d'HP1 $\alpha$ et H3K9me3**

Nous avons ensuite étudié la localisation d'HP1 $\alpha$  et d'H3K9me3 dans des cellules HeLa stressées traitées avec une drogue qui inhibe l'étape d'initiation transcriptionnelle de l'ARN PolII : le triptolide (Bensaude, 2011). L'incubation des cellules avec 5mM de triptolide 5 minutes avant le début du stress inhibe totalement la transcription des SATIII-S sans empêcher la fixation d'HSF1 ni l'hyperacétylation des régions SATIII [Fig 3.18, D]. Les profils de fluorescences d'HSF1 et HP1 $\alpha$  ou H3K9me3 ont été analysés dans des cellules HeLa stressées 1 heure à 43°C et incubées ou non avec du triptolide [Fig 3.18, A et B]. La quantification est réalisée sur trois expériences indépendantes. Par un traitement triptolide on diminue la perte des marques hétérochromatiques des cellules stressées, avec environ 60% des foyers HSF1 qui restent enrichis en HP1 $\alpha$  ou H3K9me3 [Fig 3.18, C]. Ces résultats signifient que ce n'est pas la fixation d'HSF1, ni l'hyperacétylation locale de la chromatine, qui entraînent la perte des marques d'hétérochromatine constitutive des régions péri-centriques 9q12 lors de la HSR : l'activité de l'ARN PolII, et donc probablement la transcription de ces régions, est requise.

### **La transcription des régions SATIII est nécessaire à la délocalisation d'HP1 $\alpha$ et d'H3K9me3**

HP1 est une protéine qui se caractérise chez la levure *S.Pombe* comme chez *Mus Musculus* par sa capacité à se lier aux transcrits et aux marques H3K9me3 (Iida et al., 2008; Muchardt et al., 2002). Sa capacité de liaison aux ARN a été suggérée comme source de sa déstabilisation de sa liaison à H3K9me3, les deux étant décrits inconciliables (Keller et al., 2012). Dans ce contexte, nous avons cherché à évaluer le rôle des ARN SATIII dans la perte de liaison d'HP1 au *locus* 9q12 par une approche basée sur leur *Knock-Down* par l'utilisation de LNA gapmeRs. Ces LNA gapmeRs sont des oligonucléotides anti-sens modifiés qui conduisent à la dégradation des transcrits ciblés par l'intermédiaire de la RNaseH. Toutefois, les LNA-DNA ont également été suggérés comme capables d'affecter le recrutement de la machinerie transcriptionnelle sur la région ciblée. La co-détection, par IF, des différents acteurs des nSBs dans des HeLa stressées confirme en effet que les LNA-DNA SATIII-S bloquent totalement l'accumulation de l'ARN PolII phosphoS2 [Fig 3.19,



**Fig 3.19. Les LNA-DNA SATIII-S n'impactent pas les acteurs recrutés en amont de la transcription des nSBs.** Les cellules HeLa incubées avec des LNA-DNA SATIII-S ou avec des LNA-DNA GFP contrôles ont été soumises à un stress thermique d'1 heure à 43°C. **(A)** Quantification (en pourcentages) des cellules formant des foyers nucléaires enrichis en HSF1, histones acétylées (Kac), ARN PolIII pS2, ARN SATIII-S et SRSF1 déterminés par immunofluorescence et FISH ARN. Images de cellules avec des foyers HSF1 (rouges) **(C, D, E)**, enrichis en transcrits SATIII-S **(B)**, histones acétylés **(C)**, ARN PolIII pS2 **(D)** et SRSF1 **(E)**. L'ADN est également marqué au DAPI (bleu). L'analyse a été réalisée sur 3 expériences indépendantes (n=150 pour chaque expérience).

D], des transcrits SATIII-S [Fig 3.19, B] et par conséquent celle du facteur régulateur d'épissage SRSF1 [Fig 3.19, E] au niveau des foyers HSF1 [Fig 3.19, A]. Ce qui n'est pas le cas des LNA-DNA contrôles dirigés contre la GFP (LNA-DNA GFP) [Fig 3.19, A]. Les LNA-DNA SATIII-S comme les LNA-DNA GFP n'ont en revanche aucun impact sur le nombre de foyers HSF1 et sur leur hyperacétylation [Fig 3.19, A et C]. De ce fait, cette approche ne nous permet pas de différencier un rôle possible des transcrits eux-mêmes de celui de l'ARN PolIII, mais elle nous permet tout de même de bloquer d'une manière très spécifique la transcription des SATIII.

Des résultats identiques à ceux obtenus avec le triptolide ont été obtenus, avec la persistance d'une colocalisation d'HPI $\alpha$  et H3K9me3 pour environ 50% des foyers HSF1 [Fig 3.18, C]. La transcription des régions SATIII est donc directement impliquée dans la perte de l'hétérochromatine en réponse au stress au niveau des régions 9q12. La seule fixation du facteur HSF1 et l'hyperactétylation des foyers ne sont pas des critères suffisants à cette délocalisation.

## ***Conclusion***

La mise en place des nSBs dans les cellules HeLa entraîne un changement drastique de la structure des régions péri-centriques ciblées. En temps normal ces régions réprimées ont une structure compacte caractérisée par la présence d'HPI $\alpha$  et de la marque épigénétique H3K9me3 associée. Lors de la HSR, du fait de l'activation du facteur HSF1 qui se lie à ces régions, l'ensemble de cette structure est modifiée : les régions péri-centriques sont hyperacétylées et transcrites, ce qui entraîne une perte d'HPI $\alpha$  et d'H3K9me3. Les régions péri-centriques ne présentent plus le profil d'une chromatine caractéristique de l'hétérochromatine constitutive.

Deux grandes questions découlent de ces résultats.

- **Quand et comment les régions péri-centriques 9q12 recouvrent leur structure d'hétérochromatine caractéristique.** Nous nous retrouvons en effet dans un modèle unique permettant chez l'Homme d'étudier la remise en place d'hétérochromatine constitutive.

- Quelles sont les conséquences fonctionnelles de la perte de la structure hétérochromatique des régions péricentriques induite par l'activation transcriptionnelle des SATIII, en particulier sur la mitose des cellules stressées.

Ce sont deux questions qui seront abordées dans la suite de ce manuscrit.

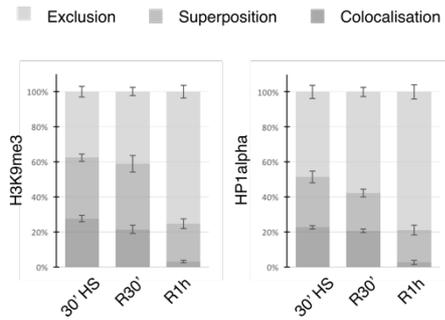
## **2. La remise en place d'hétérochromatine péricentrique a lieu très tardivement au cours de la récupération et implique les protéines HP1**

La perte des marques répressives associée à l'activation transcriptionnelle du *locus* 9q12 que nous observons dans les cellules stressées font de la HSR un modèle particulièrement pertinent pour comprendre, chez l'Homme, les mécanismes associés à la mise en place de l'hétérochromatine constitutive péricentrique, ainsi que les implications fonctionnelles associées à cette déstabilisation de l'hétérochromatine péricentrique.

### ***2.1 Caractérisation de la remise en place de l'hétérochromatine péricentrique au cours de la récupération du stress***

Avant d'adresser la question des acteurs et des mécanismes impliqués dans une potentielle reformation de l'hétérochromatine péricentrique au cours de la récupération, nous avons dans un premier temps cherché à établir la cinétique de disparition des ARN SATIII afin de corréler cette cinétique à la cinétique de retour des marques HP1  $\alpha$  et H3K9me3.

Jusqu'à présent les ARN SATIII-S ont été décrits comme de longs ARN non-codants exclusivement nucléaires de tailles variables. Selon les auteurs, leur taille serait comprise entre 2Kb et 5Kb, ou supérieure à 10Kb (Biamonti et al., 2010). Ils sont partiellement polyadénylés et contiennent des motifs connus pour le recrutement de facteurs régulateurs d'épissage (Valgardsdottir et al., 2005). Ces transcrits s'accumulent sous forme de foyers à leurs *loci* de transcription et sont extrêmement stables puisque dans des cellules HeLa ils sont toujours présents 24 heures après un stress de 1 heure à 43°C et ce malgré un blocage de la transcription au début de récupération du stress (Jolly et al., 2004).



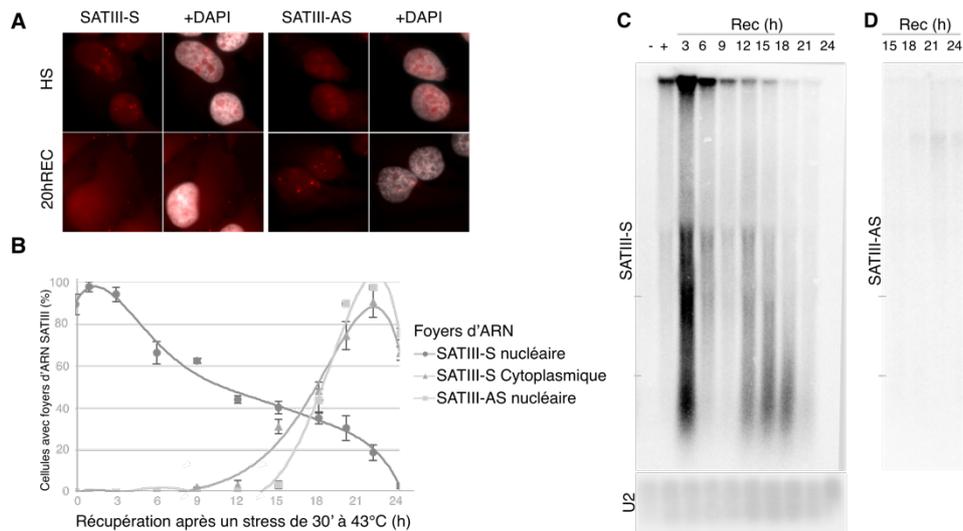
**Fig 3.20.** Un stress thermique modéré de 30 minutes est suffisant pour induire la perte d'H3K9me3 et HP1alpha aux régions 9q12. Des cellules HeLa ont été soumises à un stress thermique de 30 minutes à 43°C suivi ou non (30'HS) d'une période de récupération de 30 minutes (R30') ou 1 heure (R1h) à 37°C. La colocalisation, la superposition et l'exclusion d'HP1 alpha (gauche) et H3K9me3 (droite) aux régions 9q12 ont été détectées par immunofluorescence et analysées sur des profils réalisés sur des sections optiques obtenues par un microscope à épifluorescence équipé d'un module apotome. L'analyse a été réalisée à partir de 3 expériences indépendantes (n=150 loci par expérience).

Pour aborder la répression transcriptionnelle des SATIII nous nous sommes référés à la cinétique de disparition des foyers de transcrits SATIII-S. Nous avons déterminé la durée du stress et de la récupération à appliquer pour que ces foyers disparaissent de la totalité des noyaux, qui sont 24 heures de récupération après exposition des cellules à un stress modéré de 30 minutes à 43°C. Une fois ces conditions déterminées, nous avons en premier lieu confirmé, par IF, qu'elles suffisaient pour induire la perte des marques HP1  $\alpha$  et H3K9me3. Nos résultats montrent qu'après 30 minutes, 25% des foyers HSF1 sont encore enrichis en HP1  $\alpha$  et 20% sont encore enrichis en H3K9me3 [Fig 3.20]. Cette perte des marques hétérochromatiques augmente au cours de la récupération et moins de 5% des foyers HSF1 sont encore enrichis en HP1  $\alpha$  et H3K9me3 après 1 heure de récupération [Fig 3.20].

### L'élimination des transcrits SATIII-S

Une fois la perte de l'hétérochromatine constitutive vérifiée dans ces conditions de stress, nous avons commencé à caractériser la remise en place d'une structure répressive par l'étude de l'évolution des transcrits SATIII-S au cours de la récupération [Fig 3.21, B et C]. Comme le montre cette figure, le pourcentage de cellules possédant des foyers d'ARN SATIII-S détectés par FISH ARN augmente au cours de la récupération (97% des cellules marquées après 1 heure de récupération). Puis ce pourcentage diminue progressivement (24 heures après le stress, aucun foyer nucléaire de transcrits SATIII-S n'est détecté). En revanche, dès 12 heures de récupération, ces ARN s'accumulent au sein de petits foyers cytoplasmiques, ils sont présents dans plus de 90% des cellules à 21 heures de récupération [Fig 3.21, A, B]. Il s'agit ici de la première observation d'ARN SATIII-S en foyers cytoplasmiques. Nous avons donc cherché à caractériser ces ARN par Northern Blot, à partir d'extraits d'ARN totaux de cellules HeLa stressées et en récupération. Les transcrits SATIII-S nucléaires apparaissent comme de très longs ARN majoritairement détectés au niveau des puits de dépôts [Fig 3.21, C], mais également sous la forme d'une *trainée d'ARN* dont la taille diminue progressivement en récupération. Cependant, la totalité des cellules présentent des foyers d'ARN SATIII-S cytoplasmiques après 22 heures de récupération, très visibles par FISH

ARN, mais très peu d'ARN sont détectés par Northern Blot. Une possibilité serait que ces ARN soient présents sous forme de petits ARN invisibles dans les conditions d'électrophorèse utilisées. Pour conclure la taille des transcrits SATIII-S diminue au cours de la période de récupération, et cette diminution est associée à un passage d'une localisation nucléaire à une localisation cytoplasmique par des mécanismes qui restent à caractériser.



**Fig 3.21. Devenir des transcrits SATIII lors de la récupération à un stress.** (A) Les ARN SATIII-S (gauche) et SATIII-AS (droite) ont été détectés par FISH ARN dans des cellules HeLa stressées 30 minutes à 43°C (haut) puis soumises à une période de récupération. L'ADN est marqué au DAPI (gris). Les flèches indiquent les foyers d'ARN SATIII-S cytoplasmiques. (B) Quantification des foyers d'ARN SATIII-S nucléaires (marqueurs ronds), cytoplasmiques (marqueurs triangulaires) et d'ARN SATIII-AS (marqueurs carrés), visualisés par FISH ARN au cours de la récupération. Les pourcentages et les analyses statistiques ont été réalisés sur 3 expériences indépendantes (n=150 cellules). (C) Northern Blot SATIII-S réalisé à partir d'extraits ARN de cellules HeLa contrôle (-), ou stressées (+) puis soumises à une période de récupération (Rec) de 0 à 24 heures. Un témoin de charge U2 a été réalisé (bas). (D) Northern Blot SATIII-AS réalisé à partir d'extraits d'ARN de cellules HeLa soumises à un stress et à une période de récupération de 15 à 24 heures (Rec).

### L'accumulation de transcrits SATIII-AS

La période de développement embryonnaire précoce chez la souris est le contexte physiologique dans lequel l'expression de transcrits issus de l'hétérochromatine péricentrique a été le mieux caractérisée. Observée dès le stade 2 cellules, elle est essentielle à la mise en place de l'hétérochromatine du génome paternel (Jachowicz et al., 2013; Probst et al., 2010). Dans ce modèle une accumulation séquentielle de transcrits satellite sens et anti-sens est observée. Dans l'embryon, la localisation des transcrits satellite anti-sens (issus de la seconde vague temporelle d'accumulation) est corrélée à la présence de transcrits satellite sens (première vague temporelle d'accumulation) dans le cytoplasme (Probst et al., 2010). Nous avons donc voulu savoir si le

même phénomène se produisait dans notre modèle. A cette fin, des FISH ARN ciblant les ARN SATIII-AS ont été réalisées dans les cellules HeLa au cours de la période de stress et de récupération. Alors qu'ils sont totalement absents des cellules au moment du stress [Fig 4.21, A, *haut*], nous avons identifié pour la première fois la présence de transcrits anti-sens (ARN SATIII-AS) nucléaires, dont la cinétique d'accumulation nous permet de penser qu'ils se substituent progressivement aux foyers d'ARN SATIII-S nucléaires [Fig 3.21, A]. Le pourcentage de cellules présentant des foyers d'ARN SATIII-AS atteint un pic à 21 heures de récupération où plus de 95% des cellules présentent des foyers d'ARN SATIII-AS [Fig 3.21, B].

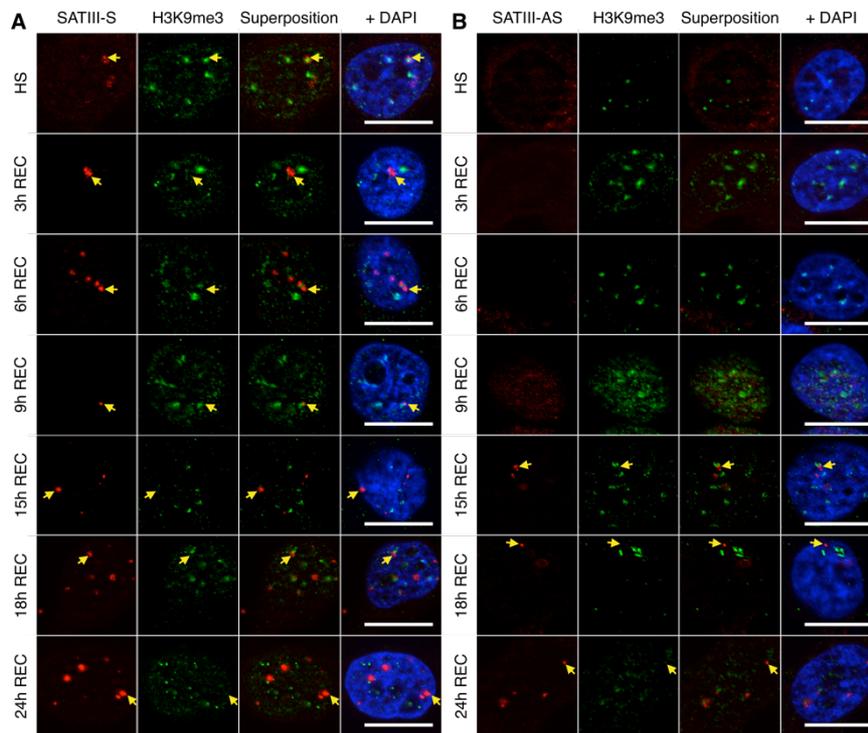
L'analyse par Northern Blot de la taille des transcrits SATIII-AS sur des extraits d'ARN totaux de cellules HeLa soumises à une période de récupération de 15 heures et 24 heures après stress montre que ces ARN se visualisent sous la forme d'une *trainée d'ARN* restreinte composée de transcrits dont la taille moyenne autour de 8Kb ne semble pas varier avec le temps [Fig 3.21, D].

#### Un enrichissement des acteurs répresseurs H3K9me3 et HPI $\alpha$ et $\beta$ n'est pas observé au niveau des régions 9q12 encore associées à des transcrits SATIII

La cinétique de remise en place des marques hétérochromatiques sur les régions 9q12 a été abordée *in situ* par des immuno-FISH ARN ciblant HPI  $\alpha$  ou H3K9me3 et les transcrits SATIII-S ou AS jusqu'à 24h de récupération. La présence des ARN SATIII permet une identification des régions 9q12. Cependant, dès lors que ces transcrits ne sont plus associés à ces *loci* une autre méthode est nécessaire pour détecter ces régions. Des outils basés sur l'exploitation des technologies TALEN ou CRISPR (dans lequel une GFP est fusionnée à l'enzyme cas9 inactivée par mutation) ont donc été développés. Néanmoins l'un comme l'autre entraînent une répression transcriptionnelle des *loci* péri-centriques et une certaine toxicité au moment du stress, les rendant difficilement exploitables pour l'étude de la récupération au stress. Des expériences d'immuno-FISH ADN sont en cours de développement dans l'équipe pour parer à ces difficultés.

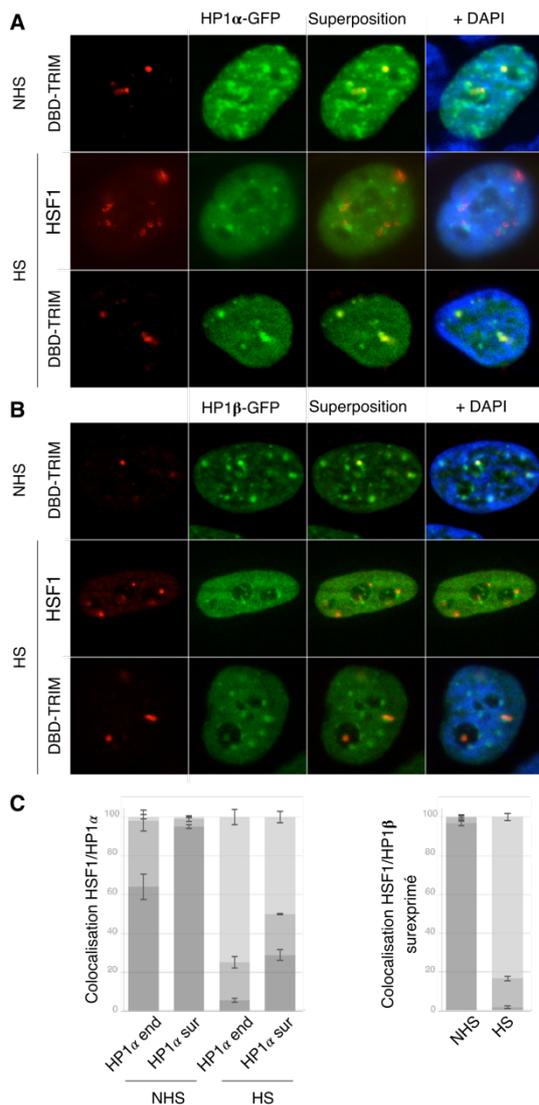
En ce qui concerne la marque H3K9me3, aucun enrichissement n'a été observé sur la base des approches d'immuno-FISH ARN avec les foyers d'ARN SATIII-S ou SATIII-AS. 15 heures de récupération après le stress quelques foyers d'ARN SATIII-S sont très légèrement associés à un signal H3K9me3 mais ils ne représentent que 1% du total [Fig 3.22, A]. La marque H3K9me3 reste donc globalement exclue des régions 9q12 dans les noyaux dans lesquels les transcrits SATIII-S ou SATIII-AS sont présents, du moins jusqu'à 24 heures de récupération [Fig 3.22, A et B]. A ce stade il n'est pas possible de dire à quel moment les marques hétérochromatiques se remettent en place. Nous pouvons néanmoins d'ores et déjà affirmer que cette remise en place se produit

après que les foyers d'ARN SATIII ont disparu des sites de transcription auxquels ils restent associés.



**Fig 3.22.** H3K9me3 ne colocalise pas avec les transcrits SATIII-S et SATIII-AS jusqu'à 24 heures de récupération. Co-détection d'H3K9me3 par immunofluorescence (vert) et des transcrits SATIII-S (A) et SATIII-AS (B) par FISH ARN (rouge) dans des cellules HeLa soumises à un stress de 30 minutes à 43°C ainsi qu'à une période de récupération à 37°C. L'ADN est marqué au DAPI (bleu). Barre d'échelle : 15 μm.

Dans le but de réaliser une étude comparable, nous avons souhaité codétecter la protéine HPI $\alpha$  endogène et les régions 9q12. Mais l'anticorps anti-HPI $\alpha$  ne fonctionnant pas en combinaison avec une FISH ARN, nous n'avons pas été techniquement en mesure de les co-détecter. Afin de contourner cette limitation, les protéines HPI $\alpha$ -GFP et HPI $\beta$ -GFP ont été exprimées par transfection transitoire dans des cellules HeLa. Dans un premier temps, nous avons vérifié que les protéines HPI surexprimées présentaient un comportement similaire aux protéines endogènes. La co-détection des protéines HPI $\alpha$ -GFP et HPI $\beta$ -GFP dans les cellules HeLa non stressées, transfectées avec le mutant HSF1-DBD-TRIM précédemment décrit, confirme la présence des protéines HPI aux régions 9q12 dans des conditions normales [Fig 3.23, A et B, *haut*], avec une colocalisation encore plus importante que la protéine endogène [Fig 3.23, C]. Dans des cellules



**Fig 3.23. HP1 $\alpha$  et HP1 $\beta$  surexprimés se comportent comme HP1 endogène en réponse à un stress thermique modéré.** L'enrichissement en HP1 $\alpha$ -GFP (A) et HP1 $\beta$ -GFP (B) au niveau des loci 9q12 a été évalué par immunofluorescence dans des cellules HeLa non stressées (haut), ou soumises à un stress d'1 heure à 43°C (milieu) transfectées ou non avec le mutant dominant négatif HSF1 DBD-TRIM (bas, rouge). Dans les cellules stressées, le locus 9q12 est visualisé par immunofluorescence anti-HSF1 (rouge). (C) La présence de foyers HP1 $\alpha$  endogènes (end) et HP1 $\alpha$ -GFP au locus 9q12, a été déterminée à partir de profils réalisés sur des sections optiques obtenues par un microscope à épifluorescence équipé d'un module apotome. Les pourcentages et l'analyse statistique ont été réalisés à partir de 3 expériences indépendantes (n=150 loci par expérience). (D) La même méthode a été appliquée pour quantifier l'enrichissement d'HP1 $\beta$ -GFP au locus 9q12.

stressées, HP1 $\alpha$ -GFP et HP1 $\beta$ -GFP ne colocalisent plus avec les régions 9q12 identifiées à l'aide d'une IF HSF1 [Fig 3.23]. Comme observé dans le cas de la protéine HP1 $\alpha$  endogène, les protéines HP1 surexprimées ne sont pas délocalisées des régions 9q12 lorsque la formation des nSBs est inhibée par l'expression du mutant dominant négatif HSF1-DBD-TRIM [Fig 3.23, A et B, bas]. Nos résultats montrent que cette délocalisation est maintenue jusqu'à des stades très tardifs de la récupération, puisque nous n'avons jamais pu observer de colocalisation entre HP1-GFP et les transcrits SATIII [Fig 3.24]. Ainsi, si HP1 se repositionne aux régions 9q12 en récupération tardive, cela ne se produit qu'après que les SATIII aient disparu du locus 9q12. Des expériences d'IF associées à des FISH ADN réalisées pour co-détecter HP1 et les régions 9q12 après disparition des transcrits sont actuellement mises au point dans l'équipe.

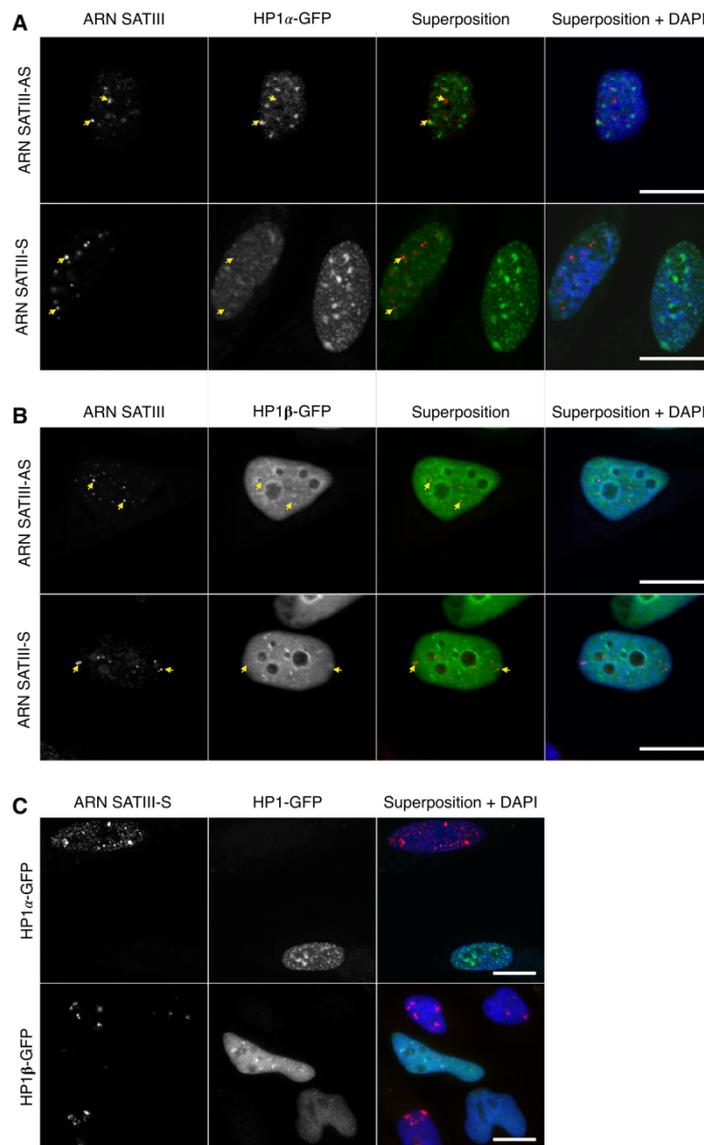
## **2.2. Rôle des protéines HP1 dans la remise en place de l'hétérochromatine péricentrique au cours de la récupération au stress**

Les protéines HP1 sont les protéines clefs de la mise en place et de la régulation de l'hétérochromatine constitutive (Fischer et al., 2009; Santenard et al., 2010). Même si elles ne colocalisent jamais avec les transcrits SATIII-S ou SATIII-AS, nous avons recherché **l'impact des protéines HP1 $\alpha$  et HP1 $\beta$  sur la régulation de l'hétérochromatine péricentrique, en analysant l'effet de la surexpression ou du *Knock Down* de ces acteurs sur la régulation transcriptionnelle des régions SATIII au cours du stress et de la période de récupération.**

### **La surexpression d'HP1 $\alpha$ -GFP et HP1 $\beta$ -GFP conduit à une disparition précoce des foyers de transcrits SATIII lors la période de récupération à un stress**

Compte tenu du fait que les foyers formés par HP1 $\alpha$ -GFP et HP1 $\beta$ -GFP ne sont jamais localisés aux *loci* où s'accumulent les ARN SATIII, il est difficile de conclure que les transcrits SATIII-S comme SATIII-AS, jouent un rôle direct dans la reformation de l'hétérochromatine via le recrutement des protéines HP1 aux régions 9q12, comme il a été montré pour l'hétérochromatine péricentrique d'autres espèces (Bien que nous ne puissions exclure cependant qu'un faible niveau de transcrits, non détectables par FISH ARN, participe à la remise en place d'HP1). Néanmoins les protéines HP1 restent les facteurs clefs de la répression transcriptionnelle de l'hétérochromatine constitutive et de sa propagation (Keller et al., 2012; Schotta et al., 2002). Afin d'évaluer leur rôle dans le contrôle transcriptionnel des régions SATIII nous avons analysé la cinétique d'élimination des ARN SATIII-S et SATIII-AS dans des cellules normales qui surexpriment HP1 $\alpha$ -GFP et HP1 $\beta$ -GFP. En accord avec le rôle de ces facteurs à l'hétérochromatine péricentrique, leur surexpression modifie à la fois les cinétiques d'accumulation et d'élimination des ARN SATIII.

En effet la surexpression d'HP1 $\alpha$ -GFP, comme d'HP1 $\beta$ -GFP, conduit à une nette diminution du nombre de cellules avec des foyers nucléaires d'ARN SATIII-S : après 15 heures de récupération, moins de 10% des cellules possèdent encore des foyers de transcrits SATIII-S nucléaires, contre 40% des cellules contrôles [Fig 3.24]. Les SATIII-S cytoplasmiques ne sont quant à eux pas même détectés dans les cellules transfectées [Fig 3.24]. La même observation s'applique également aux transcrits SATIII-AS qui sont plus rarement détectés (4 fois moins que dans les cellules contrôles à 18 heures de récupération) [Fig 3.24]. Ainsi, même si à aucun moment un retour de HP1 sur les *loci* 9q12 n'a pu être mis en évidence, la surexpression d'HP1 $\alpha$ -GFP ou



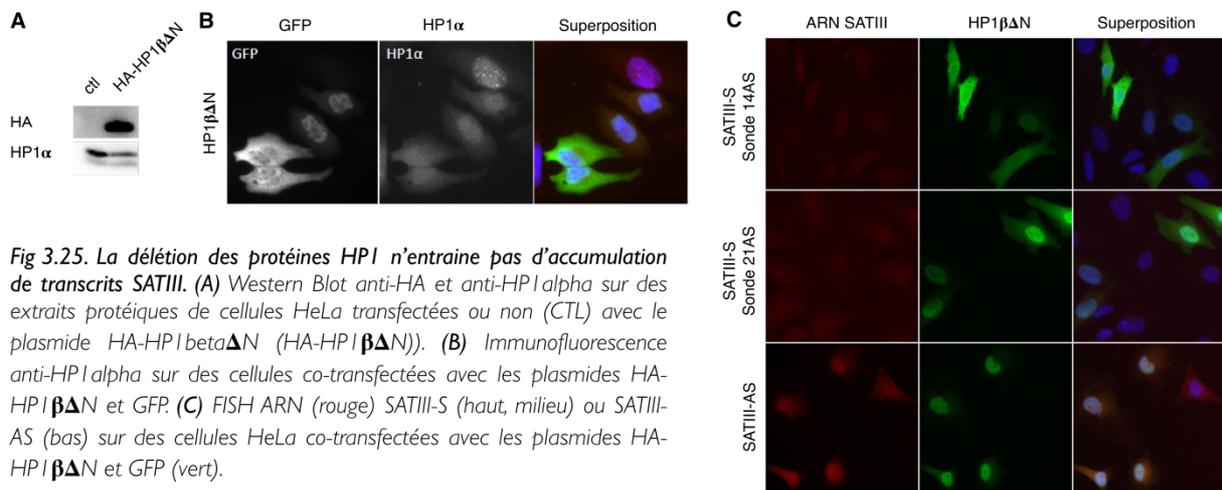
**Fig 3.24. HP1 alpha et beta régulent l'accumulation des ARN SATIII en foyers nucléaires, mais n'y sont pas localisés.** L'enrichissement des facteurs HP1 alpha-GFP (A) ou HP1 beta-GFP (B) aux foyers d'ARN SATIII-S (haut) et SATIII-AS (bas) a été analysé dans des cellules HeLa transfectées de façon transitoire. 20 heures de récupération après un stress de 30 minutes à 43°C les foyers d'ARN SATIII détectés par FISH ARN (rouge) ne colocalisent pas avec les deux facteurs HP1 fusionnés à la GFP (vert). Les flèches jaunes indiquent des foyers d'ARN SATIII qui ne sont pas enrichis en HP1. Les transcrits SATIII-S (haut) et SATIII-AS (bas) sont utilisés pour localiser les régions 9q12. (C) La surexpression d'HP1 alpha-GFP (haut) et HP1 beta-GFP (bas) accélère l'élimination des foyers d'ARN SATIII. L'ADN est marqué au DAPI (bleu). Barre d'échelle : 15 $\mu$ m.

HP1 $\beta$ -GFP a permis de montrer de manière indirecte que ces deux acteurs interviennent dans la répression transcriptionnelle et/ou dans l'élimination des transcrits SATIII-S et SATIII-AS.

### Le Knock Down des protéines HP1 induit l'accumulation précoce de foyers de transcrits SATIII-AS

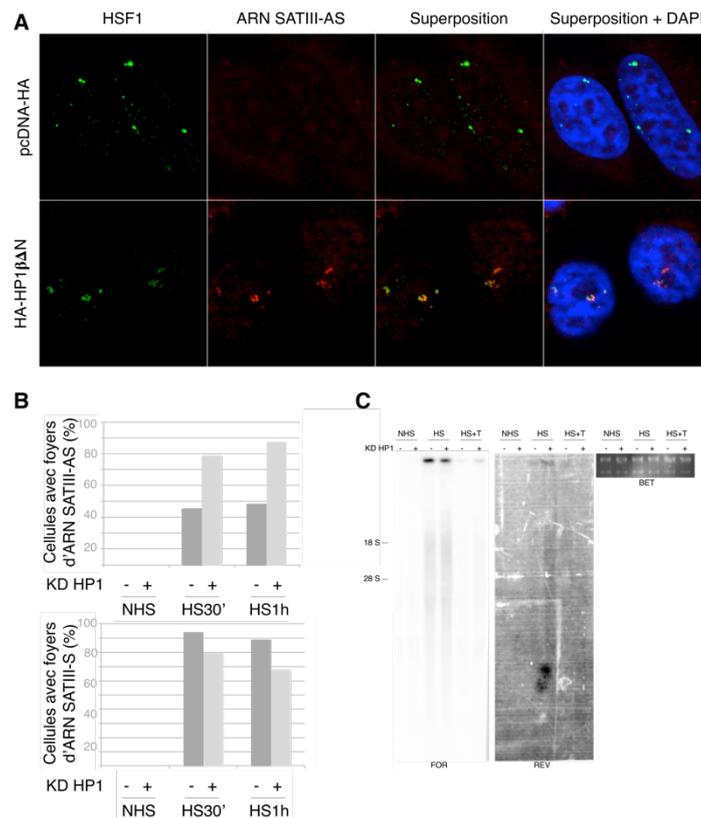
Suite à l'obtention de ces résultats et afin de comprendre le rôle joué par les protéines HP1 $\alpha$  et HP1 $\beta$  dans la reformation de l'hétérochromatine péricentrique lors de la récupération nous avons

opté pour une approche complémentaire. C'est à dire que nous avons étudié la capacité des cellules à former des foyers SATIII-S et SATIII-AS dans des conditions de *Knock Down* des protéines HPI. Pour cela, les cellules ont été transfectées transitoirement avec une forme tronquée d'HPI  $\beta$ , HA-HPI  $\beta\Delta N$ , capable d'induire par hétérodimérisation, à la dégradation de toutes les formes endogènes de HPI (Zhang et al., 2007). L'efficacité de ce mutant a été vérifiée par IF, où une nette diminution de la protéine HPI  $\alpha$  est observée dans les cellules co-transfectées avec la GFP [Fig 3.25, B]. De même, une baisse significative de la quantité globale de HPI  $\alpha$  est observée en western-blot [Fig 3.25, A].



**Fig 3.25.** La délétion des protéines HPI n'entraîne pas d'accumulation de transcrits SATIII. (A) Western Blot anti-HA et anti-HPI alpha sur des extraits protéiques de cellules HeLa transfectées ou non (CTL) avec le plasmide HA-HPI beta $\Delta N$  (HA-HPI  $\beta\Delta N$ ). (B) Immunofluorescence anti-HPI alpha sur des cellules co-transfectées avec les plasmides HA-HPI  $\beta\Delta N$  et GFP. (C) FISH ARN (rouge) SATIII-S (haut, milieu) ou SATIII-AS (bas) sur des cellules HeLa co-transfectées avec les plasmides HA-HPI  $\beta\Delta N$  et GFP (vert).

Chez l'Homme, la protéine HPI n'est pas nécessaire à la maintenance de l'hétérochromatine péricentrique (Velichko et al., 2011). C'est ce que l'on observe également ici, par FISH ARN dans les cellules HeLa non stressées transfectées avec HA-HPI  $\beta\Delta N$ , dans lesquelles aucune accumulation de transcrits SATIII-S ou SATIII-AS n'est visible [Fig 3.25, C]. En revanche, sous stress, les cellules transfectées forment des foyers d'ARN SATIII-AS très précocement [Fig 3.25, A]. Colocalisés avec HSF1, les ARN SATIII-AS apparaissent dès 10 minutes de stress à 43°C. Le nombre de cellules avec des foyers d'ARN SATIII-S, quant à lui, diminue [Fig 3.26, B]. Cette différence d'accumulation de transcrits SATIII-S est totalement rattrapée si les cellules sont stressées pendant 1 heure à 43°C [Fig 4.26, B]. Ce qui semble indiquer qu'en absence des protéines HPI, le ralentissement de l'accumulation de transcrits SATIII-S est corrélée à l'augmentation observée de transcrits SATIII-AS.



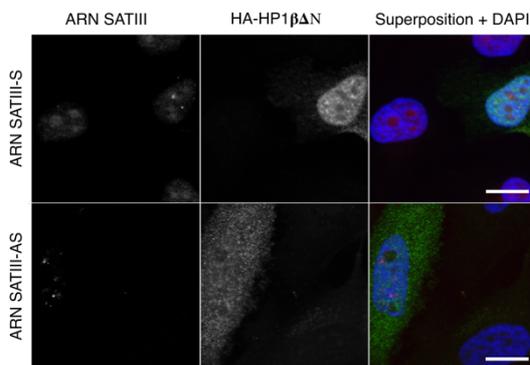
**Fig 3.26. La délétion des protéines HPI entraîne une accumulation très précoce d'ARN SATIII-AS en réponse à un stress thermique.** (A) les foyers d'HSF1 et de transcrits SATIII-AS ont été détectés respectivement par immunofluorescence et FISH ARN dans des cellules HeLa déplétées ou non des protéines HPI par transfection transitoire d'un plasmide contrôle pcDNA-HA (cellules contrôle) ou avec un plasmide HPI $\beta\Delta$ N (cellules déplétées). (B) Le pourcentage de cellules formant des foyers d'ARN SATIII-AS (haut) ou SATIII-S (bas), a été quantifié pour des cellules HeLa soumises ou non à un stress thermique de 30 minutes ou 1 heure à 43°C. (C) Northern Blot des ARN SATIII-S (gauche) et SATIII-AS (milieu) réalisé à partir d'extraits ARN de cellules HeLa stressées ou non 1 heure à 43°C et préalablement transfectées avec un plasmide HPI $\beta\Delta$ N ou contrôle. Le témoin de charge a été réalisé à partir des ARN totaux marqués au BET sur gel d'agarose (droite).

Les transcrits SATIII-S et SATIII-AS présents à 1 heure de stress à 43°C dans les cellules HeLa déplétées ou non pour les facteur HPI ont été analysés par Northern blot. Dans ces conditions, les transcrits SATIII-S comme SATIII-AS correspondent à de très longs ARN de plus de 10Kb. Les transcrits SATIII-AS observés dans les cellules transfectées avec HA-HPI $\beta\Delta$ N sont plus longs que ceux décrits précédemment dans les cellules normales 21h de récupération après un stress. Ces deux types d'ARN sont transcrits par l'ARN POLII, comme en témoigne la disparition de ces deux types d'ARN dans les cellules traitées au triptolide [Fig 3.26, C].

Ces résultats montrent que l'équilibre des transcrits SATIII et de leur orientation au moment du stress est profondément perturbé par la perte de la protéine HPI en amont d'un stress. L'accumulation des ARN SATIII-AS est en particulier contrôlée temporellement mais aussi spatialement par les protéines HPI puisque leur taille change avec sa déplétion.

### La déplétion des protéines HPI inhibe l'élimination des transcrits SATIII-S et SATIII-AS au cours de la récupération

Le *knock Down* des protéines HPI confirme ce que suggérait la surexpression d'HPI  $\alpha$ -GFP et HPI  $\beta$ -GFP, à savoir que les protéines HPI contrôlent la cinétique de répression transcriptionnelle des SATIII et/ou d'élimination des transcrits. En effet en l'absence des protéines HPI les ARN SATIII-S comme les ARN SATIII-AS sont encore présents sous forme de foyers nucléaires 24 heures après un stress de 30 minutes à 43°C dans un certain nombre de cellules HeLa [Fig 3.27]. De façon intéressante, à l'instar des cellules surexprimant HPI  $\alpha$ -GFP ou HPI  $\beta$ -GFP, aucun foyer de SATIII-S cytoplasmiques n'est observé dans les cellules transfectées transitoirement avec HA-HPI  $\beta\Delta N$  [Fig 3.27].



**Fig 3.27. La Knock Down des facteurs HPI résulte en une accumulation tardive d'ARN SATIII-AS.** Le Knock Down des trois isoformes d'HPI a été réalisé par transfection transitoire du mutant HA-HPI  $\beta\Delta N$  détecté par une immunofluorescence anti-HA (vert). 20 heures de récupération après un stress thermique de 30 minutes à 43°C, les ARN SATIII-S (haut) et SATIII-AS (bas) sont détectés par FISH ARN (rouge). L'ADN est marqué au DAPI. Barre d'échelle : 15  $\mu m$ .

## **Conclusion**

Les résultats obtenus permettent de conclure que les cinétiques d'accumulation de transcrits SATIII-S comme de SATIII-AS au cours d'un stress et de sa récupération sont directement sous le contrôle des protéines HPI  $\alpha$  et HPI  $\beta$ . Ces protéines semblent également avoir un impact sur la taille des transcrits SATIII-AS et l'export des transcrits SATIII-S.

Les mécanismes moléculaires exacts de la régulation, par les facteurs HPI, des cinétiques de production et de maintien des ARN SATIII-S et SATIII-AS à leurs **loci** restent à élucider. Les protéines HPI pourraient agir à deux niveaux : (i) transcriptionnel, en régulant la transcription elle-même permettant une expression orientée et spécifique ; (ii) post-transcriptionnel, en

régulant directement l'accumulation et la stabilisation des transcrits SATIII à leurs *loci*, comme c'est le cas chez la levure (Keller et al., 2012).

### **3. La transcription des SATIII entraîne l'accumulation de défauts mitotiques et une instabilité génomique**

Nos résultats établissent clairement que la transcription des SATIII médiée par HSF1 en réponse à un stress thermique entraîne une perte drastique de la structure d'hétérochromatine constitutive des régions péri-centriques. Or ce n'est pas la séquence primaire de ces régions, très polymorphiques, qui assure leur fonction au sein de la division cellulaire mais bien leur structure tridimensionnelle compacte et réprimée associée aux acteurs de l'hétérochromatine constitutive (Nonaka et al., 2002; R. A. Oliveira et al., 2014). De ce fait leur déstabilisation lors de la HSR pourrait avoir des conséquences sévères sur leur fonction au niveau de la cohésion et de la ségrégation des chromatides sœurs. Nous avons donc entrepris d'étudier les conséquences de la HSR, et de la transcription des SATIII, sur le déroulement du cycle cellulaire et ce, plus particulièrement au niveau du passage des cellules en mitose.

Alors que l'effet du stress thermique sur le déroulement du cycle cellulaire est bien documenté, montrant un impact particulier au niveau des phases M et S précoce, très peu de données sont disponibles dans la littérature sur le lien entre la formation des nSBs et la progression du cycle cellulaire. Les seuls travaux dans ce domaine sont ceux de l'équipe de G. Biamonti qui s'est intéressée aux foyers formés par la protéine HAP, une hnRNP associée transcrits SATIII-S. Ils montrent que le nombre et la taille des foyers HAP en réponse au stress sont directement corrélés à la phase du cycle dans laquelle les cellules HeLa sont stressées. Le maximum de foyers est trouvé dans les cellules en phase S, suivi de celles en G2 et un minimum en phase G1. Aucun foyer ne se forme si les cellules sont en début de phase S ou M (Weighardt et al., 1999). Si HAP est bien un indicateur fiable de la production des ARN SATIII-S, ces données suggèrent que l'accumulation de ces transcrits varie selon les phases du cycle cellulaire.

**Dans ce contexte général notre objectif a été de déterminer si la transcription des SATIII, associée à la perte de l'hétérochromatine des régions péri-centriques, participe à la dérégulation de la progression des cellules dans le cycle cellulaire après un stress thermique ?**

Nous avons choisi d'adresser cette question en deux temps :

- Premièrement en cherchant s'il existe des corrélations entre l'accumulation de transcrits SATIII-S et les perturbations du cycle cellulaire.

- Deuxièmement en déterminant les conséquences fonctionnelles de la transcription des SATIII sur la division des cellules. Ceci en bloquant spécifiquement la transcription des SATIII par une approche LNA-DNA gapmers.

### 3.1. Le stress thermique entraine un ralentissement de la mitose des cellules HeLa FUCCI

#### Validation du modèle HeLa FUCCI pour l'étude de la réponse au stress thermique

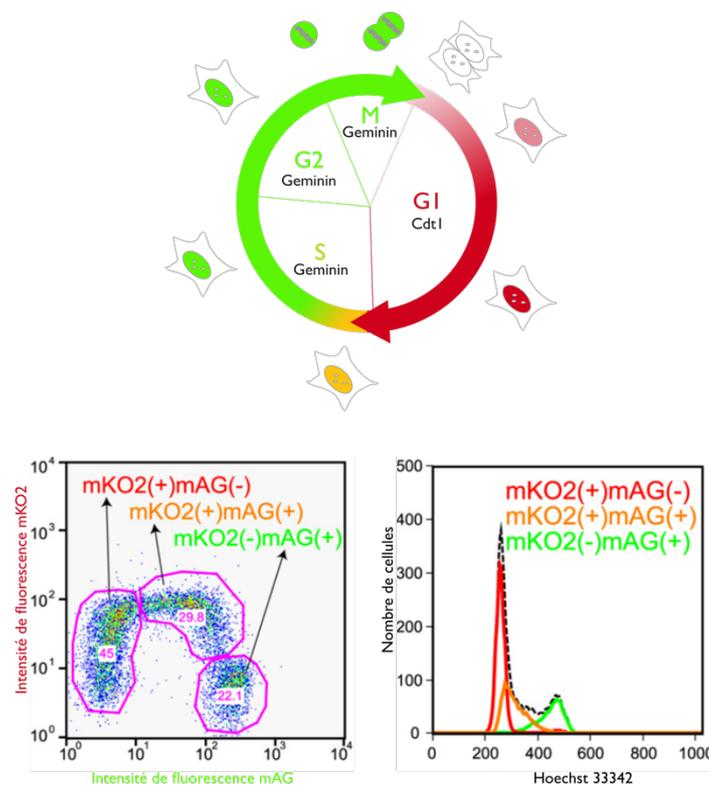


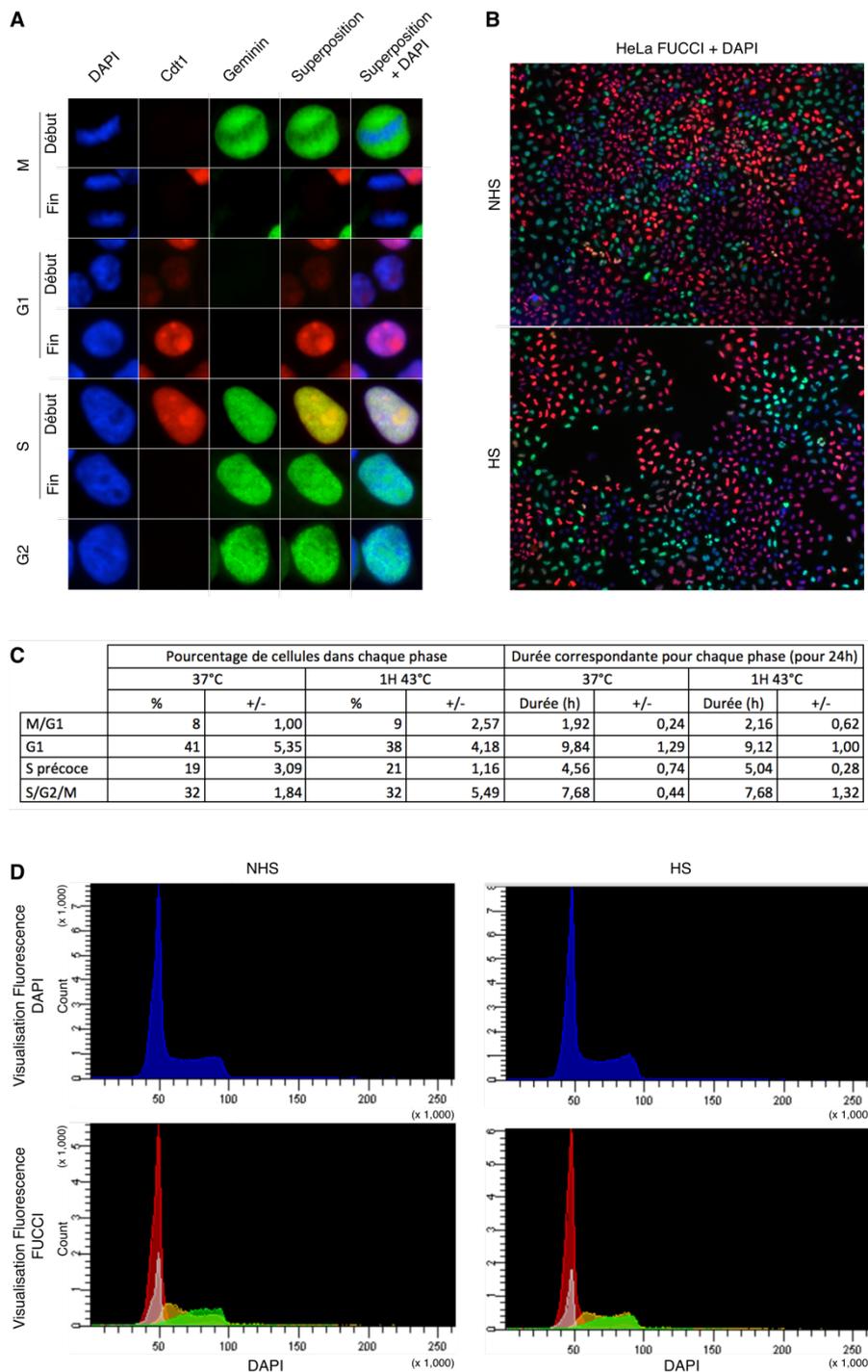
Fig 3.28. Profil de fluorescence des cellules HeLa FUCCI en fonction des phases du cycle cellulaire. Les cellules HeLa FUCCI expriment deux protéines de fusion dont la concentration intracellulaire varie avec la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Cdt1-mKO2 (fluorescence rouge) s'accumule en G1, Geminin-mAG (fluorescence verte) s'accumule en S/G2/M. En S précoce les deux protéines de fusion sont exprimées (fluorescence jaune). (D'après Sakaue-Sawano et al., 2008).

Les cellules HeLa FUCCI (*fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator*) représentent le modèle idéal pour l'étude de l'impact de la HSR sur le déroulement du cycle cellulaire. Le principe de cette lignée est qu'elle exprime des protéines de fusion qui varient en fonction des phases du cycle cellulaire : *Fucci-G1 Orange* et *Fucci-S/G2/M Green* [Fig 3.28]. La première est composée d'un fragment de la protéine humaine Cdt1 fusionné à la protéine mKO2 (*monomeric Kusabira-Orange2*).

Elle s'accumule au cours de la phase G1 et émet à une longueur d'onde proche du rouge. La deuxième est, quant à elle, composée d'un fragment de *Geminin* fusionné à la protéine fluorescente mAG1 (*monomeric Azami-Green I*) et émet à une longueur d'onde verte au cours des phases S/G2/M. Ce système présente l'avantage de pouvoir visualiser en temps réel l'évolution du cycle cellulaire (Sakaue-Sawano et al., 2008). Les cellules HeLa FUCCI sont donc idéales pour une analyse de perturbations du cycle cellulaire par microscopie sur cellules vivantes ou fixées.

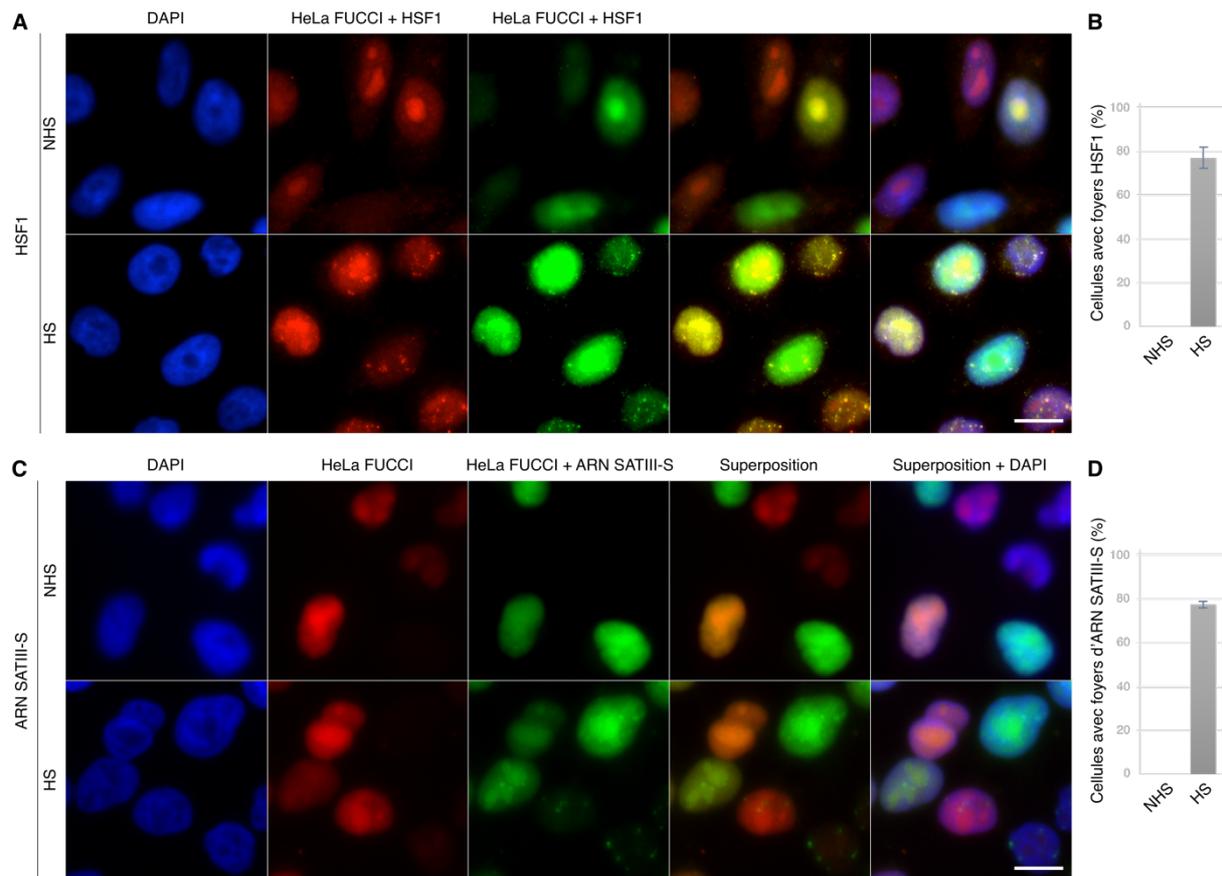
En premier lieu, nous avons caractérisé ce système lors de la HSR [Fig 3.29]. Quatre grandes catégories de cellules sont identifiables *in situ* [Fig 3.29, A] : (i) les cellules en mitoses rondes et vertes au début, transparentes à la fin ; (ii) les cellules en phase G1 qui émettent une fluorescence rouge croissante en fonction de leur avancée dans cette phase ; (iii) les cellules en phase S précoce qui émettent à la fois une fluorescence rouge et verte, l'addition des couleurs donnant des cellules oranges, (iv) des cellules vertes étalées qui regroupent les cellules en S et en G2. Comme le montre l'image en champs large des cellules HeLa FUCCI soumises ou non à un stress thermique d'1 heure à 43°C [Fig 3.29, B], le stress thermique n'impacte pas les fluorophores émis par ces cellules. Les proportions attendues de chaque catégorie de cellules (en accord avec les travaux de l'équipe qui a mis au point et décrit cette lignée [Fig 3.28, gauche] (Sakaue-Sawano et al., 2008)) sont en effet retrouvées qu'elles soient stressées ou non. Cette quantification est obtenue à partir de trois expériences indépendantes avec un effectif de 300 cellules pour chacune d'elles [Fig 3.29, C, gauche]. Ces proportions ont ensuite été rapportées à la durée que passent les cellules dans chaque phase du cycle (rapporté à un cycle de 24 heures) [Fig 3.29, C, droite]. Enfin, pour confirmer que ce modèle est utilisable dans l'étude de l'influence du stress thermique sur le cycle cellulaire, nous avons vérifié qu'une élévation de la température pendant 1 heure à 43°C n'avait pas d'impact sur les différentes protéines fluorescentes en cytométrie en flux (FACS). Pour cela, la fluorescence des HeLa FUCCI stressées ou non a été superposée à la quantité d'ADN marquée au DAPI. Chaque phase du cycle déterminée par la fluorescence des HeLa FUCCI possède bien la quantité d'ADN marquée au DAPI qui est attendue [Fig 3.29, D].

Nous avons ensuite vérifié que ces cellules répondent comme les autres lignées au stress thermique par la formation de nSBs. Dans ce but, des IF HSF1 ont été réalisées sur des HeLa FUCCI soumises ou non à un stress thermique d'1 heure à 43°C [Fig 3.30, A]. Comme les cellules expriment déjà une fluorescence rouge ou verte, deux anticorps secondaires, un fusionné à une Alexa 488 (fluorescence verte) et l'autre fusionné à une Alexa 549 (fluorescence rouge) ont été utilisés pour détecter chaque anticorps primaire afin d'être certain de visualiser la protéine



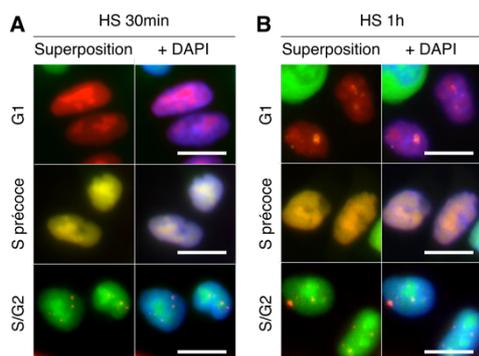
**Fig 3.29.** La fluorescence émise par les protéines de fusion utilisées comme marqueurs du cycle dans les cellules HeLa FUCCI n'est pas affectée par un stress thermique. (A) Fluorescence émise par les cellules HeLa FUCCI en fonction de leur phase : Cdt1-mKO2 en G1 (rouge), Geminin-mGAI en G2 (vert), l'ADN est marqué au DAPI. Les cellules sont classées par phase (de la phase phase M à phase G2). (B) Champ large de cellules HeLa FUCCI soumises à un stress thermique d'1 heure à 43°C (HS) ou non (NHS), marquées au DAPI. (C) Un stress thermique d'1 heure à 43°C ne modifie pas les proportions de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. La durée de chaque phase du cycle a été calculée à partir des pourcentages obtenus, pour un cycle cellulaire total de 24h. (D) Superposition des différents profils de fluorescence obtenus pour les HeLa FUCCI (bas). Le pics correspondants aux différentes phases du cycle cellulaire sont très similaires dans les cellules soumises (droite) ou non (gauche) à un stress thermique d'1 heure à 43°C et se superposent correctement aux pics de fluorescence obtenus par l'analyse du nombre de cellules en fonction de la quantité d'ADN marquée au DAPI.

d'intérêt quelle que soit la phase du cycle concernée. Comme attendu, environ 80% des cellules stressées forment des foyers HSF1 [Fig 3.30, B]. Une FISH ARN SATIII-S a permis de déterminer la présence de ces transcrits dans les cellules stressées ou non, l'intensité des foyers permettant de les visualiser quelle que soit la phase du cycle cellulaire [Fig 3.31, A]. Ils sont également présents dans environ 80% des cellules stressées [Fig 3.31, B], pourcentage en accord avec ce que nous observons habituellement dans les cellules HeLa.



**Fig 3.30. La formation de nSBs dans les cellules HeLa FUCCI.** L'efficacité de la réponse au stress a été testée dans les cellules HeLa FUCCI. (A) Détection d'HSF1 dans les cellules non stressées (haut) ou stressées 1 heure à 43°C (bas) avec des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes rouge et vert. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (B) Quantification des cellules non stressées (NHS) et stressées (HS) formant des foyers HSF1. (C) Détection des foyers d'ARN SATIII-S par FISH ARN (vert) dans des cellules non stressées (haut) ou stressées (bas). Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (D) Quantification des cellules non stressées (NHS) et stressées (HS) formant des foyers d'ARN SATIII-S. Les quantifications (en %) sont réalisées à partir de 3 expériences indépendantes (n=300 noyaux pour chaque expérience).

Cette lignée cellulaire est donc adaptée à la recherche des corrélations éventuelles entre la transcription des séquences SATIII et les altérations du cycle cellulaire après un stress thermique.



**Fig 3.31.** L'accumulation de transcrits SATIII-S varie en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle les cellules sont stressées. La formation de foyers d'ARN SATIII-S a été analysée dans des cellules HeLa FUCCI stressées 30 minutes (A) ou 1 heure (B) à 43°C. Les transcrits ont été détectés par FISH ARN en combinant des sondes couplées à l'Alexa 488 (fluorescence verte) ou à la cyanine3 (fluorescence rouge). L'ADN est marqué au DAPI (+ DAPI). Les cellules sont classées en fonction de la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent : G1 (haut), S précoce (milieu) et S/G2 (bas). Les cellules en S/G2 sont les premières à former des foyers d'ARN SATIII-S. Aucun transcrit n'est détecté dans les cellules en phase S précoce. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

### L'accumulation de transcrits SATIII en réponse au stress est prédominante en phase S/G2

Les FISH ARN réalisées dans les HeLa FUCCI montrent que les 20% des cellules qui ne produisent pas d'ARN SATIII-S après 1h à 43°C sont toutes des cellules soit en phase S très précoce soit des cellules en mitose [Fig 3.31, B]. Comme la protéine HAP décrite dans la littérature (Weighardt et al., 1999), la transcription des séquences SATIII semble bien dépendre des phases du cycle où les cellules ont à répondre au stress.

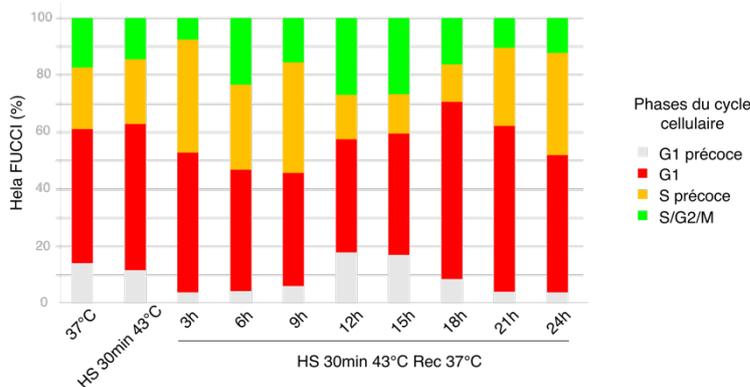
Si l'on se place dans des conditions de stress moins longues (30 minutes à 43°C), seulement 30% des HeLa FUCCI ont des foyers SATIII-S. Celles-ci appartiennent toutes à la catégorie *verte étalée*, c'est-à-dire aux cellules en phase S avancée et/ou en phase G2 [Fig 3.31, A]. Au début de l'induction de la HSR (30 minutes à 43°C), aucune cellule en phase G1 (*cellules rouges*) n'exprime de SATIII-S [Fig 3.31, A].

L'ensemble de ces données suggère que l'accumulation des SATIII-S se produit plus ou moins efficacement selon la phase du cycle à laquelle une cellule subit le stress thermique. Elle est rapide et facile en S et/ou G2 (dès 30 minutes de stress), plus difficile en phase G1 (1 heure de stress nécessaire), et absente en phases S précoce et M dans nos conditions. Ces résultats correspondent à l'intensité des foyers de la hnRNP HAP décrite par l'équipe de G.Biamonti (Chiodi et al., 2000).

### L'analyse par FACS de cellules HeLa FUCCI au cours de la récupération à un stress n'est pas suffisante pour déterminer précisément l'impact du stress sur l'évolution du cycle cellulaire

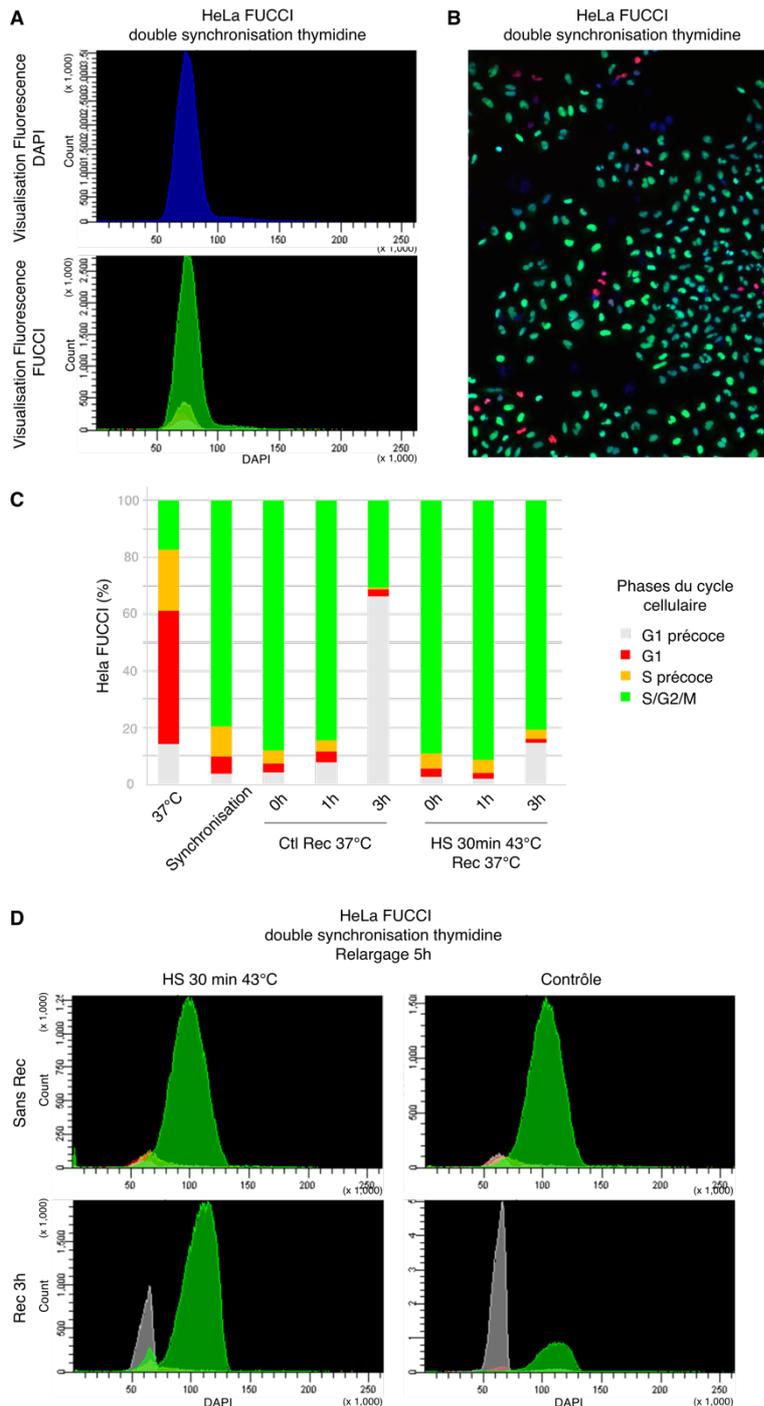
Sachant que les ARN péricentriques sont exprimés préférentiellement à certaines phases du cycle cellulaire, nous avons cherché à savoir si un stress thermique impactait différemment le déroulement du cycle cellulaire en fonction du moment où le stress est appliqué. Dans cet objectif, la progression du cycle de cellules HeLa FUCCI stressées a été étudiée sur une durée de 24

heures après un stress de 30 minutes à 43°C. La proportion de cellules en début ou fin de G1, en phase S précoce et en S/G2/M a été quantifiée toutes les trois heures en FACS [Fig 3.32]. Comme précédemment, nous n'observons pas de variations majeures avant et juste après le stress. Cependant dès trois heures de récupération, nous avons des différences significatives au sein des différentes proportions par rapport à celles des cellules HeLa FUCCI non stressées. Premièrement, on peut noter un doublement des cellules en phase S précoce, qui représentent alors environ 40% des cellules totales. Un blocage en G1/S a déjà été décrit dans la littérature, ce qui va dans le sens de nos résultats (Velichko et al., 2012). Ce blocage serait induit par l'impossibilité qu'auraient des cellules en phase S à réparer les dommages à l'ADN causés par le stress et n'a donc potentiellement pas de lien avec la présence de transcrits péricentriques. D'autant plus que la phase S précoce est la seule où nous n'observons toujours pas d'ARN SATIII-S après 1 heure de stress thermique à 43°C. En parallèle a lieu une diminution du nombre de cellules en S/G2/M et G1 précoce mais il est néanmoins difficile de dire si ceci est la conséquence de l'augmentation des cellules en S précoce ou une réelle diminution. Par exemple en ce qui concerne la diminution des cellules en G1 précoce, ce pourrait être lié à des difficultés de passer la mitose. Dans celle des cellules en S/G2/M ce pourrait être lié à une difficulté plus grande encore pour les cellules à passer la transition G1/S.



**Fig 3.32. La progression du cycle cellulaire est modifiée par un stress thermique.** Analyse par FACS du cycle cellulaire de HeLa FUCCI stressées ou non 30 min à 43°C et soumises à une période de récupération à 37°C variant de 0 à jusqu'à 24h après le stress. Les cellules présentes dans les différentes phases du cycle cellulaire (G1 précoce, G1, S précoce, S/G2/M) sont représentées en pourcentage.

L'analyse des proportions de chaque phase du cycle cellulaire reste tout autant difficile jusqu'à 24 heures de récupération. On constate en effet différentes vagues d'augmentation et de diminution des cellules dans chacune de ces quatre phases mais il est impossible de déterminer dans quelle mesure elles sont liées à des ralentissements ou des reprises des autres phases du cycle cellulaire



**Fig 3.33. Un stress thermique appliqué sur des cellules en phase G2 ralentit la durée de la mitose.** Analyse par FACS de la progression du cycle cellulaire de HeLa FUCCI stressées en phase G2. Les cellules ont été soumises à un double blocage thymidine et incubées pendant 5h dans un milieu ne contenant plus de thymidine afin de leur permettre d'atteindre la phase G2, puis soumises ou non à un stress de 30 min à 43°C. (A) L'efficacité du double blocage à la thymidine a été vérifiée par FACS et (B) par microscopie photonique. (C) Pourcentages de cellules en phases G1 précoce, G1, S précoce et S/G2/M des cellules stressées (HS 30min 43°C) ou non (Ctl Rec 37°C) puis incubées à 37°C en récupération. (D) Profils de fluorescence des cellules HeLa FUCCI déterminés par FACS par leur fluorescence rouge, verte et superposés à la quantification de l'ADN marqué au DAPI. Sont représentés les cellules soumises (profils de gauche) ou non (profils de droite) à un stress thermique de 30 minutes à 43°C suivi (profil du bas) ou non (profil du haut) d'une période de récupération au stress de 3 heures à 37°C.

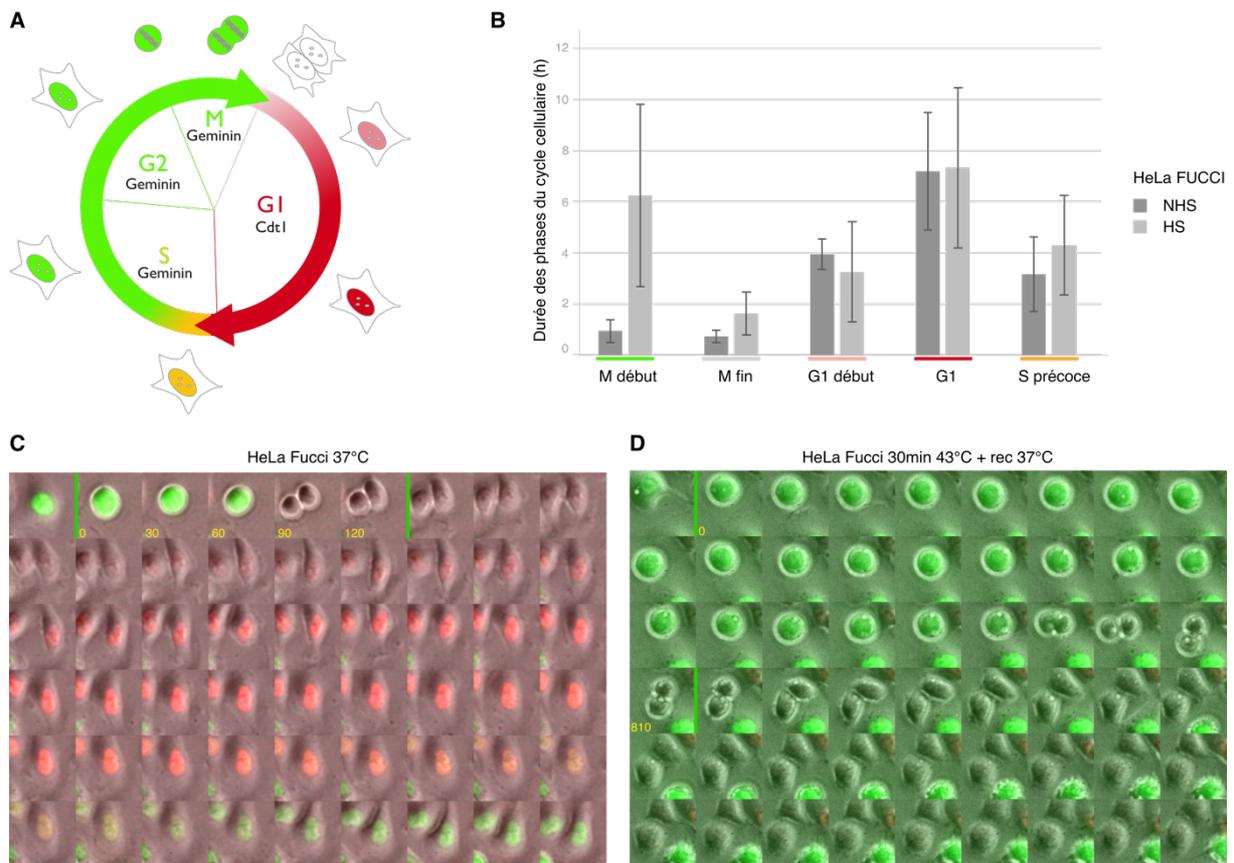
[Fig 3.32]. Cette étude nécessite donc un système où les cellules ne sont pas analysées en proportion de cellules dans une phase du cycle cellulaire en fonction d'une autres.

### **Un stress thermique sur des cellules en G2 induit un ralentissement de la mitose**

Suite à l'impossibilité de déterminer clairement la nature des variations observées précédemment, nous avons décidé d'étudier l'impact du stress thermique sur la progression du cycle cellulaire de cellules synchronisées. D'après les analyses réalisées en FACS, deux fenêtres semblent intéressantes. En effet on observe un blocage en G1/S mais aussi une difficulté pour les cellules à passer en G1 après la mitose, ce qui suggère que ce sont les deux étapes clés pour la conservation de l'information génétique qui sont les plus impactées : les phases S et M. Or le blocage en S ne semble pas associé à la transcription des SATIII puisque les ARN ne sont pas exprimés et que, dans les cellules humaines, il a été montré que ce blocage est associé à des difficultés à réparer des cassures de l'ADN. Nous nous sommes donc concentrés sur le passage de la mitose, choix d'autant plus légitime que les régions péricentriques sont identifiées comme essentielles à la ségrégation des chromatides sœurs.

Afin d'étudier l'impact de la transcription des SATIII sur le passage de la mitose, des cellules synchronisées ont été stressées en phase G2 puis placées en récupération à 37°C. Stresser les cellules avant leur mitose permet de s'assurer qu'elles possèdent des ARN SATIII-S au moment de leur division tout en s'affranchissant d'un effet lié à l'augmentation de la chaleur. Dans cet objectif les cellules HeLa FUCCI ont été arrêtées en G1/S par un double blocage à la thymidine dont l'efficacité a été vérifiée par FACS [Fig 3.33, A] et microscopie [Fig 3.33, B]. Le blocage a ensuite été levé par changement de milieu pendant une période de 5 heures et 30 minutes de manière à ce qu'elles atteignent au moins le milieu de la phase G2 [Fig 3.33, D, haut]. Les cellules ont ensuite été stressées ou non pendant 30 minutes à 43°C et incubées à 37°C en récupération. Dans ces conditions on peut constater un très net ralentissement du cycle cellulaire des cellules stressées puisque seulement 13% ont passé la mitose pour atteindre la phase G1 après 3 heures de récupération, alors que c'est le cas pour plus de 65% des cellules non stressées [Fig 3.33, C]. L'effet de la thymidine et du stress sur ce système FUCCI ont également été vérifiés par l'établissement du cycle par la quantification de l'ADN marqué au DAPI [Fig 3.33, D].

Compte tenu des informations obtenues en FACS, nous avons cherché à déterminer si la mitose des cellules stressées en G2 était ralentie, ou totalement bloquée. Dans ce but, les HeLa FUCCI stressées ou non en G2 ont été observées sous microscope et une acquisition d'images réalisée toutes les 30 minutes sur une durée de 36 heures [Fig 3.34, C et D]. L'analyse de ces images montre



**Fig 3.34. Un stress thermique appliqué à des cellules en phase G2 ralentit spécifiquement la phase de mitose sans affecter la durée des autres phases du cycle cellulaire.** Les images de cellules HeLa Fucci (A) soumises ou non à un stress thermique de 30 minutes à 43°C ont été acquises toutes les 30 minutes sur une durée de 36 heures par vidéo microscopie. (B) Le temps moyen passé par les cellules en mitose (début et fin), en G1 (début et fin) et en phase S précoce a été établi à partir de 3 expériences indépendantes ( $n = 30$  noyaux par expériences). Images séquentielles représentatives de cellules non stressées (C) ou stressées (D). Le laps de temps entre chaque image est de 30 minutes. Le temps (en minutes) s'écoulant entre début et sortie de mitose est indiqué en jaune.

que la durée de la mitose augmente drastiquement dans les cellules stressées, passant d'une moyenne d'1 heure à 6 heures [Fig 3.34, B]. Contrairement à ce qui se passe quand le stress thermique est appliqué à toutes les phases du cycle, la phase M est l'unique phase impactée lorsque le stress est appliqué à des cellules en G2.

## Conclusion

Différentes équipes ont montré que le stress thermique impacte la progression du cycle cellulaire et les phases S et M semblent être les plus affectées (Velichko et al., 2012). Notre étude sur l'étude globale du cycle des HeLa Fucci conduit à la même conclusion. Nous avons également pu observer qu'un stress sur des cellules en G2 rend plus difficile le passage en mitose, qui dure en moyenne 6 fois plus longtemps. Or nous avons montré qu'une forte transcription des ARN

SATIII-S a lieu en G2. Nous avons donc cherché à déterminer si l'accumulation d'ARN SATIII, associée à la déstructuration complète des régions péri-centriques, pourrait être impliquée dans le ralentissement de la mitose au cours de la période de récupération à un stress.

### ***3.2. La transcription des SATIII induit le ralentissement de la mitose des cellules stressées en G2***

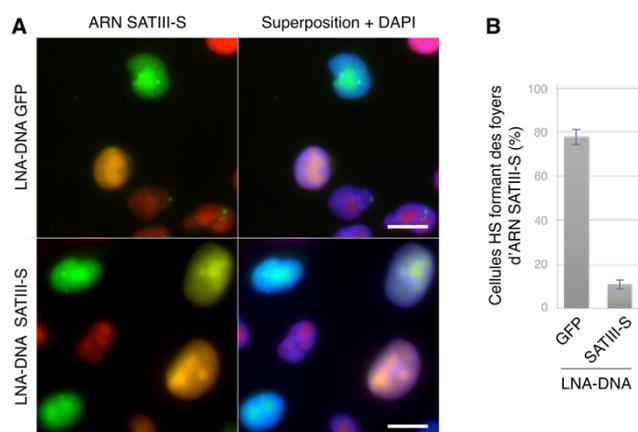
Pour savoir s'il existe un lien entre l'accumulation de transcrits SATIII-S et le ralentissement de la mitose des cellules HeLa FUCCI, nous avons utilisé les LNA gapmers SATIII-S précédemment décrits. Cette approche permet en effet d'inhiber spécifiquement la production des ARN SATIII-S sans affecter HSF1 et donc l'ensemble des autres activités qu'il régule.

La mitose de cellules stressées en G2 a ainsi pu être étudiée dans des HeLa FUCCI normales où *Knock Down* des transcrits SATIII-S. Pour identifier un rôle potentiel des foyers nucléaires de stress nous avons regardé leur implication dans :

- La durée de la mitose ;
- La qualité de la mitose.

#### **Le ralentissement de la mitose en réponse au stress est induit par la transcription des séquences SATIII**

Dans l'objectif d'identifier le rôle potentiel des nSBs dans le ralentissement de la mitose induit par le stress thermique, nous avons spécifiquement inhibé leur transcription par une approche LNA-DNA. Dans ce but, nous avons commencé par tester leur efficacité dans les cellules HeLa FUCCI [Fig 3.35]. Les cellules ont donc été transfectées avec les LNA-DNA SATIII-S ou avec des LNA-DNA contrôles dirigés contre la GFP (LNA-DNA GFP) puis stressées ou non 1 heure à 43°C et les transcrits SATIII détectés par FISH ARN [Fig 3.35, A]. Le pourcentage de cellules stressées qui possèdent des foyers de transcrits SATIII a ensuite été quantifié. Dans les cellules non traitées ou traitées avec les LNA-DNA contrôle, environ 80% des cellules présentent des foyers de transcrits SATIII-S. Ce pourcentage n'est plus que de 10% lorsque les cellules sont traitées avec les LNA-DNA SATIII-S [Fig 3.35, B]. Aucune conséquence n'est visible pour les cellules non stressées.

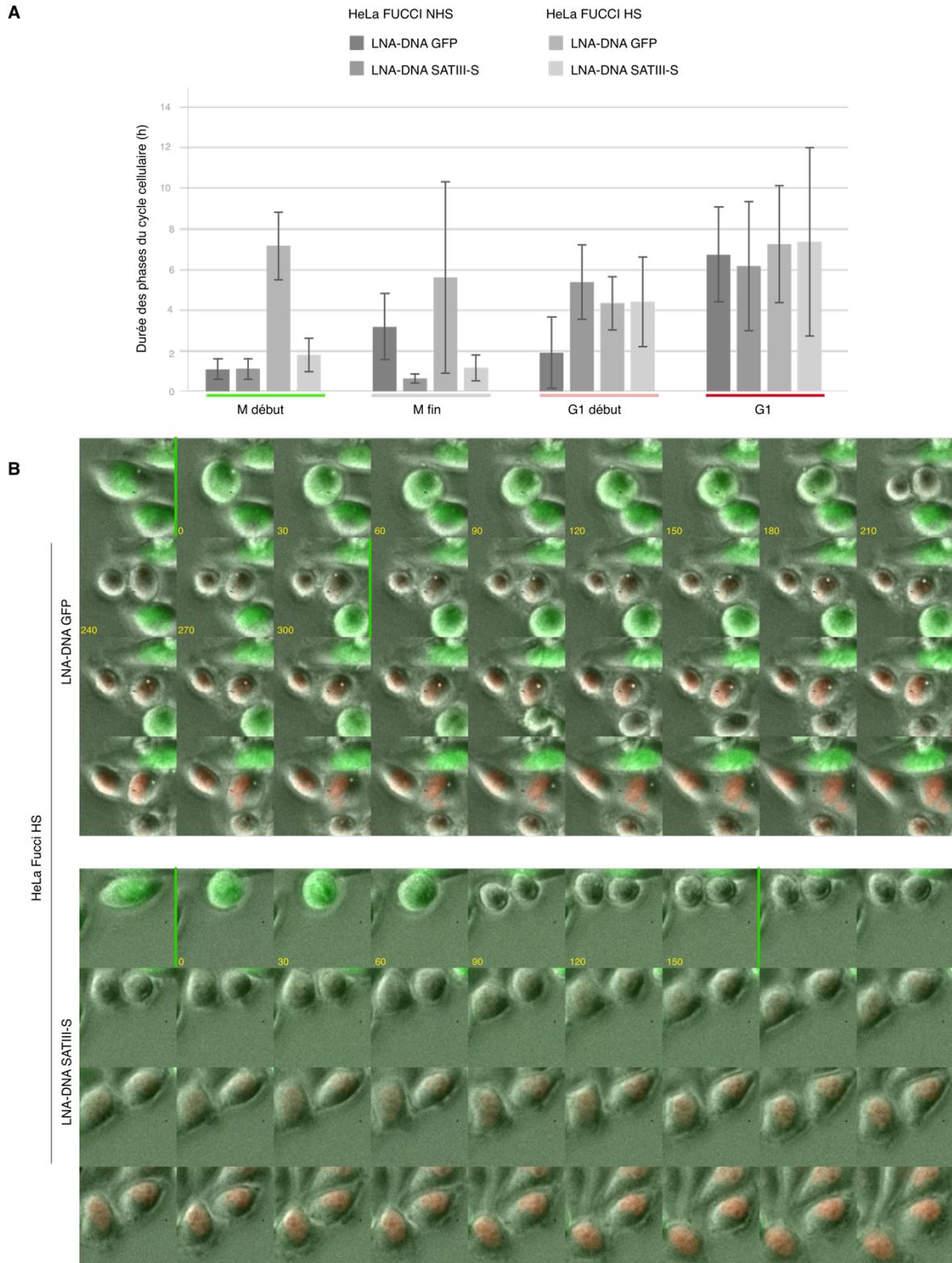


**Fig 3.35. Les LNA-DNA SATIII-S induisent une diminution du nombre de cellules HeLa FUCCI formant des foyers d'ARN SATIII-S en réponse au stress.** La formation de foyers nucléaires de transcrits SATIII-S en réponse à un stress thermique (HS) a été analysée dans les cellules HeLa FUCCI préincubées avec des LNA-DNA contrôles (LNA-DNA GFP) ou dirigés contre les ARN SATIII-S (LNA-DNA SATIII-S). (A) Détection des ARN SATIII-S par FISH ARN dans des HeLa FUCCI stressées, préalablement incubées avec des LNA-DNA contrôles (haut) ou SATIII-S (bas). Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (B) Quantification des cellules formant des foyers nucléaires d'ARN SATIII-S (en %) à partir de 3 expériences indépendantes (n=200 noyaux pour chaque expérience).

Par la suite, les HeLa FUCCI transfectées avec des LNA-DNA SATIII-S ou GFP, ont été stressées ou non 30 minutes à 43°C, et maintenues à 37°C sous un microscope pour une acquisition d'images toutes les 30 minutes pendant 36 heures [Fig 36]. Dans les cellules non stressées, traitées avec les LNA-DNA contrôles comme avec le LNA-DNA SATIII-S, la mitose dure environ 1 heure [Fig 36, A]. L'accumulation d'ARN SATIII-S n'impacte donc pas cette étape du cycle cellulaire en conditions normales. Elle ne semble pas non plus influencer les autres phases du cycle cellulaire (données non montrées). En revanche, dans les cellules stressées, l'augmentation de la durée de la mitose observée précédemment n'est plus constatée en présence des LNA-DNA SATIII-S, tandis qu'elle est toujours d'un facteur 6 lorsque les cellules sont transfectées avec des LNA-DNA contrôles [Fig 36, A et B]. Comme pour les cellules non stressées, les autres phases du cycle ne semblent pas impactées.

### La transcription des régions SATIII en réponse au stress thermique induit des instabilités chromosomiques

En parallèle, lorsque l'on regarde l'évolution des cellules à 37°C au cours des 48 heures qui suivent ou non un stress, on s'aperçoit qu'un certain nombre de problèmes arrivent consécutivement au passage des cellules en mitoses après un stress. Souvent, l'évolution du cycle cellulaire ne se fait pas à la même vitesse pour les deux cellules filles. Celles-ci vont également présenter des CIN, avec l'accumulation de cellules polynucléées parce qu'incapables de se séparer correctement [Fig 37, B] ou alors être dans l'incapacité de se diviser [Fig 37, C]. Des cellules qui entrent en apoptose



**Fig 3.36. Le ralentissement de la mitose résulte de la transcription et/ou de l'accumulation de transcrits SATIII-S.** Des images de cellules HeLa FUCCI préalablement incubées avec des LNA-DNA dirigés contre les ARN GFP (LNA contrôles) ou contre les ARN SATIII-S ont été acquises par vidéo microscopie toutes les 30 minutes sur une durée de 36 heures. **(A)** Le temps (en heures) nécessaire aux cellules stressées en phase G2 pour atteindre la phase G1 a été déterminé. Les mesures ont été réalisées à partir de 3 expériences indépendantes ( $n=30$  noyaux par expérience). **(B)** Images de vidéo microscopie représentatives de cellules stressées préalablement traitées avec des LNA-DNA GFP contrôles (haut) ou SATIII-S (bas) dans les conditions décrites précédemment. La durée de la mitose est notée en jaune.

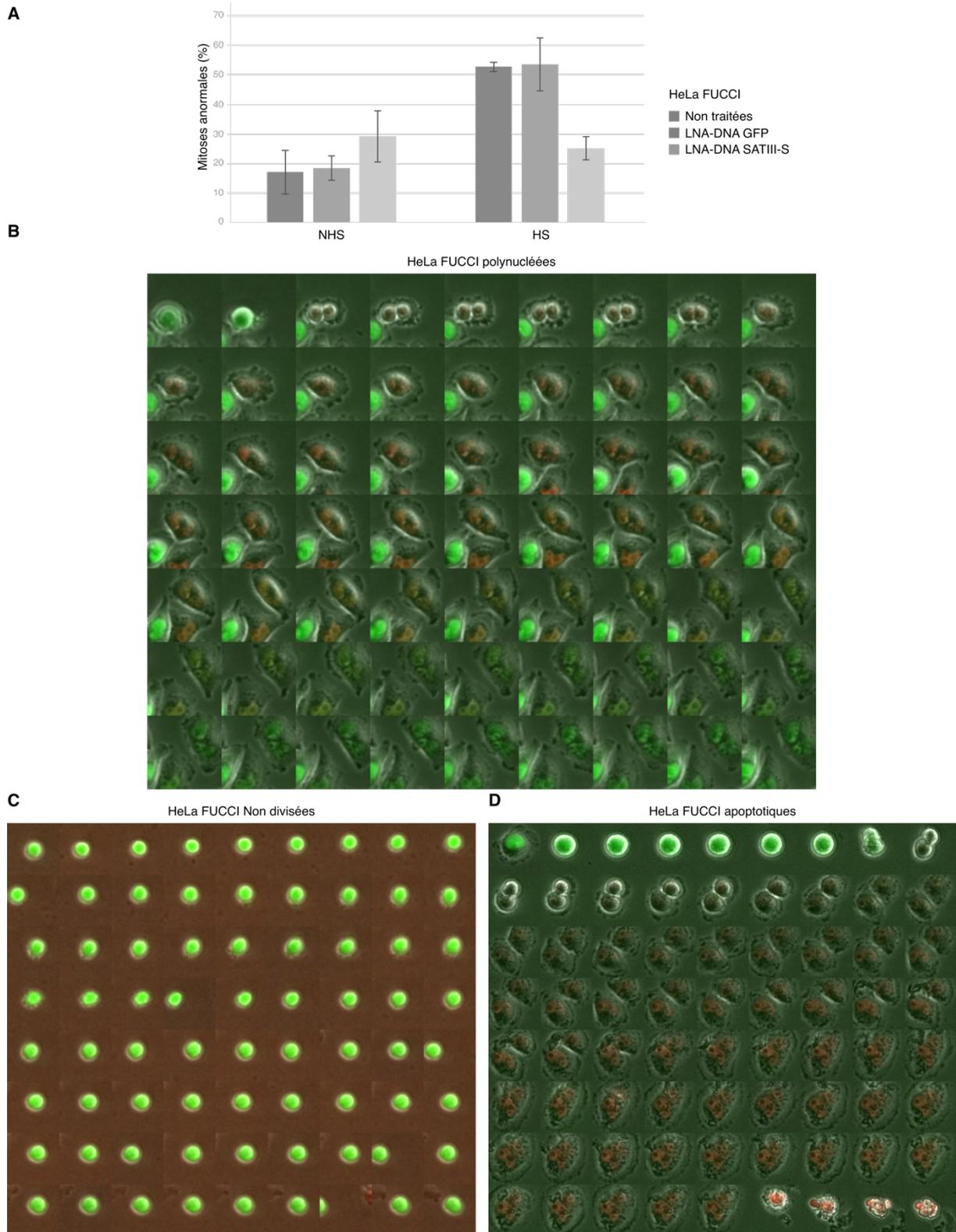
sont également constatées [Fig 37, D]. Plus de 50% des cellules ayant subi un stress thermique en phase G2 présentent ces défauts tout au long du film, contre moins de 20% pour les cellules non stressées [Fig 37, A]. Ce fort pourcentage de défauts dans les cellules normales est probablement lié au fait que ces cellules sont tumorales, polynucléées, avec de multiples centrosomes. Ces défauts qui suivent la mitose ont également été quantifiés dans les cellules stressées ou non pré-incubées en présence des LNA-DNA GFP ou SATIII-S [Fig 37, A]. Alors qu'aucune variation, par rapport aux cellules non traitées, n'est observée dans les cellules transfectées avec les LNA-DNA GFP, le pourcentage de cellules avec des défauts dans les cellules stressées incubées avec les LNA-DNA SATIII-S diminue drastiquement. Les défauts de mitose sont alors constatés à un ratio identique à celui observé dans les cellules non stressées (environ 20%).

L'observation de cellules HeLa marquées au DAPI au cours de la récupération d'un stress a permis de conforter ces résultats. En effet de nombreuses cellules en fin de mitoses sont observables et présentent des *chromosomes retardataires* ou des micronoyaux. De façon intéressante, lorsque l'on combine ce marquage à une FISH ARN SATIII-S, on constate la présence de ces transcrits accumulés au niveau des chromosomes possédant des problèmes de ségrégation (*chromosomes retardataires* ou micronoyaux, comme décrit précédemment) [Fig 38]. Ceci suggère que la présence de ces ARN, qui correspond à une absence des acteurs de l'hétérochromatine constitutive péricentrique HPI et H3K9me3, entraîne des altérations de la mitose et l'accumulation de CIN dans des cellules tumorales comme les HeLa possédant des défauts de *checkpoint* mitotique.

## **Conclusion**

La transcription des SATIII diffère en fonction du moment du cycle cellulaire où le stress thermique est appliqué. C'est lorsque les cellules subissent un stress en S/G2 que l'accumulation de transcrits est à la fois la plus rapide et la plus importante. Les cellules en phase S précoce et en phase M ne sont, quant à elles, toujours pas transcrites après 1 heure de stress thermique.

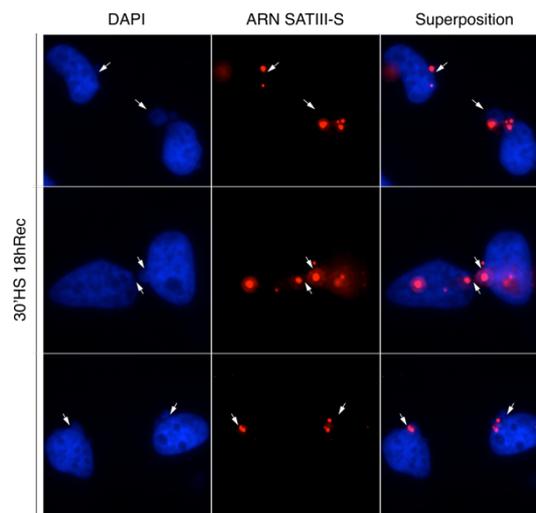
L'étude des cellules HeLa FUCCI soumises à un stress thermique de 30 minutes à 43°C en phase G2 nous a conduit à identifier un ralentissement de la mitose, associé à une augmentation du nombre de défauts mitotiques (cellules polynucléées, incapables de se diviser ou encore des cellules apoptotiques). De façon intéressante, les cellules retrouvent un temps de mitose et un nombre de défauts correspondant aux cellules non stressées quand elles sont incubées en présence de LNA-DNA gapmers qui inhibent la transcription des SATIII. Ces résultats sont



**Fig 3.37. La transcription des ARN SATIII en réponse au stress provoque des catastrophes mitotiques et est source d'instabilités chromosomiques.** (A) Quantification des problèmes de mitose (observés dans des cellules HeLa FUCCI traitées ou non avec des LNA-DNA contrôles (CTL) ou dirigés contre les ARN SATIII-S. Ces observations ont été réalisées sur des cellules stressées en G2 dans les conditions décrites précédemment. Les données ont été obtenues à partir de 3 expériences indépendantes (total de 30 cellules par condition). Images représentatives (B) d'une cellule stressée polynucléée, (C) d'une cellule ayant perdu ses capacités de progression dans le cycle cellulaire, et (D) d'une cellule apoptotique.

confortés par la visualisation, par FISH ARN, de transcrits péricentriques SATIII associés à des micronoyaux et des chromosomes retardataires [Fig3.38].

Or les ARN péricentriques sont présents dans un grand nombre de type de tumeurs, plus particulièrement associés à des tumeurs agressives (Angéline Eymery et al., 2009; Ting et al., 2011), à l'instar de la présence d'instabilité génomiques (et plus encore au niveau de l'hétérochromatine constitutive) qui conduisent à la sélection des cellules tumorales aptes à se diviser quelles que soient les circonstances (Carone & Lawrence, 2013). Comme il l'a été proposé dans le cas de la déméthylation de l'hétérochromatine péricentrique dans les cellules tumorales (Tilman et al., 2012), les résultats obtenus suggèrent que la transcription des SATIII via la HSR pourrait non pas être la conséquence mais la cause d'instabilités génomiques associée à une agressivité des cellules tumorales, notamment via la déstructuration de l'hétérochromatine constitutive péricentrique.



**Fig 3.38.** Les transcrits SATIII sont associés aux chromosomes mal ségrégués des cellules en fin de division. FISH ARN des SATIII-S (rouge) sur des HeLa 18 heures après un stress de 30 minutes à 43°C. Les flèches indiquent les défauts chromatinien, révélés par un marquage de l'ADN au DAPI (bleu).

## Chapitre IV : Conclusions et discussion

### I-Une nouvelle cible pour le facteur HSF1

#### La région Yq12, une cible majeure d'HSF1 chez l'Homme

Au cours de ma thèse, nous avons en premier lieu identifié une nouvelle cible majeure des *foyers primaires* HSF1 : la région Yq12. Des données de l'équipe avaient montré au préalable par des expériences de reconstitution de granules qu'HSF1 a la capacité de cibler *in vitro* toutes les régions de type SATIII dont le chromosome Y (Eymery et al. 2010). Toutefois, *in situ*, dans les cellules normales femelles, seules les régions SATIII localisées aux *loci* 9q12 sont la cible des nSBs et jusqu'ici aucune preuve n'avait été apportée de la capacité d'HSF1 à induire une transcription du chromosome Y. De plus, sa capacité de liaison à des gènes présents en multiples copies sur le chromosome Y, comme lors de la gamétogénèse murine, aurait pu être à l'origine de sa liaison au chromosome Y en réponse à un stress (Akerfelt et al., 2010).

Nos résultats montrent que dans les cellules humaines mâles normales (fibroblastes primaires, amniocytes) et tumorales, deux régions formées d'hétérochromatine constitutive péricentriques sont les cibles majeures des nSBs en réponse à un stress thermique : les régions 9q12 et Yq12. A l'instar de ce qui est démontré pour les régions 9q12 (Jolly et al., 2004; Metz et al., 2004), la région Yq12, enrichie en répétitions de type SATIII, contient des HSE canoniques. Nous avons montré que la fixation d'HSF1 s'accompagne d'une hyperacétylation et de la transcription de ce *locus*. Comme les ARN issus des régions 9q12, les ARN Yq12 accumulés sont riches en répétitions SATIII, ils restent spatialement associés à leurs *sites* de transcription et leur présence se traduit par un recrutement du facteur régulateur d'épissage SRSF1. De manière intéressante, ces deux *loci* sont les seules régions formées d'ADN répété péricentriques identifiées, dans des expériences de sédimentation de fractions chromatiniennes sur gradient de sucrose, comme n'appartenant pas à la fraction formée par la chromatine très compacte (Gilbert et al., 2004).

#### Les foyers HSF1 existent *in vivo*

Jusqu'à présent, la formation de foyers nucléaires de stress a uniquement été observée dans des cellules humaines en culture soumises à différents types de stress (Jolly et al., 2004; Rizzi et al., 2004, Valgardsdottir 2008, Sengupta et al. 2009). Pour la première fois nous avons révélé qu'HSF1 s'accumule sur les régions péricentriques 9q12 et Yq12 *in vivo* dans des coupes testiculaires humaines. Ces foyers sont caractérisés par la présence d'HSF2, probablement associé dans les

testicules avec HSF1 sous forme d'hétérotrimères (Sandqvist et al., 2009, Akrefelt 2010). Pour l'instant nous n'avons pas encore apporté la preuve de l'existence d'une activité transcriptionnelle SATIII sous le contrôle d'HSF1 ou d'HSF2 au sein de ces foyers. Néanmoins le tissu testiculaire est le seul tissu adulte sain dans lequel la présence de transcrits SATIII a été détectée jusqu'ici (Jehan et al. 2007, Eymery et al., 2009). Curieusement, les transcrits détectés dans ces tissus sont exclusivement des ARN SATIII-AS (riches en motifs *AUUCC*) (Eymery et al., 2009; Jehan et al., 2007).

De même, la présence de transcrits Satellite majeurs a été décrite dans le tissu testiculaire chez la souris, suggérant que l'activation des régions péricentriques pourrait remplir une fonction importante, conservée au cours de l'évolution. L'orientation des transcrits satellites dans le tissu testiculaire doit être mieux explorée dans des échantillons bien caractérisés. Les biopsies testiculaires sont difficiles à obtenir et l'origine des échantillons commercialisés n'est pas garantie (Eymery et al., 2009). A ce titre il est intéressant de noter que les transcrits SATIII-AS identifiés chez l'homme dans des biopsies testiculaires proviennent d'embryons de 20 à 36 mois issus d'avortements ou dans le cas de cette même étude d'un accidenté de la route, sans que l'âge de la victime ne soit mentionné (Jehan et al 2007). Ainsi, contrairement aux individus choisis pour notre étude, nous manquons aujourd'hui de preuves formelles que les ARN décrits dans la littérature proviennent d'individus présentant une spermatogénèse intacte. La caractérisation des ARN SATIII par Northern Blot à partir de tissus testiculaire et de spermatozoïdes humain est actuellement en cours. Il est à noter qu'un certain nombre de transcrits non-codants, impliqués dans la transmission transgénérationnelle de stress traumatiques, sont transmis par les spermatozoïdes (Gapp et al., 2014).

Dans les testicules les transcrits SATIII pourraient jouer un rôle dans le remodelage de l'hétérochromatine associée à la mise sous silence du chromosome Y au stade pachytène ou à la maturation post-méiotique des cellules germinales. En effet, cette maturation se caractérise par une réorganisation majeure de la chromatine péricentrique. Initiée dans les spermatides allongées par l'hyperacétylation des histones, ce processus conduit à l'établissement de nouvelles structures plus compactes. Cinq variants d'histones, spécifiquement exprimés dans les cellules de la spermiogénèse sont spécifiquement associés aux régions péricentriques dans les spermatides condensées et participent à la formation de ces nouvelles structures nucléoprotéiques (Govin et al., 2007).

Enfin, il a été récemment montré que les transcrits péricentriques sont, chez l'Homme, capables d'être rétrotranscrits et insérés dans le génome, préférentiellement au niveau des séquences répétées déjà existantes (Bersani et al., 2015). Or chez un grand nombre d'eucaryotes existent des mécanismes de transcription anti-sens (les piRNA) qui sont nécessaires lors de la gamétogénèse pour empêcher les effets délétères d'une propagation des transposons à l'ensemble du génome, à l'origine d'une infertilité. Dans ce contexte, on peut imaginer que l'accumulation de transcrits SATIII-AS, s'ils se produisent effectivement, puisse servir à empêcher ces phénomènes de recombinaison.

### **Une cible unique dans la lignée HT1080**

Curieusement, nous avons identifié une lignée cellulaire, les HT1080, dans laquelle les foyers HSF1 se forment exclusivement sur la régions Yq12. La raison de ce qui semble être une particularité de cette lignée, reste à élucider car dans cette lignée un HSF1 exogène a tout de même la capacité de cibler les régions 9q12, ce qu'il fait lorsqu'il est surexprimé. La séquence en acides aminés d'HSF1 dans ces cellules est pourtant identique à celle des autres lignées de cellules humaines (données non montrées). Deux hypothèses semblent possibles : soit des complexes protéiques (ou des modifications post-traductionnelles d'HSF1) existent, spécifiques à cette lignée, augmentant l'affinité d'HSF1 pour la région Yq12. Préférence débordée lorsqu'HSF1 est fortement exprimé. Soit la quantité de facteur HSF1 actif est moins importante dans cette lignée et ce facteur de transcription a une plus grande affinité pour la régions Yq12 que la région 9q12. Quels que soient les mécanismes mis en jeu, il semble que des différences d'affinité d'HSF1 pour ses cibles 9q12 et Yq12 soient en effet mis en cause. Cette hypothèse est soutenue par les données de la littérature montrant que (i) le nombre de cibles hétérochromatiques du facteur HSF1 dans une cellule augmente avec le taux d'expression du facteur, avec pour effet un ciblage des séquences SATII en principe non ciblées par HSF1 (Eymery et al., 2010) et (ii) HSF1 semble effectivement avoir une plus grande affinité pour les régions Yq12 que pour les régions 9q12 au moins dans les fibroblastes primaires mâles soumis à un stress continu d'une heure. Les régions Yq12 sont en effet autant ciblées que les régions 9q12 : 10% des cellules ont un foyer unique sur le chromosome 9 et 10% sur le chromosome Y, alors que le *locus* Yq12, présent en un seul exemplaire, a en principe deux fois moins de probabilités d'être ciblé que le *locus* 9q12. Le ciblage d'HSF1 à ses cibles hétérochromatiques pourrait dans ce cas être associé à un modèle stochastique où le choix des premiers *loci* ciblés par HSF1 serait lié au hasard. La probabilité serait simplement plus haute de se fixer sur une région plus grande et moins compacte, comme c'est le cas des régions Yq12 et 9q12, qui sont plus relâchées que les autre *loci* SATIII et contiennent un plus grand nombre de

répétitions (Gilbert et al., 2004). HSF1 est en effet connu pour scanner l'ADN avant de s'y fixer (Herbomel et al., 2013). Une fois fixé, HSF1 recruterait des facteurs qui remodelent et ouvrent la chromatine, facilitant ainsi la reconnaissance de ces régions par de nouvelles molécules HSF1 et provoquant un phénomène de nucléation. Une fois ouvertes, certaines régions pourraient ensuite rester des cibles plus facilement accessibles, participant aux mécanismes de *mémoire au stress*. Cette hypothèse est étayée par le fait que, lors de deux stress consécutifs, les cibles d'HSF1 sont identiques et sont ciblées plus rapidement lors du deuxième stress (Jolly et al., 1999). Ce phénomène de mémorisation est notamment observé dans les cellules tumorales où une déméthylation des régions SATII sur du long terme, et donc une perte de compaction, suit leur activation par HSF1 (Tilman et al., 2012).

### L'importance d'un ciblage par HSF1 de loci hétérochromatiques spécifiques ?

Le fait qu'en fonction du type cellulaire considéré une seule ou plusieurs régions péricentriques soient ciblées et que le chromosome Y, absent dans les cellules femelles, soit une cible majeure d'HSF1, suggère que le *locus* SATIII exacte ciblé par HSF1 n'est pas déterminant dans la physiologie de la réponse au stress. Le rôle des nSBs chez l'Homme serait donc associé (i) soit à l'induction de transcrits de type SATIII jouant leur rôle en *trans* (séquestration de facteurs, ...), (ii) soit à la nature d'hétérochromatine péricentrique des *loci* ciblés.

Il reste néanmoins possible qu'une fonction supplémentaire soit associée à la transcription du *locus* Yq12 dans les cellules mâles à un moment du développement. La gamétogénèse mâle est en effet très sensible au stress, dont le stress thermique, et ce d'une façon dépendante d'HSF1.

## **II- La transcription des SATIII en réponse au stress thermique cause la perte de la structure hétérochromatique des régions 9q12 et une instabilité génomique**

### **1. L'impact du stress sur l'hétérochromatine constitutive péricentrique**

#### La perte des marques de l'hétérochromatine constitutive aux régions SATIII transcrites

Dans les cellules HeLa les régions péricentriques sont totalement déstructurées suite à l'activation du facteur HSF1. Nous avons montré que son accumulation sur les régions 9q12, accompagnée

d'une hyperacétylation et une transcription des SATIII (Jolly et al., 2004), conduit également à la perte du caractère hétérochromatique des régions SATIII : perte de la marque H3K9me3 et des facteurs HPI $\alpha$  et HPI $\beta$  [Fig 4.1]. Cette perte est restreinte aux séquences ciblées par HSF1, elle n'affecte pas les régions centromériques enrichies en CENP-B. Cette délocalisation n'est pas induite par une augmentation de la chaleur mais bien par la fixation de HSF1 car elle se produit également dans des cellules où les foyers nucléaires de stress résultent de la seule surexpression de HSF1 (données non montrées). Elle nécessite la transcription des régions SATIII, c'est-à-dire la présence du domaine de transactivation d'HSF1, l'hyperacétylation des régions 9q12 et une ARN PolII fonctionnelle. Les mêmes résultats sont retrouvés pour la lignée HT1080 dans laquelle la région péri-centrique ciblée par HSF1 est la région Yq12 (données non montrées). Nous ne pouvons pas exclure à ce stade que les ARN eux même aient un rôle dans cette délocalisation puisque l'utilisation des LNA gapmers ciblant les SATIII a également pour conséquence l'absence de recrutement de la machinerie transcriptionnelle au *locus* 9q12.

#### **Les mécanismes moléculaires associés à la perte des marques de l'hétérochromatine constitutive aux régions SATIII transcrites**

Ce qui est très intéressant à noter est la concomitance d'un état euchromatique (hyperacétylation, ARN PolII) et d'un état hétérochromatique (H3K9me3, HPI $\alpha$ , HPI $\beta$ ) aux *loci* 9q12 des cellules HeLa stressées dont la transcription est bloquée de façon spécifique (par les LNA gapmeRs) ou non spécifique (par du triptolide). L'hyperacétylation, qui se produit dans les cellules traitées au triptolide ne semble donc pas directement impliquée dans la perte des marques hétérochromatiques puisque les marques H3K9me3 persistent dans ces conditions. La perte d'HPI et d'H3K9me3 aux régions péri-centriques pourrait donc être liée au passage de l'ARN Pol II, qui par exemple déstabiliserait les nucléosomes (Liu & Wang, 1987). Des résultats dans notre équipe montrent par CHIP une diminution d'H3K9me3 aux niveau des régions péri-centriques SATIII dans les cellules stressées, mais aussi une diminution du nombre de nucléosomes composés d'H3. On peut aussi penser que les protéines HPI pourraient être déstabilisées par d'autres modifications d'histones (Jang et al., 2014b; Sharma et al., 2012), mais la perte d'H3K9me3 reste le mécanisme le plus probable.

La nature des mécanismes mis en jeu dans la déstabilisation de la protéine HPI est une question importante. On peut imaginer que la perte d'HPI se produise avant que la marque H3K9me3 ne soit perdue et, qu'à l'instar de ce qui a été décrit chez *S.Pombe*, mette en jeu une interaction d'HPI avec les transcrits SATIII (Keller et al., 2012). En effet chez la souris et la levure les protéines HPI, sont capables de se lier aux transcrits péri-centriques via leur domaine *Hinge* (Muchardt et al., 2002,

Maison et al., 2011). La liaison d'HPI aux ARN est incompatible avec la capacité de liaison d'HPI à H3K9me3. Dans ces modèles la capacité de liaison d'HPI aux ARN participe à la dynamique d'HPI et à l'export des transcrits d'origine hétérochromatiques en cas de perte d'H3K9me3.

Dans la littérature, les protéines HPI sont décrites comme étant globalement délocalisées en réponse à un stress thermique (Velichko et al., 2011), mais les expériences sont toutes réalisées dans le cas de stress thermiques sévères, à 45°C. Dans nos mains, un stress à 45°C affecte effectivement la distribution d'HPI $\alpha$ , HPI $\beta$ , d'une façon globale. Les protéines HPI perdent le marquage granulaire spécifique de leur localisation à l'hétérochromatine, pour cibler la chromatine de tout le noyau. Même si HSF1 et l'induction de l'hyperacétylation restent fonctionnels à cette température, cette relocalisation n'est pas dépendante d'HSF1, ni de la transcription des SATIII qui ne se produit pas à cette température (Valgardsdottir et al., 2007). Plus globalement, l'intensité d'un stress semble effectivement jouer sur la localisation des protéines HPI. Par exemple dans le cas d'un stress de disruption de l'hétérochromatine à la TSA, les protéines HPI peuvent être soit massivement recrutées à l'hétérochromatine péricentrique, soit globalement diffuses, respectivement pour un stress modéré et sévère (Zhang et al., 2007).

Quoi qu'il en soit, au moment du stress et au début de la récupération nous ne sommes pas dans un système où la transcription des régions péricentriques permet la mise en place ou la réorganisation de la chromatine péricentrique sous forme d'hétérochromatine constitutive. Dans ce contexte la transcription des SATIII-S induit la déstabilisation de cette structure, probablement par la combinaison de l'action de l'ARN PolIII et des ARN SATIII.

## **2. La récupération au stress : un modèle de reformation de l'hétérochromatine constitutive chez l'Homme ?**

### **La remise en place de l'hétérochromatine constitutive péricentrique**

Nos résultats ont mis en évidence la pertinence du modèle de la HSR pour étudier la formation de l'hétérochromatine constitutive péricentrique chez l'Homme. En effet après un stress, plus aucun enrichissement des marques caractéristiques de l'hétérochromatine constitutive péricentrique identifiées n'est détecté aux régions 9q12 (H3K9me3, HPI $\alpha$  et HPI $\beta$ ) alors qu'à l'inverse ces régions sont enrichies des marques spécifiques de la chromatine transcriptionnellement active (hyperacétylation, H4K20me3, ...) [Annexe 2]. Au cours de la phase de récupération qui suit un stress, les transcrits non-codant accumulés sont progressivement éliminés et ces régions réprimées. Par conséquent cette phase de récupération tardive semble

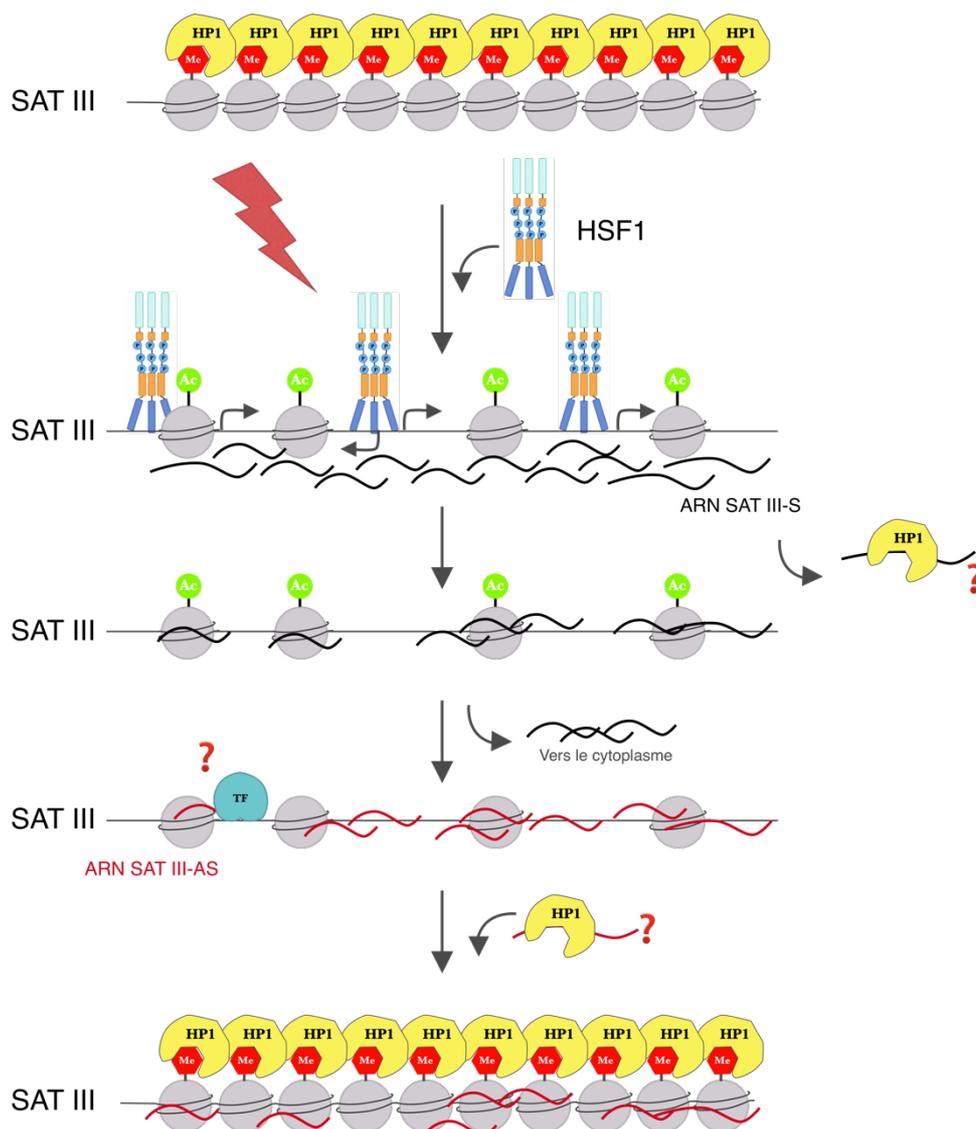


Fig 4.1. L'organisation de la chromatine péricentrique des loci 9q12 au cours de la HSR et de la phase de récupération au stress. La transcription orientée sens des SATIII par HSF1 induit la déstabilisation des acteurs de l'hétérochromatine péricentrique H3K9me3 et HP1 alpha et beta. Lors de la phase de récupération au stress, les ARN SATIII-S s'accumulent dans le cytoplasme par un mécanisme inconnu. Ce n'est que très tardivement que les acteurs de l'hétérochromatine constitutive se relocalisent aux loci SATIII. HP1 alpha et beta sont néanmoins deux acteurs majeurs de la répression transcriptionnelle des SATIII.

être la fenêtre temporelle idéale pour étudier les mécanismes moléculaires permettant la mise en place *de novo* de la structure chromatinienne compacte qu'est l'hétérochromatine constitutive péricentrique.

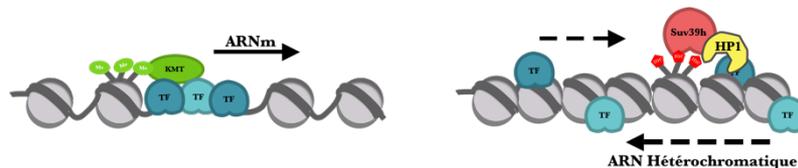
De plus, beaucoup d'évènements semblent identiques au modèle mammifère le mieux décrit en ce qui concerne la présence de transcrits péricentriques et la formation de l'hétérochromatine constitutive péricentrique : le développement embryonnaire précoce murin. Dans ce modèle ainsi que dans celui de la récupération de la HSR, on observe une accumulation séquentielle de

transcrits péricentriques Sens et Anti-sens De même, la localisation des transcrits Anti-sens (issus de la seconde vague temporelle d'accumulation) est corrélée dans le temps à la présence de transcrits Sens (première vague temporelle d'accumulation) dans le cytoplasme (Probst et al., 2010). Pour finir, les protéines HPI (HPI $\beta$  dans le cas du développement embryonnaire précoce), ont dans les deux situations un rôle majeur pour la mise en place de cette structure réprimée (Santenard et al., 2010).

Par conséquent il est probable que d'autres des mécanismes identifiés chez la souris soient également impliqués dans la récupération associée à la HSR : (i) les transcrits péricentriques comme acteurs de la mise en place de l'hétérochromatine ; (ii) le recrutement des protéines HPI médié par les transcrits péricentriques ; (iii) le recrutement via HPI des HMT responsables d'une triméthylation d'H3K9me3 ; (iv) la propagation de la marque H3K9me3 sur les régions péricentriques suivie par celle des autres marques caractéristiques comme H3K64me3. La surexpression d'HPI $\alpha$  et HPI $\beta$  argue dans le sens de ce modèle puisqu'elle induit une mise sous silence transcriptionnelle plus précoce de l'hétérochromatine péricentrique dans une fenêtre temporelle où la marque H3K9me3 n'est pas présente.

En absence des marques de l'hétérochromatine constitutive, ce pourrait également être les acteurs de l'hétérochromatine facultative qui prennent le relais et entraînent la répression transcriptionnelle des SATIII, comme montré pour l'hétérochromatine constitutive de cellules érythrocytaires de poulet (Gilbert et al., 2003). Des acteurs de l'hétérochromatine facultative sont en effet également observés au niveau des régions péricentriques mâles lors du développement embryonnaire précoce murin, avant la déposition des marques de l'hétérochromatine constitutive (Puschendorf et al., 2008). Ces mêmes acteurs sont également souvent retrouvés au niveau des régions péricentriques de cellules tumorales, dont l'hétérochromatine constitutive est déstabilisée (Simon & Kingston, 2013). Le *switch* d'un état constitutif à facultatif permettant le maintien d'un état répressif des régions péricentriques a aussi été décrit dans des cellules souches embryonnaires murines. L'absence de méthylation de l'ADN ou de la marque H3K9me3 conduit au recrutement, par l'intermédiaire du facteur BEND3, des complexes PRC1 et PRC2, associé à une triméthylation d'H3K27me3, permettant le maintien d'un état répressif (Saksouk et al., 2014). La perte d'HPI aux régions péricentriques pourrait dans ce cas conduire à un remodelage global du noyau comme chez *Neurospora* où la relocalisation d'H3K27me3 aux régions d'hétérochromatine constitutive suite à la perte d'HPI conduit à la diminution de son enrichissement à l'hétérochromatine facultative (Jamieson et al., 2016).

Clairement, deux situations semblent se distinguer entre le moment même de l'exposition au stress thermique, où l'accumulation massive d'HSF1 conduit à une forte transcription orientée sens, et la période de récupération où des ARN SATIII-S et SATIII-AS sont simultanément trouvés dans le noyau. La période de récupération tardive au stress pourrait être comparée à celle observée chez la souris dans laquelle la mise en place de l'hétérochromatine constitutive péricentrique se fait par l'intermédiaire de facteurs de transcription (PAX3 et PAX9) [Fig 4.2] (Bulut-Karslioglu et al., 2012). Dans cette étude il est décrit qu'une accumulation de facteurs de transcription au niveau de sites de fixation non structurés en promoteurs organisés conduit à une transcription désorganisée et bi-orientée qui résulte en une répression transcriptionnelle et un maintien de la structure hétérochromatique.



**Fig 4.2. Formation de l'hétérochromatine induite par des facteurs de transcription.** (gauche) Les promoteurs et les enhancers organisent les sites de liaison des facteurs de transcription de façon non-aléatoire à l'euchromatine, ce qui conduit à une transcription orientée. (droite) A l'hétérochromatine, les facteurs de transcription ne se lient pas sur des sites structurés. Cette organisation aléatoire conduit à une transcription bi-orientée et à la formation d'hétérochromatine. (D'après Bulut-Karslioglu et al., 2012)

### Les transcrits SATIII-AS

Comme décrit précédemment, la période de récupération qui suit un stress se caractérise par la présence de foyers nucléaires d'ARN SATIII-AS, riches en répétitions *AUUCC* (Eymery et al., 2009). Le moment auquel ces transcrits commencent à s'accumuler sous forme de foyers nucléaires est très tardif (15 heures après un stress de 30 minutes à 43°C) et ils sont détectés dans plus de 90% des cellules 21 heures après un stress. Curieusement ces transcrits, dont la taille ne varie pas entre 15 heures et 24 heures de récupération, sont observés par Northern Blot sous la forme d'une bande de taille restreinte suggérant une plus grande homogénéité de taille que celle observée dans le cas des ARN SATIII-S. Les mécanismes associés à l'activation transcriptionnelle de ces transcrits restent encore à déterminer puisqu'à ce moment de la récupération le facteur HSF1 est totalement inactivé. Il est probable que cette transcription soit sous le contrôle d'un autre facteur de transcription, qui reste à identifier. Cette activation transcriptionnelle pourrait également être une conséquence directe de la déstructuration de l'hétérochromatine constitutive des régions

péricentriques par HSF1, à l'instar de ce que l'on observe dans les cellules tumorales où une accumulation de transcrits SATII et SATIII sens et antisens se produit (Eymery et al, 2010, Tilman et al., 2012).

L'accumulation de ces ARN SATIII-AS est également concomitante au passage progressif des ARN SATIII-S dans le cytoplasme où ils s'accumulent sous la forme de petits foyers. La fonction et les mécanismes associés à la diffusion ou à l'export actif de ces transcrits péricentriques dans le cytoplasme restent à élucider. Il est intéressant de noter que le *Knock Down* des protéines HPI inhibe totalement l'export de ces transcrits dans le cytoplasme, ce qui semble indiquer qu'elles ont un rôle important dans leur maturation. De plus, un grand nombre de facteurs prennent en charge et recouvrent les transcrits SATIII-S à partir du moment de leur transcription jusqu'à plusieurs heures de récupération après un stress. Le moment où nous n'identifions plus de protéines associées aux ARN SATIII-S coïncide avec celui où les transcrits disparaissent des foyers nucléaires. Ces protéines pourraient protéger ces transcrits et empêcher également leur passage dans le cytoplasme et/ou leur dégradation comme semble l'indiquer les Northern Blot SATIII de cellules HeLa en récupération. Malgré leur taille hétérogène les analyses par Northern Blot montrent qu'après un stress de 30 minutes, ce raccourcissement des ARN SATIII se poursuit progressivement jusqu'à leur disparition observée à 24 heures de récupération. Le raccourcissement des transcrits Sens cytoplasmiques au cours de la récupération est corrélé avec l'accumulation d'ARN SATIII-AS dans le noyau, suggérant une implication possible de la machinerie de type RITS. Il est intéressant de noter que la protéine Ago2 a été décrite comme associée à la régulation de ces transcrits, même si ces observations n'ont jamais pas été confirmées par la suite (Valgardsdottir et al., 2005). L'implication de RITS implique que des ARNs de de 21 nt soient générés, ARN encore non identifiés à ce jour.

Les ARN SATIII-AS s'accumulent également de manière précoce en foyers nucléaires dans les cellules HeLa *Knock Down* pour les trois formes d'HPI soumises à un stress [Fig 4.2]. La taille de ces ARN est alors supérieure à 10 Kb puisque les expériences de Northern Blot les identifient majoritairement dans les puits de dépôt du gel. Cette observation suggère qu'HPI $\alpha$  et HPI $\beta$  seraient nécessaires soit (i) directement à un contrôle transcriptionnel à la fois spatial et temporel des ARN SATIII-S et SATIII-AS (ii) soit comme nous l'avons évoqué précédemment à un contrôle post-transcriptionnel des transcrits SATIII-AS via l'élimination de ces ARN qui s'accumuleraient dès le début du stress dans des cellules HeLa normales mais seraient trop instables pour être détectés, à la manière de ce qui a été décrit chez *S.Pombe* (Keller et al., 2012). Sachant que les

protéines HPI sont progressivement délocalisées des régions 9q12 à partir du moment où elles sont ciblées par HSF1, il est plus facile de proposer un modèle dans lequel les protéines HPI seraient déstabilisées (et inversement) par les ARN SATIII-AS. Les transcrits déverrouilleraient ainsi l'hétérochromatine péricentrique. En effet chez *Drosophila Melanogaster*, l'absence de dégradation des ARN hétérochromatiques par RRP6, une des sous unités de l'exosome, conduit à leur accumulation associée à leur liaison aux protéines HPI, déstabilisant ainsi l'hétérochromatine (Eberle et al., 2015).

### Le rôle des protéines HPI

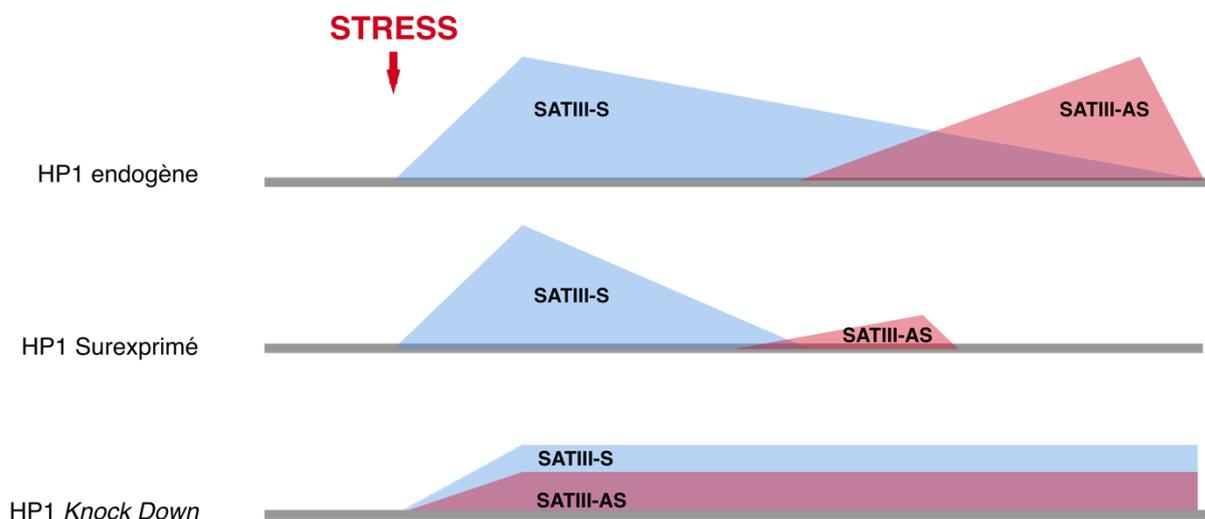


Fig 4.3. Représentation schématique de l'impact des protéines HPI sur l'accumulation des transcrits SATIII péricentriques lors de la HSR et de la récupération. L'accumulation de transcrits SATIII orientés Sens (bleu) ou anti-sens (rouge) sur une période de 24 heures après un stress thermique (flèche) de 30 minutes à 43°C. Les résultats sont obtenus dans des cellules HeLa contrôles, surexprimant ou KD pour HP1alpha et beta.

Le rôle des protéines HPI est encore difficile à décrire avec certitude. La surexpression d'HP1 $\alpha$  ou d'HP1 $\beta$  n'a qu'un très faible impact sur la cinétique de dissociation des protéines HPI des régions 9q12 au moment d'un stress mais a un effet majeur sur la répression transcriptionnelle des SATIII. Le pourcentage de cellules présentant des foyers d'ARN SATIII-S diminue plus rapidement dans les cellules surexprimant HPI que dans des cellules qui ne surexpriment pas HPI alors que le pourcentage de cellules présentant des foyers de transcrits SATIII-S cytoplasmiques devient quasiment nul [Fig 4.3]. De même très peu de cellules présentant des ARN SATIII-AS sont détectées. HPI semble donc avoir un rôle important dans le contrôle de la

cinétique de répression transcriptionnelle des SATIII après stress. La surexpression des protéines HPI pourrait limiter l'expression des SATIII-AS en favorisant l'élimination précoce des transcrits SATIII-S aux *loci* péricentriques. Cet effet pourrait expliquer la faible accumulation d'ARN SATIII-S cytoplasmiques dans cette situation.

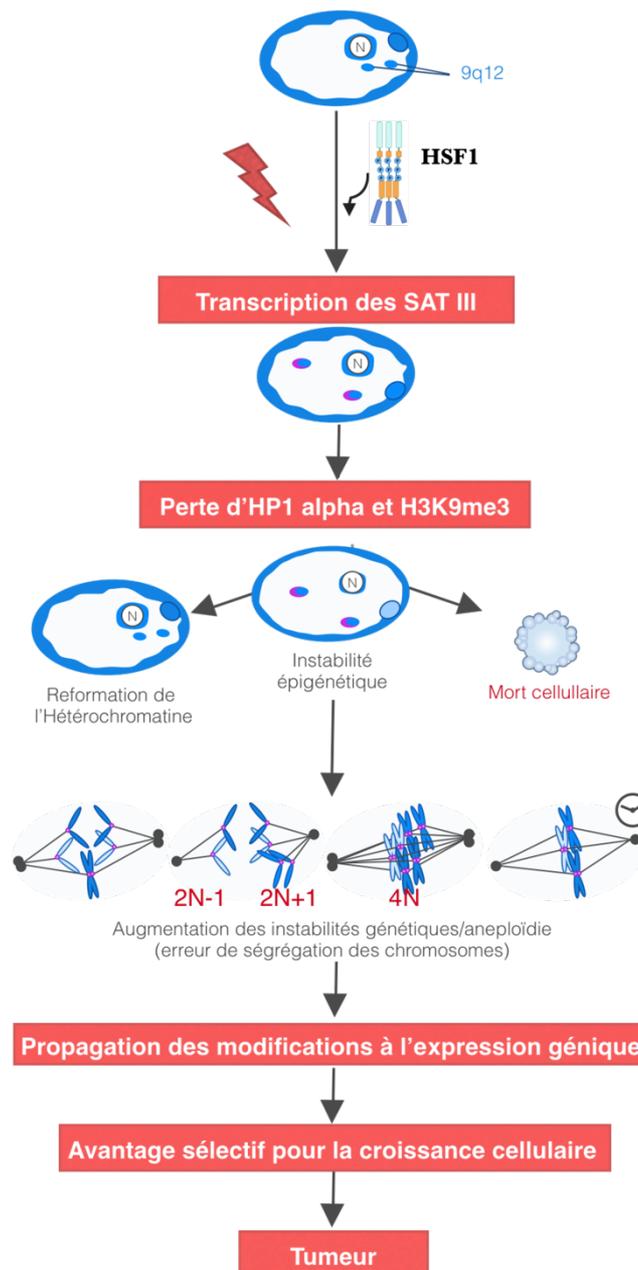
La présence d'H3K9me3 n'étant pas détectée aux SATIII dans les cellules stressées le recrutement du facteur HPI pourrait être, à l'instar du développement embryonnaire précoce chez la souris, une des premières étapes de la mise en place de l'hétérochromatine (Jachowicz et al., 2013; Maison et al., 2011; Santenard et al., 2010). Dans tous les cas, la protéine HPI est nécessaire à la répression transcriptionnelle des SATIII puisque la délétion des trois isoformes bloque à la fois l'arrêt transcriptionnel des SATIII dans les deux orientations, mais aussi la présence de transcrits cytoplasmiques. Le départ des transcrits SATIII-S des *loci* péricentriques pourrait donc être un événement ultérieur à l'action des protéines HPI. Comme décrit précédemment, le *Knock Down* simultané des trois isoformes d'HPI, sans induire de dérégulation transcriptionnelle des régions SATIII des cellules non stressées, conduit également à une dérégulation de l'orientation de la transcription des SATIII au moment du stress. Il est néanmoins difficile de comprendre l'impact d'HPI sur ces ARN *in cis* puisqu'il est délocalisé des régions 9q12 au moment du stress. On peut formuler l'hypothèse que les protéines HPI pourraient agir *in trans*, guidant la dégradation de ces transcrits comme chez la levure (Keller et al., 2012). Mais des expériences supplémentaires doivent être menées pour avancer dans la compréhension des événements mis en jeu. En particulier un *Knock down* spécifique des transcrits SATIII-AS pourrait permettre d'avancer dans notre compréhension de l'équilibre sous-jacent au contrôle des taux relatifs de transcrits SATIII-S et SATIII-AS.

### **3. La perte de l'hétérochromatine péricentrique constitutive est-elle cause de CIN ?**

#### *Transcription des SATIII et régulation du cycle cellulaire*

Nos résultats sur les cellules HeLa FUCCI indiquent que la transcription des SATIII en réponse à un stress est plus ou moins induite en fonction de la phase du cycle dans laquelle les cellules se trouvent. C'est en fin de S, G2, que cette transcription est la plus importante. Pour la première fois on a pu montrer que la transcription de ces régions en réponse à un stress conduit à un ralentissement de la mitose de cellules tumorales et à l'accumulation de CIN au sein de cellules HeLa.

Nos observations sont en cohérence avec les données relatives au rôle d'HP1 dans la ségrégation des chromatides sœurs au cours de la mitose. La présence d'HP1 aux régions péri-centriques est en effet essentielle au bon déroulement de la mitose. Or la transcription des SATIII impacte directement la présence d'HP1 au niveau de *loci* péri-centriques.



**Fig 4.4. Les nSBs : cause d'instabilité génomique et de tumeurs agressives chez l'Homme?** L'accumulation de transcrits SATIII médiée par HSF1 dans les cellules tumorales conduit à l'accumulation d'instabilité épigénétiques et chromosomiques. Ce qui pourrait être la source d'un blocage mitotique dans des cellules normales, qui permettrait aux cellules de ne pas se diviser tant que les dommages liés au stress ne sont pas réparés. Dans le cas d'une impossibilité à réparer ces anomalies, ce mécanisme pourrait également conduire à une mort cellulaire, mais aussi à l'apparition de cellules qui échappent aux checkpoints mitotiques et par conséquent, à la formation de cellules tumorales.

Le ralentissement de la mitose que nous observons dans les cellules HeLa FUCCI pourrait correspondre dans des cellules humaines normales à un blocage du cycle cellulaire en anaphase (González-Barrios et al., 2014). Les cellules HeLa sont caractérisées par la faiblesse de leur *checkpoint* mitotique de telle sorte que la présence de chromosomes non ou mal attachés au fuseau mitotique n'a qu'un effet léger sur le déroulement de la mitose, augmentant l'incidence des CIN (Silkworth et al., 2009). Néanmoins dans les cellules normales, l'arrêt potentiel du cycle cellulaire dans le contexte d'un stress, pourrait procurer un avantage aux cellules, leur laissant le temps de se remettre des autres effets délétères du stress avant d'accomplir complètement leur mitose. Dans ce contexte, les résultats obtenus permettent de proposer un modèle dans lequel les nSBs pourraient avoir un rôle dans la protection des cellules stressées, empêchant la mitose dans des conditions défavorables. Ainsi, à l'inverse, si les cellules continuent leur mitose en situation de stress, notamment suite à l'existence d'un *checkpoint* mitotique déficient, le développement de cellules tumorales sera favorisé [Fig 4.4]. Les CIN sont décrites comme probablement initiatrices des tumeurs et corrélées à leur agressivité (Schvartzman et al., 2010). En effet, cette situation confère un avantage sélectif aux cellules capables de se diviser quelles que soient les conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent, avec pour effet, l'apparition de tumeurs agressives (Carone et al., 2013).

De façon intéressante, le nombre de régions péricentriques ciblées augmente avec l'intensité du stress (Eymery et al., 2010). Et il est connu que des forces différentielles appliquées sur un kinétochore a un impact sur la mitose. Plus le nombre de kinétochores est impacté, plus la mitose est ralentie. On peut donc imaginer un effet dose-dépendant du stress sur le déroulement de la mitose des cellules humaines (Oliveira et al., 2010).

### III- Perspectives

Nos résultats ont en premier lieu mis en évidence la pertinence du modèle de la HSR pour l'étude de la formation de l'hétérochromatine constitutive péricentrique chez l'Homme. Un certain nombre de questions restent aujourd'hui encore ouvertes et des expériences sont actuellement en cours pour tenter de comprendre le rôle des protéines HPI et des transcrits SATIII dans les mécanismes de reformation de l'hétérochromatine. Nous cherchons aujourd'hui (i) à caractériser la cinétique de retour des acteurs de l'hétérochromatine constitutive aux régions 9q12 afin de corrélérer leur présence à celle des transcrits ; (ii) à définir l'importance du domaine Hinge d'HPI dans la remise en place de l'hétérochromatine (Muchardt et al., 2002). Si le domaine de liaison à l'ARN est nécessaire au ciblage d'HPI à l'hétérochromatine péricentrique, la transfection

transitoire d'une protéine HPI mutée dans son domaine Hinge ne devrait pas avoir d'impact sur la cinétique d'élimination des transcrits SATIII contrairement à la transfection d'HPI $\alpha$ -GFP et HPI $\beta$ -GFP.

Pour répondre à cette question nous avons également testé des Immunoprécipitations de l'ARN (RIP) HPI, sans crosslink. Les expériences que nous avons tentées n'ont pas abouti en raison de la difficulté que nous avons rencontrée à extraire les ARN SATIII de la fraction chromatiniennne. Nous prévoyons de renouveler ces expériences en réalisant un crosslink UV afin d'être en mesure d'utiliser des conditions plus efficaces (comme la sonication) pour extraire les ARN péricentriques. Cette expérience devrait nous informer sur la capacité d'HPI à lier les ARN SATIII au moment de la récupération tardive, ce qui pourrait impliquer un recrutement direct d'HPI par les transcrits péricentriques. Ce travail pourrait également nous permettre de déterminer si l'association de la protéine HPI aux régions pericentriques peut être déstabilisée par l'accumulation massive de transcrits SATIII.

Parallèlement à cette étude nous continuerons à caractériser les mécanismes de régulation des transcrits SATIII-S comme SATIII-AS ainsi qu'à caractériser les mécanismes associés à leur export dans le cytoplasme. Nous ne savons pas aujourd'hui à quelles structures les ARN SATIII-S sont associés dans le cytoplasme.

Notre étude met aussi en avant l'importance de la formation des nSBs chez l'Homme *in vivo*. Dans un premier temps, nous souhaitons déterminer le rôle des nSBs dans la spermatogénèse humaine. Différentes expériences vont être entreprises afin d'approfondir les données que nous avons obtenues. Nous essaierons de définir dans un premier temps si les transcrits SATIII sont présents au niveau des foyers HSF1/2 dans les testicules et de préciser les stades auxquels la présence de ces foyers sont associés, en particulier au stade spermatocyte I.

Enfin, l'implication des foyers HSF1 dans l'instabilité génomique et la tumorigénèse va être poursuivie par une partie de l'équipe dans des coupes de tumeurs humaines obtenues grâce à une collaboration avec le CHU de Grenoble.

## Bibliographie

- Abdouh, M., Hanna, R., El Hajjar, J., Flamier, A., & Bernier, G. (2015). The Polycomb Repressive Complex 1 Protein BMI1 is Required for Constitutive Heterochromatin Formation and Silencing in Mammalian Somatic Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **291**(1), jbc.M115.662403. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.662403>
- Akerfelt, M., Vihervaara, A., Laiho, A., Conter, A., Christians, E. S., Sistonen, L., & Henriksson, E. (2010a). Heat shock transcription factor 1 localizes to sex chromatin during meiotic repression. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**(45), 34469–34476. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.157552>
- Akerfelt, M., Vihervaara, A., Laiho, A., Conter, A., Christians, E. S., Sistonen, L., & Henriksson, E. (2010b). Heat shock transcription factor 1 localizes to sex chromatin during meiotic repression. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**(45), 34469–34476. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.157552>
- Allshire, R. C., & Ekwall, K. (2015). Epigenetics Regulation of Chromatin States in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a018770>
- Allshire, R. C., & Karpen, G. H. (2009). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet*, **9**(12), 923–937. <http://doi.org/10.1038/nrg2466>
- Alvarado, S., Rajakumar, R., Abouheif, E., & Szyf, M. (2015). Epigenetic variation in the *Egfr* gene generates quantitative variation in a complex trait in ants. *Nature Communications*, **6**, 1–9. <http://doi.org/10.1038/ncomms7513>
- Amyloidogenesis, S., Tang, Z., Dai, S., Sampson, S. B., Dai, C., Hsf, T. A., ... Sampson, S. B. (2015). Article MEK Guards Proteome Stability and Inhibits Tumor- Article MEK Guards Proteome Stability and Inhibits. *Cell*, **160**(4), 729–744. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.028>
- Audergon, P. N. C. B., Catania, S., Kagansky, A., Tong, P., Shukla, M., Pidoux, A. L., & Allshire, R. C. (2015). Epigenetics. Restricted epigenetic inheritance of H3K9 methylation. *Science (New York, NY)*, **348**(6230), 132–135. <http://doi.org/10.1126/science.1260638>
- Azzaz, A. M., Vitalini, M. W., Thomas, A. S., Price, J. P., Blacketer, M. J., Cryderman, D. E., ... Shogren-Knaak, M. a. (2014). Human heterochromatin protein 1 promotes nucleosome associations that drive chromatin condensation. *Journal of Biological Chemistry*, **289**(10), 6850–6861. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.512137>
- Bannister, a J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. a, Thomas, J. O., Allshire, R. C., & Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HPI chromo domain. *Nature*, **410**(6824), 120–124. <http://doi.org/10.1038/35065138>
- Becker, J. S., Nicetto, D., & Zaret, K. S. (2016). H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends in Genetics*, **32**(1), 29–41. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2015.11.001>
- Bensaude, O. (2011). Inhibiting eukaryotic transcription, **2**(3), 103–108. <http://doi.org/10.4161/trns.2.3.16172>
- Bersani, F., Lee, E., Kharchenko, P. V., Xu, A. W., Liu, M., Xega, K., ... Haber, D. A. (2015). Pericentromeric satellite repeat expansions through RNA-derived DNA intermediates in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(49), 201518008. <http://doi.org/10.1073/pnas.1518008112>
- Biamonti, G., & Vourc'h, C. (2010). Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2**(6), 1–13.

<http://doi.org/10.1101/cshperspect.a000695>

- Boettiger, A. N., Bintu, B., Moffitt, J. R., Wang, S., Beliveau, B. J., Fudenberg, G., ... Zhuang, X. (2016). chromatin folding for different epigenetic states. *Nature*, 1–15. <http://doi.org/10.1038/nature16496>
- Boyault, C., Zhang, Y., Fritah, S., Caron, C., Gilquin, B., So, H. K., ... Khochbin, S. (2007). HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes and Development*, *21*(17), 2172–2181. <http://doi.org/10.1101/gad.436407>
- Brasher, S. V, Smith, B. O., Fogh, R. H., Nietlispach, D., Thiru, a, Nielsen, P. R., ... Laue, E. D. (2000). The structure of mouse HPI suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *The EMBO Journal*, *19*(7), 1587–1597. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1587>
- Budzynski, M. A., Puustinen, M. C., Joutsen, J., & Sistonen, L. (2015). Uncoupling Stress-Inducible Phosphorylation of Heat Shock Factor 1 from Its Activation. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(14), 2530–2540. <http://doi.org/10.1128/MCB.00816-14>
- Bühler, M., Verdel, A., & Moazed, D. (2006). Tethering RITS to a Nascent Transcript Initiates RNAi- and Heterochromatin-Dependent Gene Silencing. *Cell*, *125*(5), 873–886. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.025>
- Bulut-Karslioglu, A., Perrera, V., Scaranaro, M., de la Rosa-Velazquez, I. A., van de Nobelen, S., Shukeir, N., ... Jenuwein, T. (2012). A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(10), 1023–1030. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2382>
- Camps, J., Wangsa, D., Falke, M., Brown, M., Case, C. M., Erdos, M. R., & Ried, T. (2014). Loss of lamin B1 results in prolongation of S phase and decondensation of chromosome territories. *FASEB Journal*, *28*(8), 3423–3434. <http://doi.org/10.1096/fj.14-250456>
- Canzio, D., Chang, E. Y., Shankar, S., Kuchenbecker, K. M., Simon, M. D., Madhani, H. D., ... Al-Sady, B. (2011). Chromodomain-mediated oligomerization of HPI suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly. *Molecular Cell*, *41*(1), 67–81. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.016>
- Canzio, D., Larson, A., & Narlikar, G. J. (2014). Mechanisms of functional promiscuity by HPI proteins. *Trends in Cell Biology*, *24*(6), 377–386. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.01.002>
- Canzio, D., Liao, M., Naber, N., Pate, E., Larson, A., Wu, S., ... Narlikar, G. J. (2013). A conformational switch in HPI releases auto-inhibition to drive heterochromatin assembly. *Nature*, *496*(7445), 377–81. <http://doi.org/10.1038/nature12032>
- Carone, D. M., & Lawrence, J. B. (2013). Satellites and the Nuclear Periphery. *Semin Cancer Biol.*, *23*(2), 99–108. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.06.008.Heterochromatin>
- Castel, S. E., & Martienssen, R. a. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, *14*(2), 100–112. <http://doi.org/10.1038/nrg3355>
- Catania, S., Pidoux, A. L., & Allshire, R. C. (2015). Sequence Features and Transcriptional Stalling within Centromere DNA Promote Establishment of CENP-A Chromatin, 1–28. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004986>
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., & Bruick, R. K. (2007). JMJD6 Is a Histone Arginine Demethylase. *SCIENCE*, *318*(October), 444–447.

- Chiodi, I., Biggiogera, M., Denegri, M., Corioni, M., Weighardt, F., Cobianchi, F., ... Biamonti, G. (2000). Structure and dynamics of hnRNP-labelled nuclear bodies induced by stress treatments. *Journal of Cell Science*, *113* ( Pt 2), 4043–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058091>
- Chiodi, I., Corioni, M., Giordano, M., Valgardsdottir, R., Ghigna, C., Cobianchi, F., ... Biamonti, G. (2004). RNA recognition motif 2 directs the recruitment of SF2/ASF to nuclear stress bodies. *Nucleic Acids Research*, *32*(14), 4127–36. <http://doi.org/10.1093/nar/gkh759>
- Choo, K. H. (1989). of datellite DNA on Human Acrocentric. *In Situ*, *344*, 332–344.
- Clark, R. F., & Elgin, S. C. (1992). Heterochromatin protein 1, a known suppressor of position-effect variegation, is highly conserved in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, *20*(22), 6067–6074.
- Cui, J., Tian, H., & Chen, G. (2015). Upregulation of Nuclear Heat Shock Factor 1 Contributes to Tumor Angiogenesis and Poor Survival in Patients With Non–Small Cell Lung Cancer. *The Annals of Thoracic Surgery*, *100*(2), 465–472. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2015.03.021>
- Dai, C., & Sampson, S. B. (2015). HSF1: Guardian of Proteostasis in Cancer. *Trends in Cell Biology*, *26*(1), 17–28. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.011>
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A. B., & Lindquist, S. (2007). Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. *Cell*, *130*(6), 1005–1018. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.020>
- Das, S., & Bhattacharyya, N. P. (2015). Heat Shock Factor 1-Regulated miRNAs Can Target Huntingtin and Suppress Aggregates of Mutant Huntingtin, 185–193.
- Daujat, S., Zeissler, U., Waldmann, T., Happel, N., & Schneider, R. (2005). HPI binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HPI binding. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(45), 38090–5. <http://doi.org/10.1074/jbc.C500229200>
- Davey, C. a., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W., & Richmond, T. J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 ?? resolution. *Journal of Molecular Biology*, *319*(5), 1097–1113. [http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00386-8](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00386-8)
- Dawson, M. A., Bannister, A. J., Göttgens, B., Foster, S. D., Bartke, T., Green, A. R., & Kouzarides, T. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HPI $\alpha$  from chromatin. *Nature*, *461*(7265), 819–822. <http://doi.org/10.1038/nature08448>
- De La Fuente, R., Baumann, C., & Viveiros, M. M. (2015). ATRX contributes to epigenetic asymmetry and silencing of major satellite transcripts in the maternal genome of the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, 1806–1817. <http://doi.org/10.1242/dev.118927>
- Denegri, M., Moralli, D., Rocchi, M., Biggiogera, M., Raimondi, E., Cobianchi, F., ... Biamonti, G. (2002). Human Chromosomes 9, 12, and 15 Contain the Nucleation Sites of Stress-Induced Nuclear Bodies. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(6), 2170–2179. <http://doi.org/10.1091/mbc.01>
- Dong, E., Tueting, P., Matrisciano, F., Grayson, D. R., & Guidotti, A. (2016). Behavioral and molecular neuroepigenetic alterations in prenatally stressed mice: relevance for the study of chromatin remodeling properties of antipsychotic drugs. *Translational Psychiatry*, *6*(1), e711. <http://doi.org/10.1038/tp.2015.191>

- Eberle, A. B., Jordan-Pla, A., Gañez-Zapater, A., Hessle, V., Silberberg, G., von Euler, A., ... Visa, N. (2015). An Interaction between RRP6 and SU(VAR)3-9 Targets RRP6 to Heterochromatin and Contributes to Heterochromatin Maintenance in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, *11*(9), 3–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005523>
- Eissenberg, J. C., & Elgin, S. C. (2000). The HPI protein family: getting a grip on chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development*, *10*(2), 204–210. [http://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00058-7](http://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00058-7)
- El Fatimy, R., Miozzo, F., Le Mouël, A., Abane, R., Schwendimann, L., Sabéran-Djoneidi, D., ... Mezger, V. (2014). Heat shock factor 2 is a stress-responsive mediator of neuronal migration defects in models of fetal alcohol syndrome. *EMBO Molecular Medicine*, *6*(8), 1043–61. <http://doi.org/10.15252/emmm.201303311>
- Ernst, J., & Kellis, M. (2013). Interplay between chromatin state, regulator binding, and regulatory motifs in six human cell types. *Genome Research*, *23*(7), 1142–1154. <http://doi.org/10.1101/gr.144840.112>
- Ernst, J., Kheradpour, P., Mikkelsen, T. S., Shores, N., Ward, L. D., Epstein, C. B., ... Bernstein, B. E. (2011). Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*, *473*(7345), 43–9. <http://doi.org/10.1038/nature09906>
- Eymery, A., Callanan, M., & Vourc'h, C. (2009). The secret message of heterochromatin: New insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *International Journal of Developmental Biology*, *53*(2-3), 259–268. <http://doi.org/10.1387/ijdb.082673ae>
- Eymery, A., Horard, B., el Atifi-Borel, M., Fourel, G., Berger, F., Vitte, A. L., ... Vourc'h, C. (2009). A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Research*, *37*(19), 6340–6354. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp639>
- Eymery, A., Souchier, C., Vourc'h, C., & Jolly, C. (2010). Heat shock factor 1 binds to and transcribes satellite II and III sequences at several pericentromeric regions in heat-shocked cells. *Experimental Cell Research*, *316*(11), 1845–1855. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.002>
- Ferri, E., Petosa, C., & McKenna, C. E. (2015). Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochemical Pharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.005>
- Filesi, I., Gullotta, F., Lattanzi, G., D'Apice, M. R., Capanni, C., Nardone, A. M., ... Novelli, G. (2005). Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiological Genomics*, *23*(2), 150–158. <http://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00060.2005>
- Fischer, D., Matten, J., Reimann, J., Bönnemann, C., & Schröder, R. (2002). Expression, localization and functional divergence of alphaB-crystallin and heat shock protein 27 in core myopathies and neurogenic atrophy. *Acta Neuropathologica*, *104*(3), 297–304. <http://doi.org/10.1007/s00401-002-0559-z>
- Fischer, T., Cui, B., Dhakshnamoorthy, J., Zhou, M., Rubin, C., Zofall, M., ... Grewal, S. I. S. (2009). Diverse roles of HPI proteins in heterochromatin assembly and functions in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(22), 8998–9003. <http://doi.org/10.1073/pnas.0813063106>
- Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., ... Allis, C. D. (2005). Regulation of HPI-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, *438*(7071), 1116–1122. <http://doi.org/10.1038/nature04219>

- Flanagan, J. F., Mi, L.-Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K. L., Kim, Y., ... Khorasanizadeh, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*, **438**(7071), 1181–1185. <http://doi.org/10.1038/nature04290>
- Fritah, S., Col, E., Boyault, C., Govin, J., Sadoul, K., Chiocca, S., ... Vourc'h, and C. (2010). Heat-Shock Factor 1 Controls Genome-wide Acetylation in Heat-shocked Cells Sabrina. *Molecular Biology of the Cell*, **20**, 4976–4984. <http://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Fuda, N. J., Guertin, M. J., Sharma, S., Danko, C. G., Martins, A. L., Siepel, A., & Lis, J. T. (2015). GAGA Factor Maintains Nucleosome-Free Regions and Has a Role in RNA Polymerase II Recruitment to Promoters. *PLoS Genetics*, **11**(3), e1005108. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005108>
- Galvani, A., & Thiriet, C. (2015). Nucleosome Dancing at the Tempo of Histone Tail Acetylation. *Genes*, **6**(3), 607–621. <http://doi.org/10.3390/genes6030607>
- Gapp, K., Soldado-Magraner, S., Alvarez-Sánchez, M., Bohacek, J., Vernaz, G., Shu, H., ... Mansuy, I. M. (2014). Early life stress in fathers improves behavioural flexibility in their offspring. *Nature Communications*, **5**, 5466. <http://doi.org/10.1038/ncomms6466>
- Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N. P., & Bickmore, W. A. (2004). Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell*, **118**(5), 555–66. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.011>
- Gilbert, N., Boyle, S., Sutherland, H., Las Heras, J. De, Allan, J., Jenuwein, T., & Bickmore, W. a. (2003). Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1. *EMBO Journal*, **22**(20), 5540–5550. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg520>
- Giorgetti, L., Galupa, R., Nora, E. P., Piolot, T., Lam, F., Dekker, J., ... Heard, E. (2014). Predictive polymer modeling reveals coupled fluctuations in chromosome conformation and transcription. *Cell*, **157**(4), 950–963. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.025>
- González-Barrios, R., Soto-Reyes, E., Quiroz-Baez, R., Fabián-Morales, E., Díaz-Chávez, J., del Castillo, V., ... Herrera, L. a. (2014). Differential distribution of HP1 proteins after trichostatin a treatment influences chromosomal stability in HCT116 and WI-38 cells. *Cell Division*, **9**, 1–15. <http://doi.org/10.1186/s13008-014-0006-2>
- Gorkin, D. U., Leung, D., & Ren, B. (2014). The 3D Genome in Transcriptional Regulation and Pluripotency. *Cell Stem Cell*, **14**(6), 762–775. <http://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010>
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., ... Caron, C. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *Journal of Cell Biology*, **176**(3), 283–294. <http://doi.org/10.1083/jcb.200604141>
- Haaf, T., & Schmid, M. (2000). Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, **91**(1-4), 113–23. <http://doi.org/56830>
- Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A. Y., Eck, S., Wörz, S., ... Schotta, G. (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesion recruitment to heterochromatin. *Genes and Development*, **27**(8), 859–872. <http://doi.org/10.1101/gad.210377.112>
- Halder, R., Hennion, M., Vidal, R., Shomroni, O., Rahman, R.-U., Rajput, A., ... Bonn, S. (2015). DNA methylation

- changes in functional accompany the formation and maintenance of memory, *19*(1). <http://doi.org/10.1038/nn.4194>
- Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K.-I., Ayoub, N., Cohen, A., & Grewal, S. I. S. (2002). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5590), 2232–7. <http://doi.org/10.1126/science.1076466>
- Hayakawa, T., Haraguchi, T., Masumoto, H., & Hiraoka, Y. (2003). Cell cycle behavior of human HPI subtypes : distinct molecular domains of HPI are required for their centromeric localization during interphase and metaphase, (Cd). <http://doi.org/10.1242/jcs.00635>
- Herbomel, G., Kloster-Landsberg, M., Folco, E. G., Col, E., Usson, Y., Vourc'h, C., ... Souchier, C. (2013). Dynamics of the Full Length and Mutated Heat Shock Factor 1 in Human Cells. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0067566>
- Hesson, L. B., Sloane, M. a, Wong, J. W., Nunez, A. C., Srivastava, S., Ng, B., ... Ward, R. L. (2014). Altered promoter nucleosome positioning is an early event in gene silencing. *Epigenetics : Official Journal of the DNA Methylation Society*, *9*(10), 1422–30. <http://doi.org/10.4161/15592294.2014.970077>
- Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., ... Sistonen, L. (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(8), 2953–68. <http://doi.org/10.1128/MCB.23.8.2953>
- Hiragami-Hamada, K., Shinmyozu, K., Hamada, D., Tatsu, Y., Uegaki, K., Fujiwara, S., & Nakayama, J.-I. (2011). N-terminal phosphorylation of HPI{alpha} promotes its chromatin binding. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(6), 1186–1200. <http://doi.org/10.1128/MCB.01012-10>
- Hirota, T., Lipp, J. J., Toh, B.-H., & Peters, J.-M. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HPI dissociation from heterochromatin. *Nature*, *438*(7071), 1176–1180. <http://doi.org/10.1038/nature04254>
- Hofmann, A., & Heermann, D. W. (2015). The role of loops on the order of eukaryotes and prokaryotes. *FEBS Letters*, *589*(20), 2958–2965. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.021>
- Iida, T., Nakayama, J. I., & Moazed, D. (2008). siRNA-Mediated Heterochromatin Establishment Requires HPI and Is Associated with Antisense Transcription. *Molecular Cell*, *31*(2), 178–189. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.003>
- Ingenwerth, M., Noichl, E., Stahr, A., Korf, H.-W., Reinke, H., & von Gall, C. (2015). Heat Shock Factor 1-Deficiency Affects Systemic Body Temperature Regulation. *Neuroendocrinology*. <http://doi.org/10.1159/000441947>
- Ishida, M., Shimojo, H., Hayashi, A., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Uegaki, K., ... Nakayama, J. I. (2012). Intrinsic Nucleic Acid-Binding Activity of Chp1 Chromodomain Is Required for Heterochromatic Gene Silencing. *Molecular Cell*, *47*(2), 228–241. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.017>
- Jachowicz, J. W., Santenard, A., Bender, A., Muller, J., & Torres, M. E. P. (2013). Heterochromatin establishment at pericentromeres depends on nuclear position. *Genes and Development*, *27*, 2427–2432. <http://doi.org/10.1101/gad.224550.113>
- Jamieson, K., Wiles, E. T., McNaught, K. J., Sidoli, S., Leggett, N., Shao, Y., ... Selker, E. U. (2016). Loss of HPI causes depletion of H3K27me3 from facultative heterochromatin and gain of H3K27me2 at constitutive

- heterochromatin. *Genome Research*, **26**(1), 97–107. <http://doi.org/10.1101/gr.194555.115>
- Jang, S. M., Azebi, S., Soubigou, G., & Muchardt, C. (2014a). DYRK1A phosphorylates histone H3 to differentially regulate the binding of HPI isoforms and antagonize HPI-mediated transcriptional repression. *EMBO Reports*, **15**(6), 686–94. <http://doi.org/10.15252/embr.201338356>
- Jang, S. M., Azebi, S., Soubigou, G., & Muchardt, C. (2014b). DYRK1A phosphorylates histone H3 to differentially regulate the binding of HPI isoforms and antagonize HPI-mediated transcriptional repression. *EMBO Reports*, **15**(6), 686–94. <http://doi.org/10.15252/embr.201338356>
- Jarmuz, M., Glotzbach, C. D., Bailey, K. a, Bandyopadhyay, R., & Shaffer, L. G. (2007). The Evolution of satellite III DNA subfamilies among primates. *American Journal of Human Genetics*, **80**(3), 495–501. <http://doi.org/10.1086/512132>
- Jehan, Z., Vallinayagam, S., Tiwari, S., Pradhan, S., Singh, L., Suresh, A., ... Jesudasan, R. A. (2007). Novel noncoding RNA from human Y distal heterochromatic block (Yq12) generates testis-specific chimeric CDC2L2. *Genome Research*, **17**(4), 433–440. <http://doi.org/10.1101/gr.5155706>
- Jiang, Q., Zhang, Z., Li, S., Wang, Z., Ma, Y., & Hu, Y. (2015). Defective heat shock factor1½ inhibits the growth of fibrosarcoma derived from simian virus40/Ti½antigen-transformed MEFi½cells. *Molecular Medicine Reports*, 6517–6526. <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.4300>
- Jolly, C., Konecny, L., Grady, D. L., Kutsikova, Y. a, Cotto, J. J., Morimoto, R. I., & Vourc'h, C. (2002). In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *The Journal of Cell Biology*, **156**(5), 775–781. <http://doi.org/10.1083/jcb.200109018>
- Jolly, C., Metz, A., Govin, J., Vigneron, M., Turner, B. M., Khochbin, S., & Vourc'h, C. (2004). Stress-induced transcription of satellite III repeats. *Journal of Cell Biology*, **164**(1), 25–33. <http://doi.org/10.1083/jcb.200306104>
- Jolly, C., Morimoto, R. I., Robert-nicoud, M., Vourc, C., Insem, U., Bonniot, I. A., ... Tronche, L. (1997). HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock : relationship with transcription sites, **2941**, 2935–2941.
- Jolly, C., Usson, Y., & Morimoto, R. I. (1999). Rapid and reversible relocalization of heat shock factor 1 within seconds to nuclear stress granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(12), 6769–6774. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6769>
- Kamakura, M. (2012). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Seikagaku*, **84**(12), 994–1003. <http://doi.org/10.1038/nature10093>
- Kang, G., Kim, E., Lee, H., Gil, N., Cha, H., & Lee, Y. (2015). Heat shock factor 1 , an inhibitor of non-homologous end joining repair, **6**(30), 1–13.
- Keller, C., Adaixo, R., Stunnenberg, R., Woolcock, K. J., Hiller, S., & Bühler, M. (2012). HPI Swi6 Mediates the Recognition and Destruction of Heterochromatic RNA Transcripts. *Molecular Cell*, **47**(2), 215–227. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.009>
- Kirschmann, D. a, Lininger, R. a, Gardner, L. M., Seftor, E. a, Otero, V. a, Ainsztein, a M., ... Hendrix, M. J. (2000). Down-regulation of HPIHsalpha expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer Research*, **60**(13), 3359–3363.

- Kiyomitsu, T., Iwasaki, O., Obuse, C., & Yanagida, M. (2010). Inner centromere formation requires hMis14, a trident kinetochore protein that specifically recruits HPI to human chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, *188*(6), 791–807. <http://doi.org/10.1083/jcb.200908096>
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, *502*(7472), 472–9. <http://doi.org/10.1038/nature12750>
- Kroeger, P. E., Sarge, K. D., & Morimoto, R. I. (1993). Mouse heat shock transcription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(6), 3370–3383.
- Kronenwett, U., Huwendiek, S., Östring, C., Portwood, N., Roblick, U. J., Pawitan, Y., & Carin, O. (2004). Improved grading of breast adenocarcinomas based on genomic instability. *Cancer Research*, *64*, 904–909. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2451>
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., & Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HPI proteins. *Nature*, *410*(6824), 116–120. <http://doi.org/10.1038/35065132>
- Lange, U. C., Siebert, S., Wossidlo, M., Weiss, T., Ziegler-Birling, C., Walter, J., ... Schneider, R. (2013). Dissecting the role of H3K64me3 in mouse pericentromeric heterochromatin. *Nature Communications*, *4*, 2233. <http://doi.org/10.1038/ncomms3233>
- Lavigne, M., Eskeland, R., Azebi, S., Saint-André, V., Jang, S. M., Batsché, E., ... Muchardt, C. (2009). Interaction of HPI and Brg1/Brm with the globular domain of histone H3 is required for HPI-mediated repression. *PLoS Genetics*, *5*(12), e1000769. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000769>
- Lecomte, S., Reverdy, L., Le Quément, C., Le Masson, F., Amon, A., Le Goff, P., ... Le Dréan, Y. (2013). Unraveling Complex Interplay between Heat Shock Factor 1 and 2 Splicing Isoforms. *PLoS ONE*, *8*(2). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056085>
- Lee, Y., & Ann, D. K. (2015). Bi-phasic expression of Heterochromatin Protein 1 (HPI) during breast cancer progression: Potential roles of HPI and chromatin structure in tumorigenesis Young-Ho. *J Nat Sci*, *1*(7), 1–10.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A. H. A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., ... Peters, A. H. F. M. (2003). Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Current Biology : CB*, *13*(7), 568–74. <http://doi.org/10.1016/S>
- LeRoy, G., Weston, J. T., Zee, B. M., Young, N. L., Plazas-Mayorca, M. D., & Garcia, B. a. (2009). Heterochromatin protein 1 is extensively decorated with histone code-like post-translational modifications. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, *8*(11), 2432–2442. <http://doi.org/10.1074/mcp.M900160-MCP200>
- Lever, M. a, Th'ng, J. P., Sun, X., & Hendzel, M. J. (2000). Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature*, *408*(6814), 873–876. <http://doi.org/10.1038/35048603>
- Levsky, J. M., Shenoy, S. M., Chubb, J. R., Hall, C. B., Capodiceci, P., & Singer, R. H. (2007). The spatial order of transcription in mammalian cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *102*(3), 609–17. <http://doi.org/10.1002/jcb.21495>
- Li, G., & Zhu, P. (2015). Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS Letters*, *589*(20), 2893–2904. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.023>

- Liu, L. F., & Wang, J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**(20), 7024–7027. <http://doi.org/10.1073/pnas.84.20.7024>
- Lomberk, G., Wallrath, L., & Urrutia, R. (2006). The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biology*, **7**(7), 228. <http://doi.org/10.1186/gb-2006-7-7-228>
- Lorch, Y., LaPointe, J. W., & Kornberg, R. D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell*, **49**(2), 203–10. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90561-7](http://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90561-7)
- Luger, K., Mäder, a W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**(6648), 251–260. <http://doi.org/10.1038/38444>
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H. F. M., Quivy, J.-P., Roche, D., Taddei, A., ... Almouzni, G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nature Genetics*, **30**(3), 329–334. <http://doi.org/10.1038/ng843>
- Maison, C., Bailly, D., Roche, D., de Oca, R. M., Probst, A. V, Vassias, I., ... Almouzni, G. (2011). SUMOylation promotes de novo targeting of HP1 $\alpha$  to pericentric heterochromatin. *Nature Genetics*, **43**(3), 220–227. <http://doi.org/10.1038/ng.765>
- Maloney, A., Clarke, P. a., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Koopman, J. O., Akpan, A., ... Workman, P. (2007). Gene and protein expression profiling of human ovarian cancer cells treated with the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Research*, **67**(7), 3239–3253. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2968>
- Matatiele, P., Tikly, M., Tarr, G., & Gulumian, M. (2015). DNA methylation similarities in genes of black South Africans with systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis. *PLoS ONE*, **10**(1), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0129299>
- Mateescu, B., England, P., Halgand, F., Yaniv, M., & Muchardt, C. (2004). Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Reports*, **5**(5), 490–496. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400139>
- Matrisciano, F., Tueting, P., Dalal, I., Kadriu, B., Grayson, D. R., Davis, J. M., ... Guidotti, A. (2013). Epigenetic Modifications of GABAergic Interneurons Are Associated With the Schizophrenia-Like Phenotype Induced By Prenatal Stress in Mice. *Neuropharmacology*, **68**, 184–194. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.013>
- McHugh, C. a., Chen, C.-K., Chow, A., Surka, C. F., Tran, C., McDonel, P., ... Guttman, M. (2015). The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/nature14443>
- Meehan, R. R., Kao, C. F., & Pennings, S. (2003). HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO Journal*, **22**(12), 3164–3174. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg306>
- Mendillo, M. L., Santagata, S., Koeva, M., Bell, G. W., Hu, R., Tamimi, R. M., ... Lindquist, S. (2012). HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell*, **150**(3), 549–562. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.031>
- Metz, A., Soret, J., Vourc'h, C., Tazi, J., & Jolly, C. (2004). A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *Journal of Cell Science*, **117**(Pt 19), 4551–4558.

<http://doi.org/10.1242/jcs.01329>

- Meuleman, W., Peric-hupkes, D., Kind, J., Beaudry, J., Pagie, L., Kellis, M., ... Steensel, B. Van. (2013). Constitutive nuclear lamina – genome interactions are highly conserved and associated with A / T-rich sequence, 270–280. <http://doi.org/10.1101/gr.141028.112.8>
- Min, J.-N., Huang, L., Zimonjic, D. B., Moskophidis, D., & Mivechi, N. F. (2007). Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors. *Oncogene*, **26**(35), 5086–5097. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210317>
- Mishima, Y., Watanabe, M., Kawakami, T., Jayasinghe, C. D., Otani, J., Kikugawa, Y., ... Suetake, I. (2013). Hinge and chromoshadow of HPI $\alpha$  participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *Journal of Molecular Biology*, **425**(1), 54–70. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.018>
- Misteli, T., Gunjan, a, Hock, R., Bustin, M., & Brown, D. T. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, **408**, 877–881. <http://doi.org/10.1038/35048610>
- Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., ... Khochbin, S. (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes and Development*, **27**(15), 1680–1692. <http://doi.org/10.1101/gad.220095.113>
- Motamedi, M. R., Hong, E. J. E., Li, X., Gerber, S., Denison, C., Gygi, S., & Moazed, D. (2008). HPI Proteins Form Distinct Complexes and Mediate Heterochromatic Gene Silencing by Nonoverlapping Mechanisms. *Molecular Cell*, **32**(6), 778–790. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.026>
- Muchardt, C., Guillemé, M., Seeler, J. S., Trouche, D., Dejean, A., & Yaniv, M. (2002). Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HPI $\alpha$ . *EMBO Reports*, **3**(10), 975–981. <http://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf194>
- Neudegger, T., Verghese, J., Hayer-Hartl, M., Hartl, F. U., & Bracher, A. (2016). Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, **1**(November 2015). <http://doi.org/10.1038/nsmb.3149>
- Nie, Y., Cheng, X., Chen, J., & Sun, X. (2014). Nucleosome organization in the vicinity of transcription factor binding sites in the human genome. *BMC Genomics*, **15**(1), 493. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-493>
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P., & Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes and Development*, **16**(4), 479–489. <http://doi.org/10.1101/gad.967202>
- Nizialek, E. A., Sankunny, M., Niazi, F., & Eng, C. (2015). Cancer-predisposition gene *KLLN* maintains pericentric H3K9 trimethylation protecting genomic stability. *Nucleic Acids Research*, **gkv1481**. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv1481>
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S. I. S., & Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HPI in fission yeast. *Nature Cell Biology*, **4**(1), 89–93. <http://doi.org/10.1038/ncb739>
- Nora, E. P., Lajoie, B. R., Schulz, E. G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., ... Heard, E. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, **485**, 381–385. <http://doi.org/10.1038/nature11049>

- Norouzi, D., & Zhurkin, V. B. (2015). Topological Polymorphism of the Two-Start Chromatin Fiber. *Biophysical Journal*, **108**(10), 2591–2600. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.015>
- Obuse, C., Iwasaki, O., Kiyomitsu, T., Goshima, G., Toyoda, Y., & Yanagida, M. (2004). A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HPI and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nature Cell Biology*, **6**(11), 1135–1141. <http://doi.org/10.1038/ncb1187>
- Oliveira, R. a, & Nasmyth, K. (2010). Getting through anaphase: splitting the sisters and beyond. *Biochemical Society Transactions*, **38**(6), 1639–1644. <http://doi.org/10.1042/BST0381639>
- Oliveira, R. A., Kotadia, S., Tavares, A., Mirkovic, M., Bowlin, K., Eichinger, C. S., ... Sullivan, W. (2014). Centromere-independent accumulation of cohesin at ectopic heterochromatin sites induces chromosome stretching during anaphase. *PLoS Biology*, **12**(10), e1001962. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001962>
- Osakabe, A., Adachi, F., Arimura, Y., Maehara, K., Ohkawa, Y., & Kurumizaka, H. (2015). Influence of DNA methylation on positioning and DNA flexibility of nucleosomes with pericentric satellite DNA. *Open Biology*.
- Ozer, G., Luque, A., & Schlick, T. (2015). The chromatin fiber: multiscale problems and approaches. *Current Opinion in Structural Biology*, **31**, 124–139. <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.04.002>
- Panova, a. V., Nekrasov, E. D., Lagarkova, M. a., Kiselev, S. L., & Bogomazova, a. N. (2013). Late replication of the inactive X chromosome is independent of the compactness of chromosome territory in human pluripotent stem cells. *Acta Naturae*, **5**(17), 54–61.
- Parker, C. S., & Topol, J. (1984). A Drosophila RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp 70 gene. *Cell*, **37**(1), 273–283. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90323-4](http://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90323-4)
- Pernet, L., Faure, V., Gilquin, B., Dufour-Guerin, S., Khochbin, S., & Vourc'h, C. (2014). HDAC6-ubiquitin interaction controls the duration of HSF1 activation after heat shock. *Molecular Biology of the Cell*, **25**(25), 4187–4194. <http://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1032>
- Peters, A. H. F. M., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R. J., Derijck, A. a H. a, Perez-Burgos, L., ... Jenuwein, T. (2003). Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Molecular Cell*, **12**(6), 1577–1589. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00477-5](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00477-5)
- Peters, A. H. F. M., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., ... Jenuwein, T. (2001). Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability. *Cell*, **107**(3), 323–337. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00542-6](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00542-6)
- Poleshko, A., Mansfield, K. M., Burlingame, C. C., Andrade, M. D., Shah, N. R., & Katz, R. A. (2013). The Human Protein PRR14 Tethers Heterochromatin to the Nuclear Lamina During Interphase and Mitotic Exit. *Cell Rep*, **5**(2), 1–17. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Probst, A. V., Okamoto, I., Casanova, M., Elmarjou, F., Le, P., & Almouzni, G. (n.d.). Probst et al. - 2010 - A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. - Developmental cell.pdf, **2**(1).
- Probst, A. V., Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., & Almouzni, G. (2010). A Strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Developmental Cell*, **19**(4), 625–638. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.002>

- Puschendorf, M., Terranova, R., Boutsma, E., Mao, X., Isono, K., Brykczynska, U., ... Peters, A. H. F. M. (2008). PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nature Genetics*, **40**(4), 411–420. <http://doi.org/10.1038/ng.99>
- Raychaudhuri, S., Loew, C., Kömer, R., Pinkert, S., Theis, M., Hayer-Hartl, M., ... Down-regulation, E. P. (2014). Interplay of acetyltransferase EP300 and the proteasome system in regulating heat shock transcription factor 1. *Cell*, **156**(5), 975–985. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.055>
- Raynes, R., Pombier, K. M., Nguyen, K., Brunquell, J., Mendez, J. E., & Westerheide, S. D. (2013). The SIRT1 Modulators AROS and DBC1 Regulate HSF1 Activity and the Heat Shock Response. *PLoS ONE*, **8**(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054364>
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., ... Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**(6796), 593–599. <http://doi.org/10.1038/35020506>
- Richart, A. N., Brunner, C. I. W., Stott, K., Murzina, N. V., & Thomas, J. O. (2012). Characterization of chromoshadow domain-mediated binding of Heterochromatin Protein 1alpha (HP1alpha) to histone H3. *Journal of Biological Chemistry*, **287**(22), 18730–18737. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.337204>
- Ritossa, F. M., & Vonborstel, R. C. (1964). Chromosome Puffs in Drosophila Induced by Ribonuclease. *Science*, **145**(3631), 513–514. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14163779>
- Rizzi, N., Denegri, M., Chiodi, I., Corioni, M., Valgardsdottir, R., Cobianchi, F., ... Biamonti, G. (2004). Transcriptional Activation of a Constitutive Heterochromatic Domain of the Human Genome in Response to Heat Shock. *Molecular Biology of the Cell*, **15**(February), 3751–3737. <http://doi.org/10.1091/mbc.E03>
- Romeo, K., Louault, Y., Cantaloube, S., Loiodice, I., Almouzni, G., & Quivy, J.-P. (2015). The SENP7 SUMO-Protease Presents a Module of Two HP1 Interaction Motifs that Locks HP1 Protein at Pericentric Heterochromatin. *Cell Reports*, **10**(5), 771–782. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.004>
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., ... Miyawaki, A. (2008). Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell*, **132**(3), 487–498. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.033>
- Saksouk, N., Barth, T. K., Ziegler-Birling, C., Olova, N., Nowak, A., Rey, E., ... Déjardin, J. (2014). Redundant Mechanisms to Form Silent Chromatin at Pericentromeric Regions Rely on BEND3 and DNA Methylation. *Molecular Cell*, **2**(4), 580–594. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.001>
- Saksouk, N., Simboeck, E., & Déjardin, J. (2015). Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics & Chromatin*, **8**, 3. <http://doi.org/10.1186/1756-8935-8-3>
- Sandqvist, A., Bjork, J., Åkerfelt, M., Chitikova, Z., Grichine, A., Vourc'h, C., ... Sistonen, L. (2009). Heterotrimerization of Heat-Shock Factors 1 and 2 Provides a Transcriptional Switch in Response to Distinct Stimuli. *Development (Cambridge, England)*, **20**(11), 1340–1347. <http://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Santagata, S., & Hu, R. (2011). High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(45), 18378–18383. <http://doi.org/10.1073/pnas.1115031108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1115031108>

- Santenard, A., Ziegler-birling, C., Koch, M., Tora, L., & Andrew, J. (2010). Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3 . 3. *Nat Cell Biol*, *12*(9), 853–862. <http://doi.org/10.1038/ncb2089.Heterochromatin>
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., ... Reuter, G. (2002). Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO Journal*, *21*(5), 1121–1131. <http://doi.org/10.1093/emboj/21.5.1121>
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., ... Jenuwei, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *GENES & DEVELOPMENT*, *18*, 1251–1262. <http://doi.org/10.1101/gad.300704.chromatin>
- Schueler, M. G., & Sullivan, B. a. (2006). Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *7*, 301–13. <http://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115613>
- Schvartzman, J.-M., Sotillo, R., & Benezra, R. (2010). Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nature Publishing Group*, *10*(2), 102–115. <http://doi.org/10.1038/nrc2781>
- Scott, K. C., Merrett, S. L., & Willard, H. F. (2006). A heterochromatin barrier partitions the fission yeast centromere into discrete chromatin domains. *Current Biology*, *16*(2), 119–129. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.065>
- Sengupta, S., Parihar, R., & Ganesh, S. (2009). Satellite III non-coding RNAs show distinct and stress-specific patterns of induction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *382*(1), 102–107. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.137>
- Sharma, P., Azebi, S., England, P., Christensen, T., Møller-Larsen, A., Petersen, T., ... Muchardt, C. (2012). Citrullination of Histone H3 Interferes with HPI-Mediated Transcriptional Repression. *PLoS Genetics*, *8*(9), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002934>
- Shin, J. a., Eun, S. C., Hyun, S. K., Ho, J. C. Y., Watts, F. Z., Sang, D. P., & Jang, Y. K. (2005). SUMO modification is involved in the maintenance of heterochromatin stability in fission yeast. *Molecular Cell*, *19*(6), 817–828. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.021>
- Shumaker, D. K., Dechat, T., Kohlmaier, A., Adam, S. a, Bozovsky, M. R., Erdos, M. R., ... Goldman, R. D. (2006). Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(23), 8703–8708. <http://doi.org/10.1073/pnas.0602569103>
- Silkworth, W. T., Nardi, I. K., Scholl, L. M., & Cimini, D. (2009). Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PLoS One*, *4*(8), e6564. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0006564>
- Simon, J. A., & Kingston, R. E. (2013). Occupying Chromatin: Polycomb Mechanisms for Getting to Genomic Targets, Stopping Transcriptional Traffic, and Staying Put. *Molecular Cell*, *49*(5), 808–824. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.013>
- Slee, R. B., Steiner, C. M., Herbert, B.-S., Vance, G. H., Hickey, R. J., Schwarz, T., ... Grimes, B. R. (2012). Cancer-associated alteration of pericentromeric heterochromatin may contribute to chromosome instability. *Oncogene*, *31*(27), 3244–3253. <http://doi.org/10.1038/onc.2011.502>

- Smeets, D., Markaki, Y., Schmid, V. J., Kraus, F., Tattermusch, A., Cerase, A., ... Cremer, M. (2014). Three-dimensional super-resolution microscopy of the inactive X chromosome territory reveals a collapse of its active nuclear compartment harboring distinct Xist RNA foci. *Epigenetics & Chromatin*, **7**(1), 8. <http://doi.org/10.1186/1756-8935-7-8>
- Souza, P. P., Völkel, P., Trinel, D., Vandamme, J., Rosnoblet, C., Héliot, L., & Angrand, P.-O. (2009). The histone methyltransferase SUV420H2 and Heterochromatin Proteins HPI interact but show different dynamic behaviours. *BMC Cell Biology*, **10**, 41. <http://doi.org/10.1186/1471-2121-10-41>
- Splinter, E., de Wit, E., Nora, E. P., Klous, P., van de Werken, H. J. G., Zhu, Y., ... de Laat, W. (2011). The inactive X chromosome adopts a unique three-dimensional conformation that is dependent on Xist RNA. *Genes and Development*, **25**(13), 1371–1383. <http://doi.org/10.1101/gad.633311>
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., ... Shinkai, Y. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes and Development*, **16**(14), 1779–1791. <http://doi.org/10.1101/gad.989402>
- Tagarro, I., Fernfindez-peralta, A. M., & Gonz, J. J. (1994). h u m a n .. genet , cs Chromosomal localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes, 383–388.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., ... Zhao, Y. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, **146**(6), 1016–1028. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.008>
- Tanne, A., Muniz, L. R., Puzio-Kuter, A., Leonova, K. I., Gudkov, A. V., Ting, D. T., ... Greenbaum, B. D. (2015). Distinguishing the immunostimulatory properties of noncoding RNAs expressed in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(49), 201517584. <http://doi.org/10.1073/pnas.1517584112>
- Tatum, M. C., Ooi, F. K., Chikka, M. R., Chauve, L., Martinez-Velazquez, L. A., Steinbusch, H. W. M., ... Prahlad, V. (2015). Neuronal Serotonin Release Triggers the Heat Shock Response in *C. elegans* in the Absence of Temperature Increase. *Current Biology*, **25**(2), 163–174. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.040>
- Teves, S. S., Weber, C. M., & Henikoff, S. (2014). Transcribing through the nucleosome. *Trends in Biochemical Sciences*, **39**(12), 577–86. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.004>
- The ENCODE Project Consortium, Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. a., ... Lochofsky, L. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, **489**(7414), 57–74. <http://doi.org/10.1038/nature11247>
- Tilman, G., Nausica Arnoult, S. L., Beneden, A. Van, Lorient, A., Smet, C. De, & Decottignies, A. (2012). Cancer-linked satellite 2 DNA hypomethylation does not regulate Sat2 non-coding RNA expression and is initiated by heat shock pathway activation. *Epigenetics* **7:8**, **7:8**(August), 903–913.
- Ting, D. T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B. W., Akhavanfard, S., Coffman, E. J., ... Haber, D. A. (2011). Aberrant Overexpression of Satellite, **331**(February), 593–597.
- Tissières, a, Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, **84**(3), 389–398. [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90447-1](http://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90447-1)

- Vad-Nielsen, J., & Nielsen, A. L. (2015). Beyond the histone tale: HPI $\alpha$  deregulation in breast cancer epigenetics. *Cancer Biology & Therapy*, *16*(2), 189–200. <http://doi.org/10.1080/15384047.2014.1001277>
- Valgardsdottir, R., Chiodi, I., Giordano, M., Cobiانchi, F., Riva, S., & Biamonti, G. (2005). Structural and Functional Characterization of Noncoding Repetitive RNAs Transcribed in Stressed Human Cells. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(1), 1–13. <http://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Valgardsdottir, R., Chiodi, I., Giordano, M., Rossi, A., Bazzini, S., Ghigna, C., ... Biamonti, G. (2007). Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells. *Nucleic Acids Research*, *36*(2), 423–434. <http://doi.org/10.1093/nar/gkm1056>
- van Steensel, B. (2011). Chromatin: constructing the big picture. *The EMBO Journal*, *30*(10), 1885–95. <http://doi.org/10.1038/emboj.2011.135>
- Velichko, A. K., Kantidze, O. L., & Razin, S. V. (2011). HPI $\alpha$  is not necessary for the structural maintenance of centromeric heterochromatin. *Epigenetics*, *6*(3), 380–387. <http://doi.org/10.4161/epi.6.3.13866>
- Velichko, A. K., Petrova, N. V., Kantidze, O. L., & Razin, S. V. (2012). Dual effect of heat shock on DNA replication and genome integrity. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(17), 3450–60. <http://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1009>
- Verni, F., & Cenci, G. (2015). The Drosophila histone variant H2A.V works in concert with HPI to promote kinetochore-driven microtubule formation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, (February 2015), 37–41. <http://doi.org/10.4161/15384101.2014.991176>
- Volpe, T. a., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I. S., & Martienssen, R. a. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5588), 1833–1837. <http://doi.org/10.1126/science.1074973>
- Wakamori, M., Fujii, Y., Suka, N., Shirouzu, M., Sakamoto, K., Umehara, T., & Yokoyama, S. (2015). Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation. *Scientific Reports*, *5*(August), 1–16. <http://doi.org/10.1038/srep17204>
- Wallrath, L. L., & Elgin, S. C. R. (1995). Position effect variegation in Drosophila is associated with an altered chromatin structure. *Genes and Development*, *9*(10), 1263–1277. <http://doi.org/10.1101/gad.9.10.1263>
- Wang, B., Lee, C.-W., Witt, A., Thakkar, A., & Ince, T. A. (2015). Heat shock factor 1 induces cancer stem cell phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, *153*(1), 57–66. <http://doi.org/10.1007/s10549-015-3521-1>
- Wang, G., Ma, a, Chow, C. M., Horsley, D., Brown, N. R., Cowell, I. G., & Singh, P. B. (2000). Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Molecular and Cellular Biology*, *20*(18), 6970–6983. <http://doi.org/10.1128/MCB.20.18.6970-6983.2000>
- Wang, G., Ying, Z., Jin, X., Tu, N., Zhang, Y., Phillips, M., ... Mivechi, N. F. (2004). Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *Genesis*, *38*(2), 66–80. <http://doi.org/10.1002/gene.20005>
- Weighardt, F., Cobiانchi, F., Cartegni, L., Chiodi, I., Villa, a, Riva, S., & Biamonti, G. (1999). A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock.

*Journal of Cell Science*, 112 ( Pt 1, 1465–1476.

- White, A. E., Hieb, A. R., & Luger, K. (2016). A quantitative investigation of linker histone interactions with nucleosomes and chromatin. *Scientific Reports*, 6, 19122. <http://doi.org/10.1038/srep19122>
- Yamane, K., Mizuguchi, T., Cui, B., Zofall, M., Noma, K. I., & Grewal, S. I. S. (2011). Asf1/HIRA facilitate global histone deacetylation and associate with HP1 to promote nucleosome occupancy at heterochromatic loci. *Molecular Cell*, 41(1), 56–66. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.009>
- Yen, K., Vinayachandran, V., & Pugh, B. F. (2013). SWR-C and INO80 chromatin remodelers recognize nucleosome-free regions near +1 nucleosomes. *Cell*, 154(6), 1246–56. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.043>
- Zelin, E., & Freeman, B. C. (2015). Lysine Deacetylases Regulate the Heat Shock Response Including the Age-Associated Impairment of HSF1. *Journal of Molecular Biology*, 427, 1644–1654. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.010>
- Zhang, R., Liu, S., Chen, W., Bonner, M., Pehrson, J., Yen, T. J., & Adams, P. D. (2007). HP1 proteins are essential for a dynamic nuclear response that rescues the function of perturbed heterochromatin in primary human cells. *Molecular and Cellular Biology*, 27(3), 949–962. <http://doi.org/10.1128/MCB.01639-06>
- Zheng, X., Kim, Y., & Zheng, Y. (2015). Identification of lamin B-regulated chromatin regions based on chromatin landscapes. *Molecular Biology of the Cell*, 26(14), 2685–97. <http://doi.org/10.1091/mbc.E15-04-0210>



## **Annexe 1**

Les résultats acquis au cours de ma thèse concernant la région YqI2 et la présence de nSBs *in vivo* chez l'Homme sont présentés dans cette annexe sous la forme d'un manuscrit.

## **Specific targeting of HSF1 and HSF2 to chromosome 9 and chromosome Y pericentric heterochromatin in testis.**

Jessica Penin<sup>#</sup>, Anthony Lucas<sup>#</sup>, Quentin Royer<sup>#</sup>, Edwige Col<sup>#</sup>, Solenne Guérin<sup>#</sup>, Virginie Faure<sup>#</sup>, Jacques Mazzega<sup>#</sup>, Sylviane Hennebicq<sup>§</sup>, Metzler-Guillemain C<sup>¶</sup>, Valérie Mitchell<sup>§</sup>, Claire Vourc'h<sup>#\*</sup>

<sup>#</sup> Institut Albert Bonniot, INSERM/UGA U1209, CNRS/UGA UMR 5309, santé, La Tronche BP170, 38042 Grenoble Cedex

<sup>¶</sup> Inserm U4991 Faculté de Médecine Timone, Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5

<sup>§</sup> MCU-PH Institut de Biologie de la Reproduction-Spermiologie-CECOS EA 4308 Spermatogenèse et qualité du gamète mâle Hôpital A Calmette, CHRU 59037 Lille cedex

\* Mail : [claire.vourch@ujf-grenoble.fr](mailto:claire.vourch@ujf-grenoble.fr)

### **Abstract**

Transcriptional activation of pericentric heterochromatin in heat-shocked cells is one of the most striking examples of transcriptional activation of pericentric heterochromatin. Until now, pericentric heterochromatin of chromosome 9 has been identified as a primary target of HSF1 in both normal and tumor heat shocked cells. Here we bring new evidence that pericentric heterochromatin of chromosome Y is also a primary important physiological target of HSF1 in stressed cells. More importantly, we demonstrate that pericentric heterochromatin of chromosomes 9 and Y is targeted by HSF1 and HSF2 in male germ cells. Our observation is the first evidence that HSF1 targeting to pericentric heterochromatin of chromosomes 9 and Y occurs in a normal physiologic context and strongly suggests that the accumulation of sat III transcripts in these cells is a direct consequence of HSF1 binding to pericentric heterochromatin.

## **Introduction :**

Cell exposure to proteotoxic stress, such as heat shock, induces major and transient changes in gene expression. This response is under the control of a key transcription factor, named Heat-shock Factor 1 (HSF1) (**Akerfeld et al. 2010a**). Upon heat-shock, hyperphosphorylated active HSF1 trimerizes, and transactivates heat shock (hsp) genes encoding HSP proteins. HSPs belong to a class of functionally related proteins playing a role on protein folding (**Akerfeld et al. 2010a**). More recently, the transcriptional activation of pericentric heterochromatin enriched in satellite III (Sat III) sequences has also been described (**Jolly et al. 2004, Rizzi et al 2004**). Sat III sequences are characterized by repetitive GGAAT motifs organized in tandem, present in a head to tail orientation. Pericentric heterochromatin contains a large number of transcription units covering several megabasis. This unique configuration allows an *in situ* characterization of the different actors involved in the transcriptional activation of these sequences. Likewise, upon heat-shock, the recruitment of HSF1, Histone acetyl transferase CBP/p300 and RNA pol II (RNAP II) factors to pericentric heterochromatin leads to the formation of stress specific structures also known as nuclear Stress Bodies (nSBs) (**Biamonti & Vourc'h 2011**). nSBs can be easily detected by immunofluorescence using anti HSF1 or anti acetylated-histone antibodies. Sat III transcripts are long noncoding poly(A) RNAs, heterogeneous in size. Once transcribed, they accumulate at transcription sites, suggesting a role for these transcripts in the maintenance and/or reformation of heterochromatin in stressed cells. Recruitment of specific splicing factors to nSBs and their interaction with sat III transcripts suggest that sat III transcripts undergo post-transcriptional maturation. Alternatively, transient recruitment of transcription and splicing factors to nSBs may contribute to functional reprogramming of nuclear function through their transient sequestration at nSBs (**Biamonti & Vourc'h 2011**).

In normal female human cells, nSBs are detected at heterochromatic regions of chromosome 9 (9q12 locus) (Jolly et al 2002). In cancer cells, in contrast to normal cells, although the 9q12 locus represents a primary target, several secondary nSBs are also detected. In most cases, these secondary nSBs are barely undetectable. However, the number and intensity of these secondary nSBs increases with the amount of active HSF1 within the cell (**Eymery et al. 2010**). Based on *in vitro* reconstitution of nSBs, obtained by incubating metaphase chromosome spreads with purified active HSF1, a number of

chromosomes, all containing sat II and sat III sequences, have been identified including chromosome Y. Likewise, in stressed rodent:human hybrid cell lines containing a unique human chromosome, HSF1 foci are formed when sat II/sat III containing chromosomes are present, suggesting that the absence of chromosome 9 favors the binding of HSF1 to secondary targets (**Eymery et al. 2010**).

So far, only patho-physiological contexts have been identified to promote a HSF1 binding dependent transcriptional activation of pericentric heterochromatin in the literature, although HSF1 is known to play an important role in tumor promotion, brain development and fertility. HSF1 overexpression has been identified as a tumor-promoting factor (Dai et al 2007) and an accumulation of transcripts of pericentric origin has been described in tumor tissues (**Eymery et al. 2010, Ting et al 2011**). However, the presence of nSBs in tumor tissues has not yet been reported and no direct correlation has been established so far between HSF1 and the transcriptional activation of pericentric sequences. Likewise, while an accumulation of major satellite (**Rudert et al. 1995**) and sat III RNA (Jehan et al. 2007) have been detected in testis, no evidence that this accumulation is governed by HSF1 binding to pericentric heterochromatin exists so far.

In HSF1<sup>+/+</sup> mice, a high expression of HSF1 is observed in the nuclei of round spermatids. HSF1 is only present as discrete spots in the spermatocytes undergoing meiosis I and II and disappears in early elongating spermatids. Moreover, in mice, HSF1<sup>+/+</sup> mice, HSF1 occupies sex chromosomal multicopy genes and regulates the transcription of these genes in round spermatids, at a stage where the sex chromatin is mostly repressed (**Akerfeld et al 2010b**).

Evidence exists that HSF1 and HSF2, a member of the HSF family known to form heterotrimers with HSF1 (**Sandqvist et al. 2009**), play an important role in male fertility. Mice overexpressing an active form of HSF1 in the testis are infertile due to a block in spermatogenesis. The germ cells are arrested at the pachytene stage and enter into apoptosis. In addition, heat-induced activation of HSF1 in wild-type testis is associated with marked apoptosis of germ cells at early and late stages. In that case, apoptosis of spermatocytes appears as an early event (**Nakai et al. 2010**). Although they produce less sperm and exhibit an increase in disorganized or missing layers of germ cells in the seminiferous tubules, HSF1<sup>-/-</sup> males are fertile. Interestingly, hsf1<sup>-/-</sup> and hsf2<sup>-/-</sup> mice display

a complete block of the differentiation program at the first meiotic step of spermatogenesis, thus suggesting that additive or synergistic transcriptional activity of both hsf1 and hsf2 is required for normal mammalian spermatogenesis and male fertility (Wang et al. 2004).

Here we identify pericentric heterochromatin of chromosome Y as a new target of HSF1 in normal stressed cells. Moreover, we show that both chromosome 9 and Y pericentric heterochromatin are targeted by HSF1 and HSF2 in human testis thus suggesting a direct involvement of HSF1 in pericentric heterochromatin transcriptional activation in this tissue.

## **Results**

### **HSF1 is targeted to pericentric heterochromatin of chromosome Y in stressed cells**

Human HT1080 cells are male diploid cells therefore displaying a genotype closer to that of normal cells than many other tumor cells also available. By combining immunofluorescence to detect HSF1 and Fluorescence in situ Hybridization (FISH) to specifically detect the 9q12 region, the primary target of nSBs in all cell lines analyzed so far, we found that, in these cells, nSBs do not form at chromosome 9 (Fig. 1A) but only form a unique nSBs displayed a perfect co-localization with a probe specific for the Yq12 locus. (Fig. 1B)

Based on this observation, we then sought to test if the presence of a unique nSB was a common feature of human male cells. We therefore detected HSF1 in stressed primary male fibroblasts, and the percentages of cells displaying a unique signal on chromosome 9, on chromosome Y, or on both chromosomes determined. As shown in Figure 1C, the same percentage of cells displaying HSF1 foci on chromosome 9 (19%) or Y (21%) was observed while a larger percentage of cells displaying signals on both chromosomes 9 and Y (60%) was also identified, suggesting that these two chromosomes indeed represent primary targets with equal affinity for HSF1 in normal fibroblasts.

The reason why, in contrast to normal fibroblasts cells, pericentric heterochromatin of chromosome Y is seemingly exclusively targeted by HSF1 in HT1080 cells is unclear since HT1080 cells do contain chromosome 9 specific sat III sequences as tested by DNA FISH on metaphase spreads from HT1080 cells with a probe specific for chromosome 9 sat III sequence. However, as shown in Figure 2A, chromosome 9 specific sat III sequences are

present in HT1080 cells. Moreover, the formation of nSBs could be restored in HT1080 cells transiently transfected with a plasmid expressing the fusion HSF1-GFP protein (**Fig. 2B**), suggesting that lack of HSF1 binding on chromosome 9 results from a lower affinity of HSF1 for chromosome Y as compared to chromosome 9.

#### **Determination of HSF1 binding sites at the Yq12 locus.**

Binding of HSF1 on multicopy genes of chromosome Y has already been reported (Akerfelt et al 2010) and immunofluorescence analysis also suggests that highly repetitive motives are targeted by HSF1 (**Eymery et al. 2010**). The possibility that of HSF1 binding on chromosome Y sat III sequences was investigated two ways. We first tested the presence of nSBs in two different human: hamster somatic hybrid cell lines, one containing the entire chromosome Y (GM10890) as the only human material and one containing a truncated chromosome Y depleted of its Yq12 band and thus depleted of its sat III sequences (GM06317Y) (**Fig.3A**). HSF1 does not form nSBs in hamster cell lines (**Eymery et al. 2010**). In contrast to what observed in GM10890, no HSF1 foci were detected in stressed GM06317Y. The existence of putative Heat Shock Element (HSEs) binding sites within chromosome Y specific genomic sat III sequence prompted us to examine by ChIP if these sequences were indeed targeted by HSF1. Given the repetitive nature of satellite sequences, couples of primers were designed in the close vicinity of putative Heat Shock Elements that we identified in silico. The specificity of the PCR reaction was tested by hybridizing the PCR product onto human male chromosomes. In these cells, only chromosome Y was labeled (**Fig.3B**). An amplification product was also obtained with 9q12 specific probes. No amplification product was obtained in HeLa cells lacking chromosome Y or in control experiments (**Fig 3B**). Our data thus suggest that HSEs on sat III sequences of chromosome Y, are effective binding sites for active HSF1.

#### **Sat III sequences from chromosome Y are actively transcribed upon heat shock**

To determine if HSF1 binding to the Yq12 locus also triggered transcription of sat III sequences, chromosome Y specific sat III RNA were detected by RNA FISH in HT1080 as well as in stressed amniocytes and primary fibroblasts from male donors (**Figure 4**). Moreover, chromosome Y specific sat III transcripts were also detected by RNA FISH with a 50 bp cy3 labeled probe containing repeats of the (GGAAT) motifs, indicating that, in stressed cells,

chromosome Y specific sat III sequences are mainly expressed in a sense (G-rich) orientation (data not shown).

### **Chromosome 9 and Y pericentric heterochromatin is targeted by HSF1 and HSF2 in testis**

HSF1 binding to chromosome 9 and Y was further examined in testis tissue. Indeed, HSF1 has been found to play an important role in spermatogenesis (**Akerfelt 2010b**) where it targets important genes, present in multiple copies, on chromosome Y (**Akerfelt 2010a**). As in mouse, HSF1 was detected in spermatocytes and round spermatogonia. HSF1 was also detected in Sertoli cells (**Fig 5**). Moreover, the presence of HSF1 at the 9q12 and Yq12 regions in male cells raised the possibility that HSF1 targeting to these sequences could play a specific role in gametogenesis. Interestingly, HSF1 foci were indeed detected in human testis sections in spermatocytes (average of 1 to 3 foci per nucleus) as well as in round spermatids (**Fig 5A**). Moreover, HSF1 foci were found to colocalize with HSF2 as determined in HSF1-HSF2 co-immunofluorescence experiments (**Fig 6A**). As for HSF1, HSF2 foci were detected in spermatocytes, in round spermatids and Sertoli cells as well as in elongated spermatids (**Fig 6B**). No significant co-localization between HSF1 and  $\gamma$ -H2AX foci, a well-known marker of the sex-vesicle was observed (Sup Fig 1). Using immuno-DNA FISH with an antibody against HSF1 and DNA probes specific for chromosomes 9 and Y, we next determined that 9q12 and Yq12 loci were indeed targeted by HSF1 as observed in male heat-shocked fibroblasts. In this experiment, the specificity of the DNA FISH experiment was assessed by immunoDNA FISH using  $\gamma$ -H2AX as a marker of the sex vesicle. As expected, the Yq12 locus was found to colocalize at a high frequency with  $\gamma$ -H2AX foci (**Fig. 7A**). Similar to what observed in normal heat-shocked fibroblasts, HSF1 foci were found to colocalize with either the 9q12 or Yq12 loci (**Fig. 7b**).

### **Discussion:**

Until now, chromosome 9 has been considered in the literature as the primary target of HSF1; although secondary nSBs have also been reported on other chromosomes enriched in sat II and sat III sequences (**Eymery et al. 2010**). We now bring new evidence that chromosome Y, and more specifically chromosome Y specific sat III sequences, represent a major target for HSF1 in human cells and that these sequences are actively transcribed upon heat-shock. The presence of canonical HSEs on sat III of chromosome Y, together with our

observation that these sequences are detected in HSF1 ChIP experiments suggests that, as for chromosome 9, chromosome Y specific Sat III sequences represent high affinity binding sites for HSF1. The reason why, in HT1080 cells, nSBs exclusively form on chromosome Y, and not on chromosome 9 as in all other normal and tumor types investigated so far, remains unclear. Clearly, the 9q12 region in HT1080 cells still displays a capacity to bind HSF1 in reconstitution experiments in which HT1080 mitotic chromosome spreads were incubated with purified HSF1 as a way to reconstitute nSBs *in vitro*. Our data however also suggest that loss of HSF1 binding to the 9q12 region in HT1080 cells relies on a lower affinity of HSF1 for the 9q12 region since this binding is clearly rescued in conditions allowing HSF1 overexpression. A possible explanation could be the existence of a cofactor, specifically present in HT1080, either assisting HSF1 toward chromosome Y targeting or, alternatively, preventing HSF1 targeting to chromosome 9. The possibility of polymorphisms affecting the heat shock element or HSF1 itself is unlikely given the number of sat III repeats. Moreover, no mutation was detected in the HSF1 coding sequence in HT1080 (**data not shown**).

The specific role of HSF1 in testis is still unclear but is thought to be different from that in heat shocked cells, since no correlation has been found between the presence of HSF1 and the expression of Hsp genes in testis (Akerfelt et al. 2010a). Interestingly, chromosomal target genes identified so far in testis are also on chromosome Y (**Akerfelt et al. 2010b**). They include the Y-chromosome multicopy genes *Sly* and *Ssty1/2* both characterized as HSF2 targets (**Akerfelt et al. 2008**) and the multi-copy gene family, *Srsy* (**Akerfelt et al. 2010b**). In mouse, an accumulation of major satellite RNA (the functional equivalent of the human sat II/III transcripts) has also been detected in the seminiferous tubules (**Rudert et al. 1994**), but no correlation between the presence of these transcripts and the HSF signaling pathway has been proposed. Although the role of pericentric heterochromatin activation in testis is still unknown, our observation that HSF1 forms foci at pericentric heterochromatin clearly suggests that the accumulation of sat III transcripts results from HSF1 targeting to pericentric heterochromatin of chromosomes 9 and Y. Surprisingly, an accumulation of sat III RNA has also been reported in human testis, but in an orientation opposite to that observed in heat-shocked cells (**Jehan et al. 2007, Eymery et al. 2009**). This point deserves to be clarified in the future. A careful selection of the donors is of course an important issue. In our study, tissue samples from at least 4 different patients with no fertility problems were analyzed,

collected in two different locations.

Our study reveals that sat III sequences of both chromosome 9 and chromosome Y are major targets of HSF1 and HSF2. In human heat-shocked cells HSF1 and HSF2 also occupy the same sat III sequences and HSF1-HSF2 heterotrimers have been identified by FRET (**Sandvist et al. 2009**). HSF2 enrichment at nSBs is abrogated upon HSF1 knocked down, suggesting that HSF1 is required for HSF2 targeting these structures. In mouse testis HSF1 also shares common target genes with HSF2 (**Akerfelt et al. 2010a**). The colocalization we find between HSF1 and HSF2 is thus in agreement with the existence of HSF1-HSF2 heterotrimers described in mouse. The role of HSF1-HSF2 heterotrimers is still unclear. HSF1-HSF2 heterotrimerization has been proposed to provide a switch that integrates transcriptional activation in response to stress and developmental stimuli (**Sandvist et al. 2009**). So far, we have no evidence that the sites of HSF1-HSF2 accumulation we observe, also corresponds to active transcription sites as we could not detect a particular enrichment of acetylated histones within HSF1-HSF2 foci. Likewise, we found no colocalization between HSF1-HSF2 foci and the SRSF1 splicing factor also displaying a binding capacity for sat III RNA (**Metz et al. 2004**). For this reason, we cannot conclude that HSF1-HSF2 foci represent transcriptionally active foci. Interestingly HSF1/HSF2 foci were not detected in all cells but at different stages of spermatogenesis including spermatocytes I, round and elongated spermatids as well as in Sertoli cells. The fact that nSBs are present in both spermatocytes and elongated spermatids indicate that their role is related to the meiotic process itself as well as to chromatin remodeling events accompanying post-meiotic stages. In mouse, satellite RNA accumulation has been found to be required for chromocenter formation in early embryonic development (**Probst et al. 2010**). It is thus possible that in testis, sat III RNA accumulation, possibly resulting, as in heat-shocked cells, from HSF1/HSF2 accumulation, may play an essential role in the formation of heterochromatin before pachytene where most chromosome X and Y genes are known to be transcriptionally inactive. Sat III transcripts may also play a role in the incorporation of histone H2A and H2B named H2AL1, H2AL2 and H2BL1 (**Govin et al., 2007**). These histone variants are incorporated very late during spermiogenesis, when most other histones are removed, and remain present in the mature spermatozoa. They are part of new chromatin structures, which associate with pericentric heterochromatin regions in late condensing spermatids, and could therefore be involved in specifically reprogramming (**Rousseaux et al. 2008**)

Although still to be formally proven, our observation raises the interesting hypothesis that both HSF1 and HSF2 may play an essential role in heterochromatin formation. As in heat-shocked cells, we cannot exclude that other pericentric regions are transcriptionally activated in a HSF1 dependent manner but at a lower level precluding the detection of HSF1 foci by immunofluorescence. Conversely, one can also imagine an alternative hypothesis in which RNA sat III would act in trans toward other pericentric regions through diffusion in the nucleoplasm. In an other perspective, accumulation of sat III RNA at a few chromosomes could also block cell division, allowing crossing over at the pachytene stage or remodeling events at post meiotic stages. In this view, a transcriptional activation of sat III sequences from a small number of chromosomes would be sufficient to bring a signal for cell division arrest. Whatever the role of these foci, our observation clearly suggests that the role of HSF1 and HSF2 in spermatogenesis probably extends far beyond a more conventional control of gene expression.

### **Authors**

Akerfelt M, Henriksson E, Laiho A, Vihervaara A, Rautoma K, Kotaja N, Sistonen L. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 11224–11229

Akerfelt M, Vihervaara A, Laiho A, Conter A, Christians ES, Sistonen L, Henriksson E. (2010a) Heat shock transcription factor 1 localizes to sex chromatin during meiotic repression. J Biol Chem. 285:34469-76.

Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. (2010b) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. Nat Rev Mol Cell Biol. 11:545-55..

Biamonti, G., & Vourc'h, C. (2010). Nuclear stress bodies. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2(6), a000695.

Govin J, Escoffier E, Rousseaux S et al. (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. Journal of Cell Biology 176, 283–294.

Eymery A, Callanan M, Vourc'h C (2009) The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. Int J Dev Biol 53:259-68

Eymery A, Horard B, El Atifi-Borel M, Fourel G, Berger F, Vitte AL, Van den Broeck A, Brambilla E, Fournier A, Callanan M, Gazzeri S, Khochbin S, Rousseaux S, Gilson E, Vourc'h C (2009) A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. Nucleic Acids Res 19:6340-54

Eymery A, Souchier C, Vourc'h C, Jolly C (2010) Heat shock factor 1 binds to and transcribes satellite II and III sequences at several pericentromeric regions in heat-shocked cells. *Exp Cell Res* (in press)

Grady DL, Ratliff RL, Robinson DL, McCanlies EC, Meyne J, and Moyzis RK (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1695-1699

Jehan Z, Vallinayagam S, Tiwari S, Pradhan S, Singh L, Suresh A, Reddy HM, Ahuja YR, Jesudasan RA (2007) Novel noncoding RNA from human Y distal heterochromatic block (Yq12) generates testis-specific chimeric CDC2L2. *Genome Res* 17: 433-40

Jolly C, Konecny L, Grady DL, Kutsikova YA, Cotto JJ, Morimoto RI, Vourc'h C (2002) In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol* 156:775-81

Jolly C, Metz A, Govin J, Vigneron M, Turner BM, Khochbin S, Vourc'h C (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* 164: 25-33

Jolly C and Lakhota SC (2006) Human sat III and *Drosophila* hsr omega transcripts: a common paradigm for regulation of nuclear RNA processing in stressed cells. *Nucleic Acids Res* 34: 5508-14

Metz A, Soret J, Vourc'h C, Tazi J, Jolly C (2004) A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J Cell Sci.* 117:4551-8

Mitchell V, Prevot V, Jennes L, Aubert JP, Croix D, Beauvillain JC. Presence of mu and kappa opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat. *Neuroreport* 1997 8:3167-3172

Nakahori, Y., Mitani, K., Yamada, M. and Nakagome, Y. (1986) A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides *Nucleic Acids Res.* 14: 7569-7580

Nakai A, Suzuki M, Tanabe M. (2000) Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J.* 19:1545-54

Rizzi N, Denegri M, Chiodi I, Corioni M, Valgardsdottir R, Cobiauchi F, Riva S, Biamonti G (2004) Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock *Mol Biol Cell* 15: 543-51

Rocchi, M., Archidiacono, N., Ward, D.C. and Baldini, A. (1991) A human chromosome 9-specific alphoid DNA repeat spatially resolvable from satellite 3 DNA by fluorescent in situ hybridization *JOURNAL Genomics* 9 (3), 517-523

Rousseaux S, Reynoird N, Escoffier E, Thevenon J, Caron C, Khochbin S (2008) Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote *Reproductive BioMedicine Online RBM online* vol 16. No 4 2008 492-503

Rudert F, Bronner S, Garnier JM, Dolle P (1995) Transcripts from opposite strands of gamma

satellite DNA are differentially expressed during mouse development *Mamm Genome* 6: 76-83

Sandqvist A, Björk JK, Akerfelt M, Chitikova Z, Grichine A, Vourc'h C, Jolly C, Salminen TA, Nymalm Y, Sistonen L (2008) *Mol Biol Cell*. 284:1340-7.

Salmand PA, Jungas T, Fernandez M, Conter A, Christians ES. (2008) Mouse heat-shock factor 1 (HSF1) is involved in testicular response to genotoxic stress induced by doxorubicin. *Biol Reprod*. 79(6):1092-101.

Ting DT, Lipson D, Paul S, Brannigan BW, Akhavanfard S, Coffman EJ, Contino G, Deshpande V, Iafrate AJ, Letovsky S, Rivera MN, Bardeesy N, Maheswaran S, Haber DA. Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science*. 2011. 331:593-6.

Wang, G., Ying, Z., Jin, X., Tu, N., Zhang, Y., Philips M, Moskophidis D & Mivechi, N. F. (2004). Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *Genesis*, 38(2), 66-80.

### Figure 1:

Heat-shocked HT1080 display unique HSF1 foci on chromosome Y. HSF1 detected by immunofluorescence (red signal) was not detected on chromosome 9 detected by FISH with the PhUR98 probe specific of chromosome 9 sat III sequences (green signals) (Bar= 10 $\mu$ m) (A) HSF1 detected by immuno-fluorescence (green signal) colocalizes with the Yq12 locus (red signal) detected by FISH (Bar = 5  $\mu$ m) (B). Graph giving the percentage of nSBs present on chromosome 9, chromosome Y or both, in normal fibroblasts. HSF1 foci detected by immunofluorescence were codetected with chromosome Y or chromosome 9 detected by DNA FISH with probes in human primary stressed male and female fibroblasts (total of 200 nuclei analyzed) (C).

**Figure 2:** HT1080 cells do not lack chromosome 9 specific sat III genomic sequences. Simultaneous detection of sat III sequences from chromosome 9 pericentric regions detected with the pHuR98 probe (red signal) and of alphoid sequences from chromosome Y centromeric regions with the pMR9A (green signal). The two chromosomes 9 are also enlarged (A). HSF1 overexpression leads to its binding to pericentric regions of chromosome 9 in HT1080 cells. HT1080 cells transiently transfected with a HSF1-GFP expression vector display HSF1 foci (green signals) at the 9q12 locus detected by FISH (red signal) (B).

**Figure 3:** Chromosome Y sat III sequences bind HSF1. HSF1 was detected by immunofluorescence on somatic hamster:human hybrid cells lines containing either chromosome Y (GM10890) or the Yp->Yq11::17q12->17qter (GM06317Y) region. HSF1 foci were only detected in hybrid cell lines containing the Yq12 locus (Bar = 10  $\mu$ m) (A). ChIP fractions obtained with anti-HSF1 antibody were performed on heat-shock HT1080 or HeLa cells. PCR amplification were performed with primers corresponding to non chromosome-specific sat III or chromosome Y specific sat III sequences. The specificity of the amplification

product obtained with Y specific primers was assessed by a DNA FISH experiment performed on human chromosome spreads. Amplification with chromosome Y specific sat III primers (red boxes) were only observed from ChIP fractions from HT1080. Controls without DNA (-DNA), without reverse transcription (-RT). The localization of putative HSF1 binding sites is also shown on the Yq12 genomic sequences (blue boxes). (B). The specificity of the DNA fraction obtained in the ChIP experiment was tested by DNA FISH experiment after labeling with biotin.

**Figure 4:** Chromosome Y specific sat III sequences are actively transcribed in human cells upon heat shock. Detection of chromosome Y specific sat III transcripts by RNA-FISH together with the pericentric region of chromosome 9 detected by DNA-FISH in HT1080, amniocytes and primary fibroblasts).

**Figure 5: HSF1 detection in testis :** HSF1 detection was performed on testis sections by immunofluorescence. HSF1 labeling is particularly intense in Sertoli cells and round spermatid (bar = 10  $\mu\text{m}$ ) (A). In spermatocytes, round spermatids and Sertoli cells nuclear HSF1 foci were detected (bar = 5  $\mu\text{m}$ ). (B)

**Figure 6: HSF1 and HSF2 colocalize within nuclear foci in testis.** Co-immunofluorescence was performed on testis sections with an anti-HSF1 (red signal) an anti HSF2 (green signal). An enlarged view of image is shown (Bar = 5  $\mu\text{m}$ ) (A) Immunoperoxidase detection of HSF2 in testis sections confirms the presence of nuclear foci in spermatocytes and round spermatids. HSF2 foci are detected in spermatocytes, round spermatids and Sertoli cells. In addition the presence of HSF2 foci are also clearly detected in elongated spermatids (arrow heads (B)

**Figure 7: HSF1 colocalizes with the 9q12 and Yq12 locus.** HSF1 foci were detected by immunofluorescence together with the 9q12 and Yq12 loci by DNA FISH (green signal). A control experiment was performed with an anti  $\gamma$ -H2AX antibody. H2AX foci colocalize with the probe specific for the Yq12 locus but not with the probe specific for the 9q12 locus (bar = 5  $\mu\text{m}$ ) (A). HSF1 foci (red signals) were also detected with a sat III probe specific for the 9q12 or Yq12 genomic sequences. HSF1 foci were found to either colocalize with the 9q12 or Yq12 loci. HSF1 was either detected by immunofluorescence together with the FISH signals (9q12) or before the DNA FISH procedure (Yq12). In that case, the alignment of immunofluorescence and FISH signals was performed with the help of a mark and find software (bar : 5  $\mu\text{m}$ ) (B), and the relative positioning of the signals in both images compared.

## Supplementary data

**Figure S1 :** HSF2 (and HSF1) foci do not form at  $\gamma$ -H2AX foci. Immunofluorescence image showing no colocalization between HSF2 foci (green signals) and H2AX foci (red signals). Bar : 5 $\mu\text{m}$ .

## Material and methods

### Cell culture and heat shock treatment

HeLa and HT1080 cells were grown in DMEM 10% SVF, and McCoy's 5A 10% SVF respectively. Normal skin fibroblasts (Coriell Institute, USA) were grown in EMEM 15% SVF. Rodent-human somatic cell hybrids [19] were grown in RPMI 10% fetal bovine serum, 50 µg/ml gentamicin, and 2 mM L-glutamine.

For FISH and immunofluorescence experiments, cells grown on glass slides. Metaphase spreads were also prepared from HT1080 cells according to standard cytogenetic techniques. Heat shock was performed by immersing the slides for the indicated times in a waterbath set at the desired temperature (43 °C for tumor cell lines, 45 °C for primary cells).

#### Immunofluorescence, DNA FISH AND RNA FISH

Detection of HSF1, HSF2 and  $\gamma$ -H2AX by immunofluorescence was performed on 4% formaldehyde-fixed cells as previously described (Jolly et al; 2004). Rabbit anti-HSF1 antibodies (1:250° Cell signaling), Rat anti-HSF2 (Abcam 69621 1/100°) and Rabbit anti- $\gamma$ -H2AX (ab 11174 1/500°) were detected with Goat Anti-Rabbit Dylight 549nm 1:500 (Vector Laboratories, Inc.) or Goat Anti-Mouse Alexa 488nm 1:500 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Probes specific for the sat III sequences of chromosome 9 (pHuR98) (Grady et al. 1992) or chromosome Y (DYZ1) (Nakahori et al. 1986) or for alphoid sequences of chromosome 9 (pMR9A) (Rocchi et al. 1991) were used. Samples were mounted with the VECTASHIELD Antifade Mounting Medium containing 250 ng/µL DAPI.

Combined DNA FISH and immunofluorescence was performed as follows: immunofluorescence was first performed on formaldehyde-fixed cells. After detection with the secondary antibody cells were fixed again in 4% formaldehyde for 10 min, and processed for DNA FISH on ethanol dehydrated cells. Briefly, 200 ng of biotin-labeled probe was precipitated together with 10 µg salmon sperm DNA, and resuspended in 50% formamide/2x SSC/20% dextran sulfate, and added on the slide. Samples were denatured 5 min on a heating plate at 86 °C, and hybridized overnight at 37 °C. Probes were detected with streptavidin-alexa 488 or anti-dig alexa 486 (Molecular probes).

RNA was performed as follows. Cells were fixed in 4% formaldehyde for 10 min, incubated for 20 min in 20% glycerol/PBS, permeabilized by four successive freezing–thawing cycles in liquid nitrogen, and subsequently dehydrated and hybridized.

For immunofluorescence and hybridization on tissue sections, Immunofluorescence was performed before DNA FISH. Tissues were fixed in 4% PFA. A post fixation with 4% PFA was also performed after immunofluorescence. Images were acquired with a Zeiss apotome microscope using the 63x, 1.25 NA oil immersion objective and an intermediate magnification of 1.25x. or with a Zeiss M2 axioimager microscope using the 63x, 1.25 NA oil immersion objective. The Mark and axiovision module was used. Alternatively, when immunofluorescence signals were not altered by the DNA FISH procedure, DNA FISH and immunofluorescence signals were imaged at the same time.

#### Immunofluorescence and immunoperoxidase detection on testis

5µm paraffin sections were successively incubated at room temperature in xylene 3x5 min, in 95% ethanol 3x5min and 70° iodide alcohol 1x5min. Specimens were then washed under running water and successively incubated in PBS and in citrate buffer (pH6) where they were successively heated in a microwave at 800W (4 min) and 400 W (2x5 min). Sections were then cooled down and stored in PBS. Immunofluorescence and FISH were performed as described in the above section. Immunoperoxidase detection was performed as described

(Mitchell et al. 1997).

#### Chromatin Immunoprecipitation

ChIP were performed with a rabbit anti-HSF1 antibody at a concentration of 300 ng/ $\mu$ M. A rabbit antibody against IgG was used as a control. Chromatin fractions were then incubated for 4h at 4°C with magnetic beads coupled to protein G (stressgen). Beads were pelleted and then successively washed for 5 min at 4°C on a wheel with a nuclear lysis buffer (50mM Hepes pH 7,9/140mM NaCl/1mM EDTA/1%Triton X-100/0.1% Na deoxycholate/0.1% SDS (2x), with a nuclear lysis buffer containing 0,5M NaCl (2x), with a washing buffer (20mM Tris-HCl pH(8)/250nM LiCl/1mM EDTA/0.5% NP-40) (2x), and finally with an elution buffer Tris-HCl pH(8)/1mM EDTA (1x). Quantitative PCR were then performed on the precipitated DNA fractions with the Sybergreen kit (roche). Three regions were analyzed : the hsp70 promoter gene (Rev : 5'-CCCTGGGCTTTTATAAGTCG-3' ; For : 5'-GAAGACTCTGGAGAGTTCTG-3'), the GAPDH promoter gene (Rev : 5'-ATGGTTGCCACTGGGGATCT-3' ; For : 5'-TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA-3') and the Yq12 region: (Rev : 5'-GAGTCAATTCCTTTTCGACACCC-3' ; For : 5'-TGGACAGGCCTGGAATAAAGTGAA-3').

Acknowledgement : this work was funded by Université Grenoble Alpes, by Inserm and by the Association de la Recherche sur le cancer (French cancer research association (ARC) (contract # 3686).

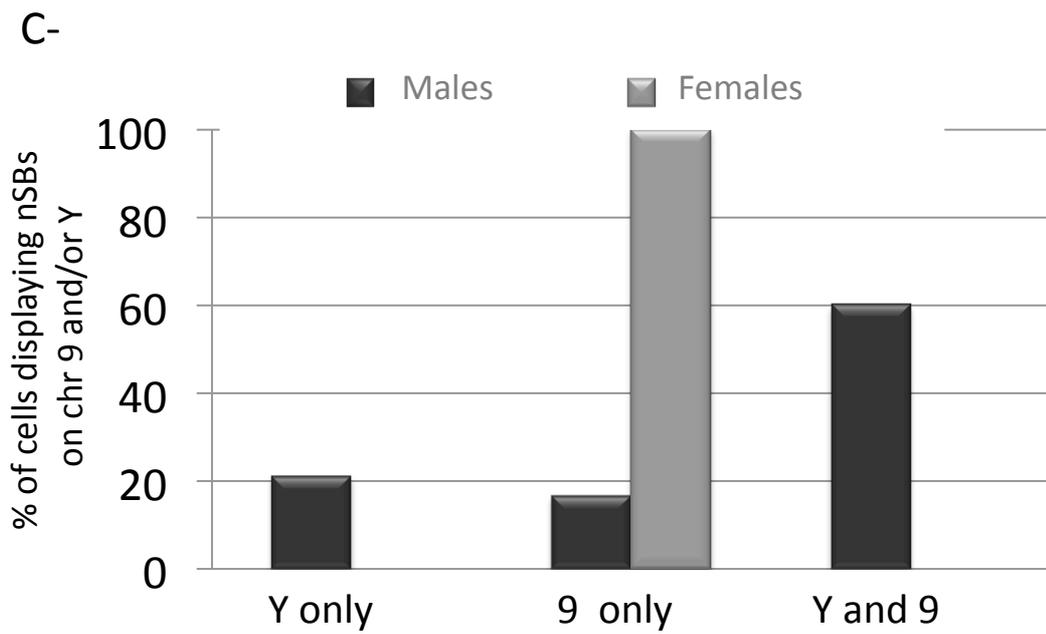
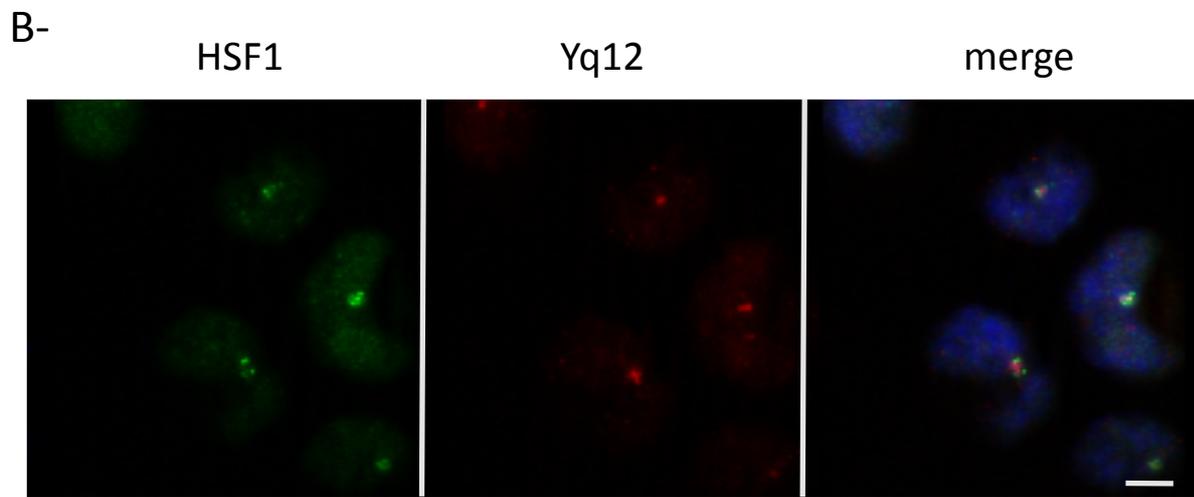
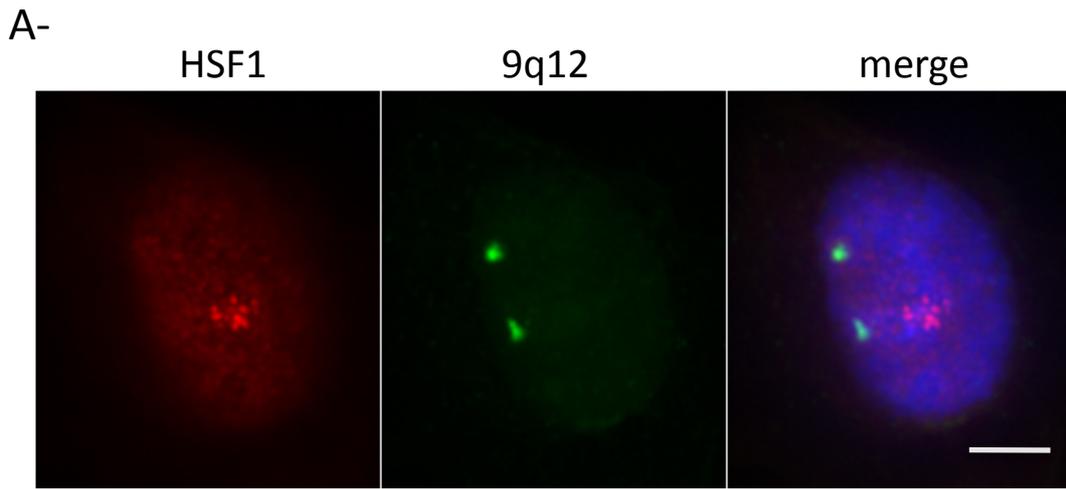


Fig. 1

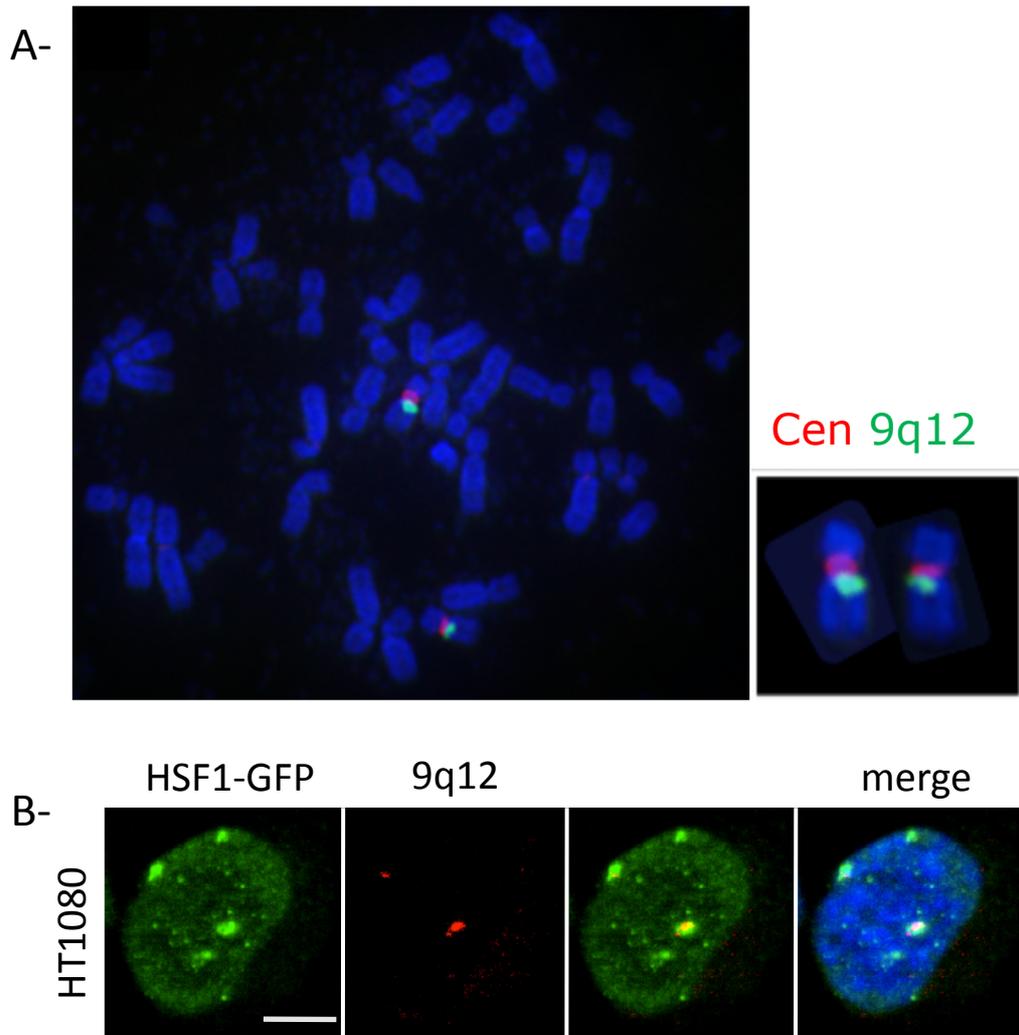
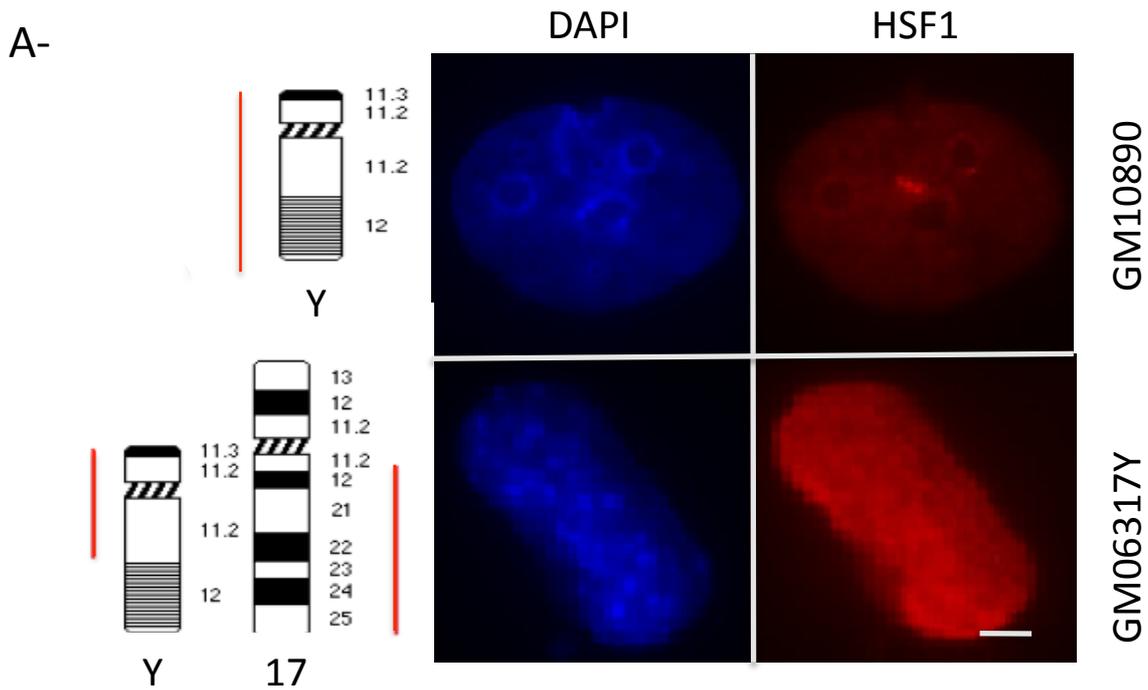
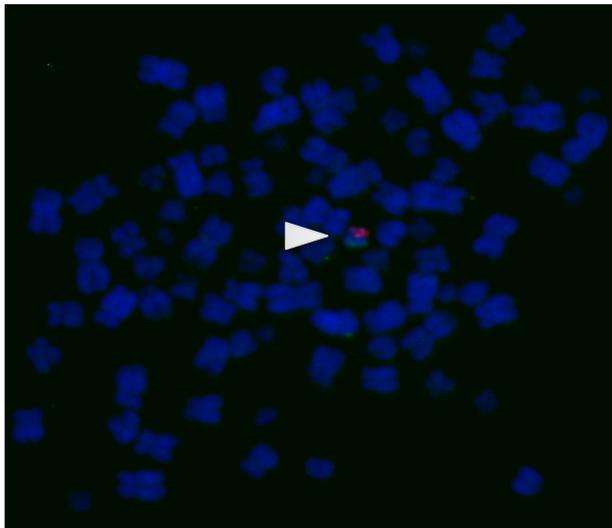


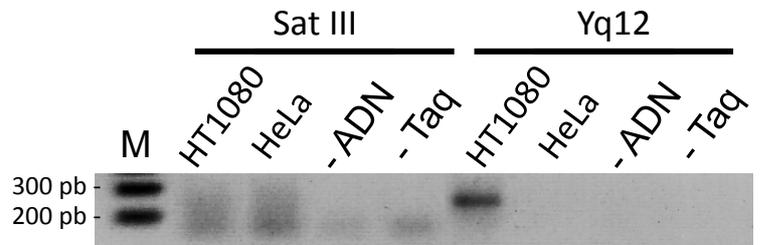
Fig. 2



B-



**TTGGACAGGCC**TTGGAATAAAGTGGAA TGCTACGGTCTCGAATGGAATAAAAA  
 TGTATGGAATGGAATGCAATGAAACGGAATCGAATGTCATAGAATGTAATGGA  
 ATGCAAAAAAATGGAATCCAAAATCATTGACTGGAAAAGGC**GGGTGTCGAAA**  
**GGAATTGACTG**CAATGGAATGGAATCGAATGGAATGGAAGTGAATAGAATCG  
 AACTAAATCGAATGGAATGGAATTGATAGGAACGGAATGGAAGGAATGCAAT  
 GATTTGGCATGGAATGGAATCGAATGGCATCGAATGGAATGGAATGGAATGCAT  
 GGAATGGAATGTATTAGAATGTAATGAACTTAATGGAATGTACTCGAATGGAT  
 TCGACTGGAATG**GAATGTCTGGAA**GTGAATGGACTCCAAT



C-

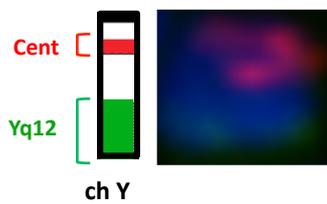


Fig.3

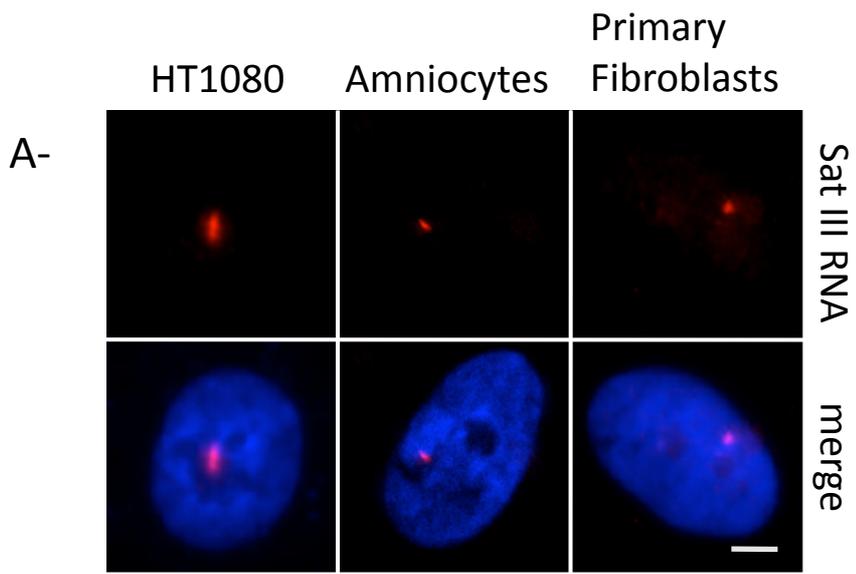
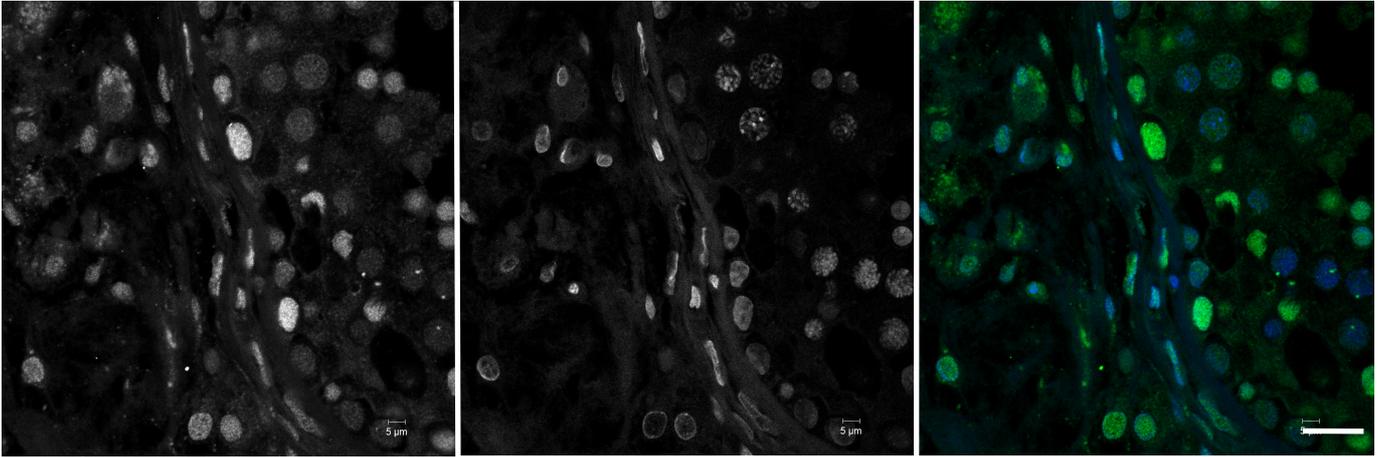


Fig. 4

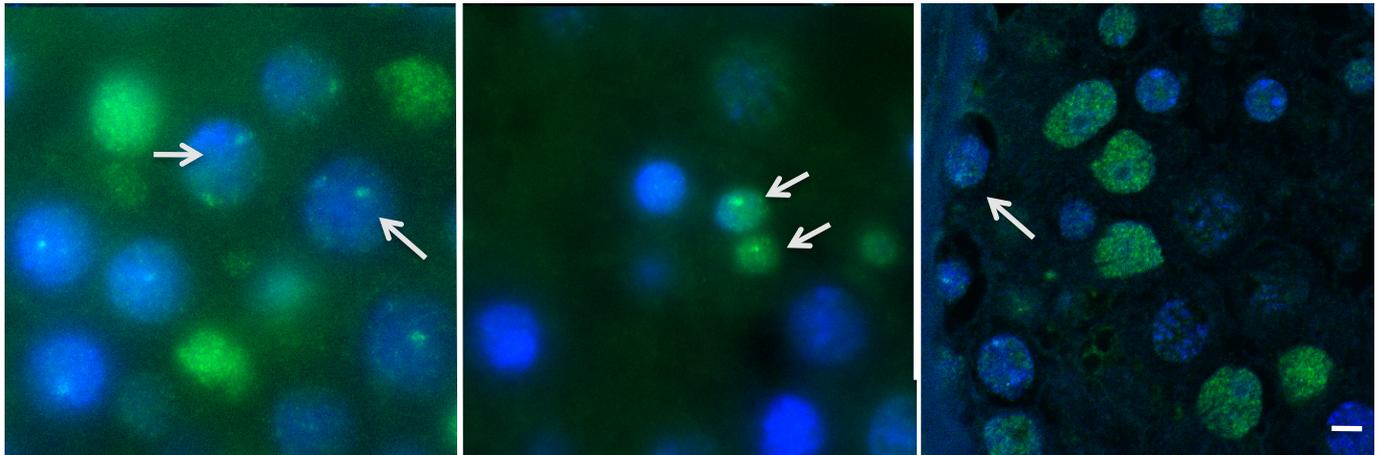
A- HSF1

DAPI

Merge



B-



spermatocyte

round spermatids

sertoli cells

Fig 5

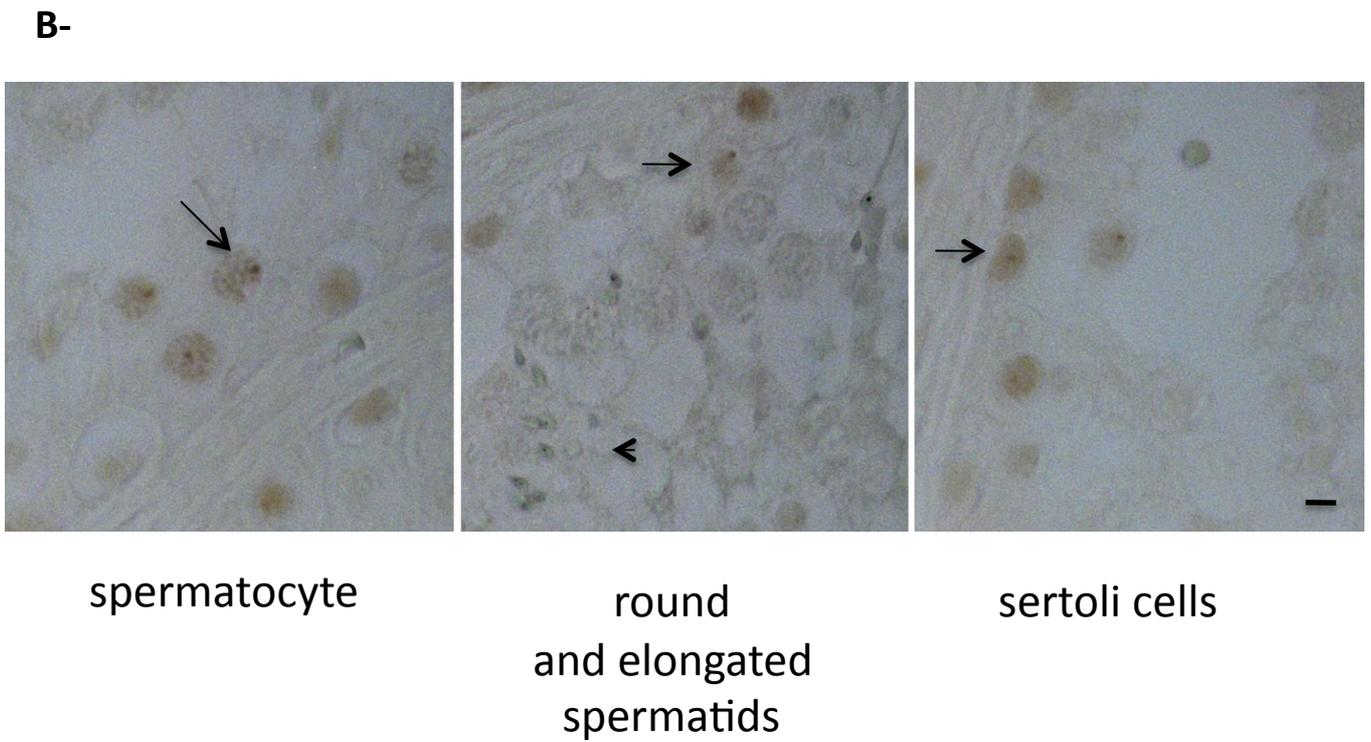
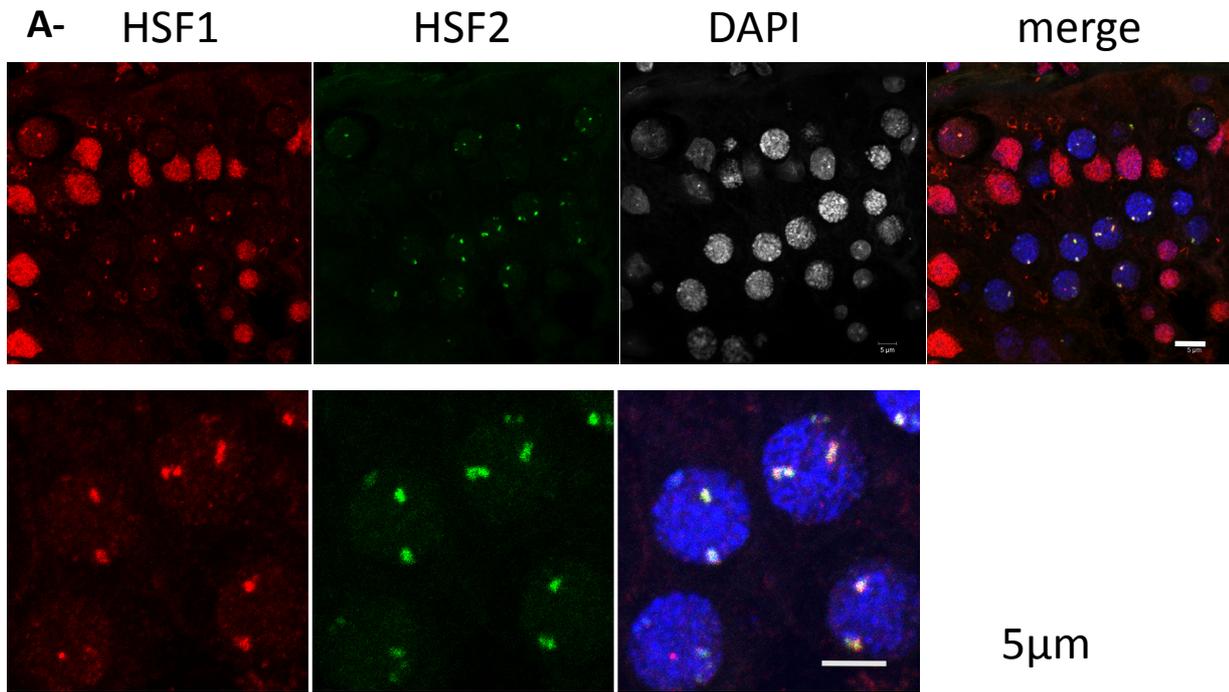
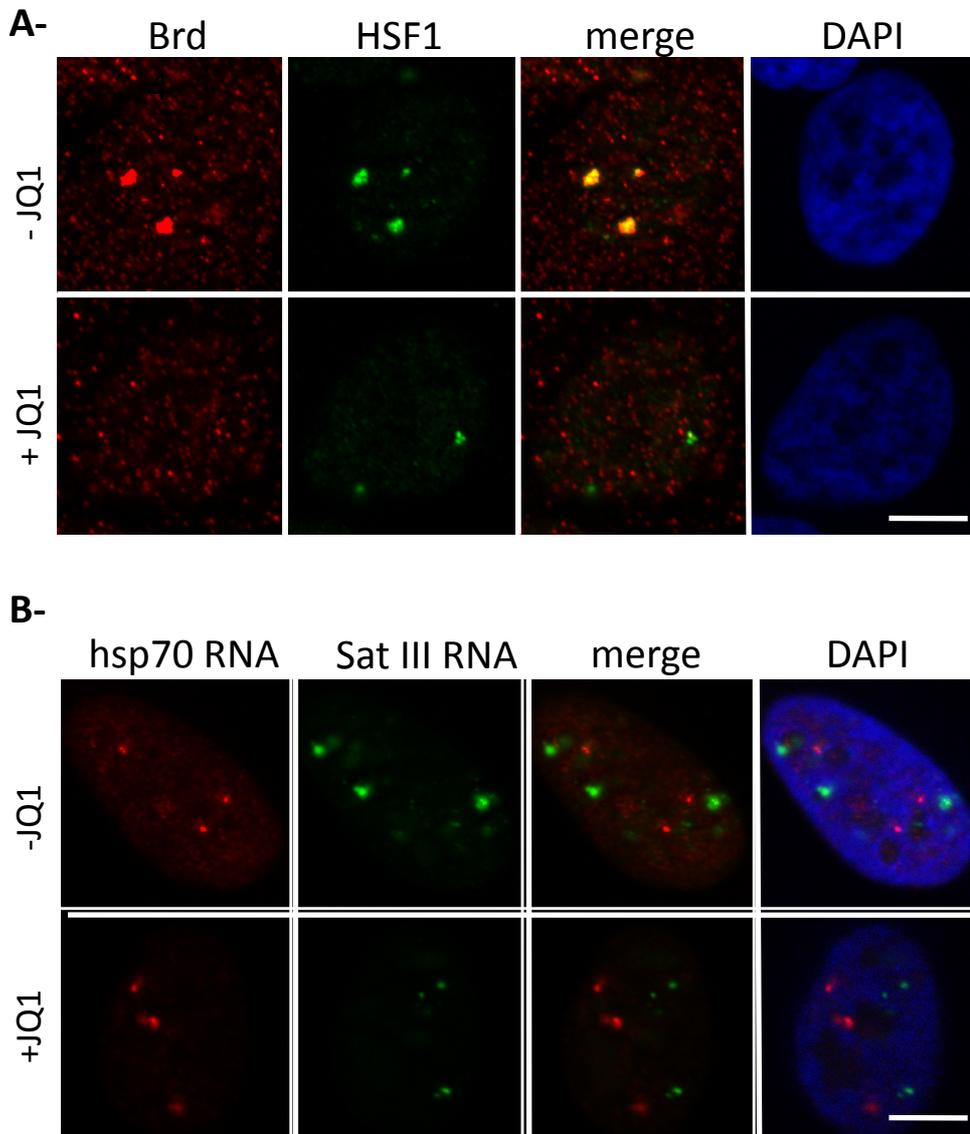
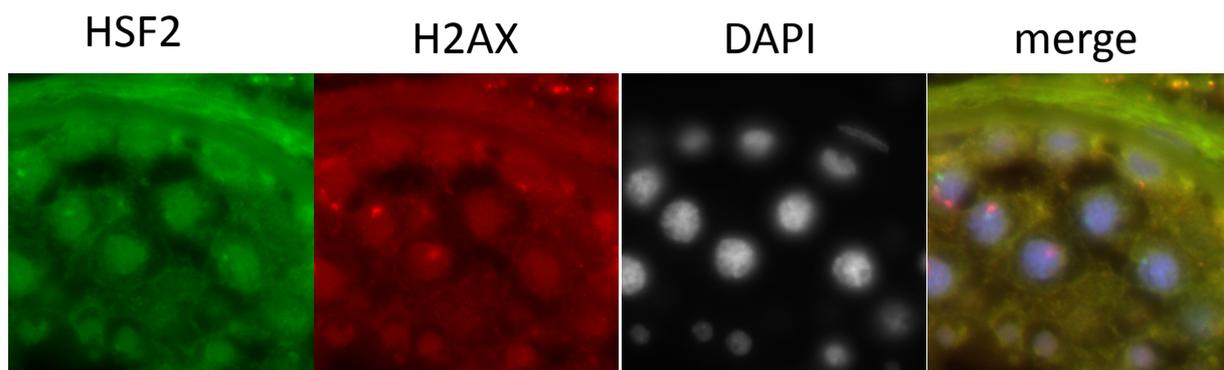


Fig 6

**Fig. 7**



Sup Fig.1



## **Annexe 2**

Au cours de ma thèse, un des projets de l'équipe a été d'étudier de façon globale les modifications épigénétiques associées à la région 9q12, en comparaison à la région 1q12 qui n'est pas ciblée par HSF1 lors de la réponse au stress. Dans un deuxième temps, les mécanismes à la base de l'activation transcriptionnelle de ces régions particulières, en comparaison aux gènes cibles d'HSF1, *hsp70*, ont été identifiés. Les résultats sont présentés ci-après sous forme d'un manuscrit.

Parmi ceux-ci j'ai participé à l'étude montrant l'importance des BET dans l'activation transcriptionnelle des régions péri-centriques en réponse au stress, notamment en inhibant leur activité via une drogue spécifique : JQ1. [Fig 7]

Characterization of BET family members as new essential actors of pericentric heterochromatin transcriptional activation

Authors : Cécile Caron\*, Neda Hoghoughi<sup>+</sup>, Solenne Guerin<sup>+</sup>, Edwige Col<sup>+</sup>, Hector Hernandez-Vargash<sup>¶</sup>, Jessica Penin, Sivan Koskas, Virginie Faure, Nicolas Reynoird, Saadi Khochbin, Zdenko Herceg<sup>¶</sup>, Claire Vourc'h\*

University Grenoble-Alpes, CRI INSERM, U823, Institut Albert Bonniot, La Tronche 38042, Grenoble Cedex 9, France

(<sup>¶</sup>) International Agency for Research on Cancer (IARC), 69008 Lyon, France

(\*) Corresponding authors

(+) These authors contributed equally to this work.

## Abstract

The heat shock response is characterized by the transcriptional activation of both hsp genes and satellite III sequences located at pericentric heterochromatin. Both events are under the control of a Heat Shock Factor I.

Here show that pericentric heterochromatin displays a specific epigenetic signature both in unstressed and stressed cells, different from that of other euchromatic and heterochromatic regions identified so far. Interestingly we find that, Bromodomain and Extra-Terminal motif (BET) proteins BRD2, BRD3, BRD4 are selectively recruited to active pericentric heterochromatin in heat-shocked cells. Using JQ1, a potent inhibitor of Bromodomain proteins, we show that inhibition of BRD proteins specifically impairs satellite III RNA accumulation, thus revealing for the first time, the existence of distinct mechanisms in the transcriptional activation of hsp70 gene and satellite III sequences.

## Introduction

In human cells, the heat shock response (HSR) is characterized by the transcriptional activation of both heat shock (hsp) genes (Lindquist and Craig 1988) and pericentric heterochromatin (HC) (Jolly et al., 2004, Rizzi et al., 2004). Both events are under the control of Heat Shock Factor 1 (HSF1) (Akerfelt et al., 2010). Activation of pericentric HC leads to the accumulation of long noncoding (lnc) satellite III (sat III) RNA. Activation of pericentric HC is mainly observed at the 9q12 locus. The presence of a large quantity of transcribed units at this locus, results in the formation of nuclear Stress Bodies (nSBs) about 1 $\mu$ m large, enriched in HSF1 and sat III RNA. These structures can be easily detected by in situ approaches (For review see Biamonti and Vourc'h 2010).

Transcriptional regulation of the heat shock response at hsp gene promoters, has been extensively studied as a model system of gene expression. Unlike hsp genes, sat III transcripts are transcribed from heterochromatic regions suggesting that different mechanisms may be involved in their transcriptional activation. In higher eukaryotes, RNA pol II (RNAPII) at hsp genes is transcriptionally engaged (de Nadal et al., 2011) before heat shock while no evidence exist that it is similarly engaged at sat III sequences.

Several actors have been identified for their role in HSF1-mediated hsp genes activation in higher eukaryotes. In *Drosophila*, proteins have been identified for their essential role in the initial, HSF1-mediated, transcription independent nucleosome disruption. They include GAGA factor (GAF; Trithorax-like), and poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) (Petesch and Lis. 2008, Zobeck et al., 2010). Tip60 has also been identified for its role in the spreading of poly(ADP-ribose) polymerase and subsequent recruitment of elongation factors such as P-TEFb and Spt6 and for its role in the recruitment of histone-modifying enzymes such as Trithorax and CREB-binding protein (CBP) (Smith et al., 2004; Zobeck et al., 2010; Petesch and Lis, 2012). Based on in vitro interaction assays, a binding between HSF1, the general transcription factors TATA-Binding Protein (TBP) and Transcription Factor IIB (TFIIB) has been reported in human cell extracts (Yuan and Gurley 2000). More recently a direct interaction between HSF1 and replication protein A (RPA), which is known to bind and stabilize single-strand DNA (ssDNA) has also been characterized (Fujimoto et al., 2012). The HSF1-RPA complex leads to preloading of RNA polymerase II and opens the chromatin structure by recruiting a histone chaperone, FACT (Fujimoto et al., 2012).

Histone modifications, and especially acetylation, are known to play an essential role in the control of gene regulation (Lee, et al., 2010). The role of Histone Acetyl Transferases (HATs) is to remove positive charges to histones as a way to loosen histone/DNA interactions. Acetylated residues also represent docking sites for bromodomain (Brd), the only protein domain known to act as an acetyl-lysine binding domain. Brd-containing proteins include proteins with multiple roles in transcriptional activation, like the HATs GCN5, PCAF (p300/CREB-binding protein-Associated Factor), p300 and like CBP (CREB Binding Protein), the BRG1 ATPase subunit of SWI/SNF nucleosome remodeling complex, or the TAF1 subunit of the general transcription factor TFIID (Transcription initiation factor TFIID subunit 1). They also include the "bromo- and extra terminal domains" (BET) family members, among which Brd2, Brd3, and Brd4 in human (for review see Sanchez and Zhou 2009). BET proteins are key mediators for the assembly of the Positive Transcription Elongation Factor b complex (P-TEFb), an event required for the initiation of transcription elongation (Brès et al., 2008). Recently, an intrinsic histone chaperone activity has also been characterized for Brd2 (Leroy et al., 2008). BET/histone interactions, with important roles in cancer, can be inhibited by the acetyl-lysine

competitive inhibitor JQ1 (Filippakopoulos et al., 2010, for review see Wang et Filippakopoulos 2015).

As expected, histone acetylation plays an important role in the activation of hsp genes. Likewise, increased acetylation at histone H3 in the presence of HSF1 at the hsp70 gene is associated with increased recruitment of CBP and BRG1 (Sullivan et al., 2001), while an interaction between HSF1, p300/CBP and Strap (Stress-responsive activator of p300) promotes HSF1 binding and augments histone acetylation within hsp genes (Xu et al., 2008). Important changes in chromatin acetylation have also been shown within nSBs, revealed by the appearance of HSF1-dependent acetylated foci at nSBs, colocalizing with foci enriched in the HATs p300/CBP (Jolly et al., 2004, Zhang et al., 2011). However the role of the different actors described above, that set up and read acetylation marks on genes, is currently unknown in the transcriptional activation of sat III sequences. The contrasting role of Trichostatin A (TSA), a potent inhibitor of Histone Deacetylases of Class I and II mammalian Histone Deacetylases (HDACs), on sat III and hsp70 transcriptional activation supports the existence of specificities between sat III and hsp gene transcription. Indeed, while TSA promotes hsp 70 gene transcription even in the absence of stress, TSA inhibits sat III transcriptional up-regulation (Rizzi et al., 2004).

In this context, understanding the mechanisms associated with HSF1-induced heterochromatin acetylation and sat III transcription represents an important and exciting goal. To this end, the epigenetic status of the 9q12 regions was further characterized in both heat-shocked and unstressed cells. Here, we report the existence of a specific histone code at the 9q12 locus in both unstressed and stressed cells. We also bring evidence that Bromodomain-containing proteins 2, 3 and 4 are specifically and massively recruited to pericentric HC in heat-shocked cells. Accordingly, we bring new evidence that unlike hsp70 gene, JQ1, specifically inhibits sat III transcription, pointing to the existence of important differences in the mechanisms of activation of two major targets of the heat shock response.

## **Material and Methods**

### Cell culture and drug treatments

Cell lines: HeLa cells, from cervix adenocarcinoma were purchased from ATCC (American Type Culture Collection, VA, USA). Normal fibroblasts immortalized with TERT were a obtained from Annabelle Decottignies (Catholic University of Louvain, Belgium). Heat-shock experiments were performed by immersion of the culture flasks in a warm water bath. Unless otherwise mentioned, heat-shock was performed for 1 h at 43°C or 45°C (normal cells).

JQ1 treatment (Filippakopoulos et al., 2010) was achieved by treating the cells at a concentration of xxx for 5 min before heat shock.

Transient transfections were performed using xxx solution (XXX).

### Plasmids and oligonucleotides

Expression plasmids for human CBP-Ha, Ha-GCN5 and p300 were provided by A. Harel-Bellan (Institut A. Lwoff, Villejuif, France), and Stunnenberg (Radboud University Nijmegen, The Netherlands), respectively. Human pcDNA Ha-tagged Tip60 expression plasmids are described in (Legube et al., 2002, Lemercier et al., 2003). pH2.3 clone corresponding to human hsp70 sequence (Wu et al., 1985) was provided by R.I. Morimoto (Northwestern University, Evanston, IL, USA). The plasmids expressing the mouse HSF1-GFP and DBD-TRIM-GFP and FLAG-HSF1 were developed in our laboratory (Jolly et al., 2002). Detection of hsp70 and sat III RNA was performed with plasmid pH2.3 (Wu et al., 1985).

Fluorescent oligonucleotides labeled with Alexa 488 or cy3 against chromosome 1q12 (oligo 23as) and chromosome 9q12 (oligo 14 as) or against sat III sequences (21as), (Eymery et al., 2009). These oligos were synthesized by J-M. Escudier (Plateforme de synthèse d'oligonucléotides modifiés de l'Interface Chimie Biologie de l'ITAV-Toulouse-France). These probes were used for RNA and DNA FISH.

### Immunofluorescence, RNA FISH, DNA FISH, and microscopy

Immunofluorescence was performed on formaldehyde-fixed cells as described previously (Jolly et al., 2002). Immunofluorescence was performed on formaldehyde-fixed cells as previously described (Jolly et al 2002), with the following antibodies: rabbit anti-HSF1 (Enzo, SPA-950) (1:100), mouse anti-HSF1 (Santa Cruz sc 11757, 1:200) rabbit anti-H3K4me3 (Abcam, ab8580, 1:1200), rabbit anti-H3K4ac (Millipore, 07-539, 1:100), rabbit anti-H3K9me3 Upstate 07-523 (1:250), rabbit anti-H3K9ac Abcam ab39917 (1:200), rabbit anti-H3K14ac Millipore 07-353 (1:100), rabbit anti-H3K18ac Abcam ab1191(1:50), anti-H4K20me3 Upstate 07463 (1:600), rabbit anti-H3K27ac active motif 39133 (1:800), H3K27me3 Abcam ab62002 (1:200), rabbit anti-H3K36me3 Abcam ab9050 (1:500), rabbit anti-H3K56ac Epitomics 2134-1 (1:250), rabbit anti-H3K64ac Active Motif 39546 (1:1000), rabbit anti-H3K122ac Abcam 33309 (1:100), rabbit anti-H4 K5ac Epitomics 1808-1 (1:500), rabbit anti-H4K8ac Epitomics 1796-1 (1:800), rabbit anti-H4K12ac (Millipore, 07-595, 1 :500), rabbit anti-H4K16ac (Millipore 07-329) (1:200), rabbit anti-H4K20ac Abcam ab19855 (1:200), anti-Gcn5 (1:200), anti-Tip60 (1:), anti-Brd2 (1:), anti-Brd3 (Saadi) (1:), anti-Brd4 (Abcam, Ab75898) (1:), anti-TAF1 (L.Tora, IGBMC, Strasbourg, France) (1:xx), mouse anti-ATAD2 (Sigma, SAB1400512) (1:200), anti-RNA pol II Ser 2 was obtained, from Marc Vigneron (IGBMC, Strasbourg, France) (1:400).

Secondary anti-rat or -rabbit antibodies conjugated to either Dylight 549 (KPL) or Alexa 488 (Molecular Probes) were used. DNA was counterstained with 250 ng/ml DAPI. RNA FISH alone and in combination with immunofluorescence or DNA FISH was performed as described previously (Jolly et al., 1997). Optical sections were obtain with an apotome microscopy

system (Zeiss, Jena, Germany) or with a confocal laser scanning microscope (CLSM) (LSM 510 META NLO, Zeiss) using a Plan-Apochromat 63x Oil objective (NA= 1.4). Confocal excitation wavelengths were 488nm (FITC), 543nm (Cy3), and 730nm (DAPI- biphotonic excitation). The pinhole diameter was set to 1 Airy Unit for the confocal channels and fully opened for 2P excitation.

#### RNA extraction and Northern blot

Total RNAs were extracted with Tri-reagent® (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. For Northern blot analysis, 10 µg of RNA was loaded on a 1% agarose denaturing gel. Before transfer, the gel was treated or not with 75mM NaOH for 10 min, and washed in 0.5 M Tris/1.5 M NaCl, pH 7.0. The RNAs were then transferred onto Hybond N membrane (Amersham Biosciences) and hybridized with pH2.3 (Wu et al., 1985) or pHuR98 (Grady et al., 1992) probe labeled with-  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP.

#### Immunoprecipitation

Cos cells were plated in 10 cm dishes and transfected with 3 µg of a pcDNA-FLAG plasmid expressing a Human HSF1 (FLAG in Cter) or an empty vector as negative control, and a plasmid expressing either HA-p300 (5 µg), HA-Gcn5 (4 µg) or HA-Tip60 (4 µg). Cells were lysed 24h after transfection by incubation for 1h on ice in LSDB500 (500 mM KCl, 20% glycerol, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 50 mM Hepes pH 7.9) containing 0.2% NP-40, 1 mM DTT, 200 µg/ml DNaseI, 100 µg/ml RNaseA, 50 ng/ml TSA and protease inhibitors cocktail (complete mini EDTA-free; Roche). After centrifugation, the lysate was incubated with 1µg of anti-FLAG antibody (Sigma) for 1 h on ice. Protein G-Sepharose beads (Amersham) were then added and incubated at 4°C on a rotoshake for 1 h. After three washes with LSDB250 (same as the lysis buffer with 250 mM KCl), complexes were recovered by adding Laemmli sample buffer and analysed by Western blots. Western blot was performed with an anti-HA antibody (Roche ? ou Covance ?).

#### Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Cells were cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min before the addition of 125 mM glycine (Sigma) at room temperature (37°C) for 5 min. After washing, cell were resuspended into cytosol lysis buffer (10mM Hepes (pH=6.5), 0.25% Triton-X100, 0.5mM EGTA, 10mM EDTA) at 4°C for 5min. Nuclei were resuspended in nuclei lysis buffer (xx) and then sonicated at 4°C for 19 min with a BioRuptor sonicator (Diagenode) to obtain fragments between 200 and 800 base pairs. Samples were incubated overnight with the anti-H3 (Abcam), anti-H3K9Me3 (Abcam), anti-IgG (Diagenode) antibodies and immunoprecipitated using the OneDay ChIP kit (Diagenode), following the manufacturer instructions. Immunoprecipitated DNA was analyzed by qPCR, using primers. IP-PHUR1 (Fwd) : AATCAACCCGAGTGCAATCGAATGGAATCG and IP-PHUR2 (Rev) TCCATTCCATTCTGTACTCGG (Grady et al., 1992). Standard deviations were calculated from 3 independent experiments.

## Results

### Epigenetic characterization of pericentric heterochromatin in unstressed cells

Chromosome 9 has been characterized as a primary target for HSF1 at pericentric HC. While secondary nSBs have also been identified at pericentric regions of acrocentric chromosomes they do not form on all chromosomes. In particular, the 1q12 locus, formed of long tandem repeats of sat II sequences, is not transcribed upon stress (Supp data S1). HSF1 foci have been identified within chromatin regions enriched in acetylated histones and devoid of H3K9me3 repressive marks (Jolly et al., 2004; Rizzi et al., 2004). The possibility that the capacity of the 9q12 to be transcriptionally activated would result from the existence of a specific combination of histone marks was thus further explored. In stressed cells, the 9q12 locus can be easily detected by immunofluorescence with an antibody against HSF1. In unstressed cells, the 9q12 locus can be detected with a plasmid expressing a HSF1 mutant containing the trimerization (TRIM) and DNA binding (DBD) domains but devoid of the transactivating domain. This DBD-TRIM HSF1 mutant displays a constitutive binding capacity and behaves as a dominant negative factor, preventing endogenous HSF1 binding to its targets (Jolly et al., 2002). Using this plasmid, the status of the repressive H3K9me3, H4K20me3 and H3K27me3 histone marks at the 9q12 locus was analyzed by immunofluorescence, allowing a cell to cell analysis. As shown in Figure 1A, a specific enrichment of H3K9me3 but not of H4K20me3 and H3K27me3 was detected at the 9q12 locus. Lack of H4K20me3 enrichment at this locus, despite the presence of a specific nuclear labeling, was also confirmed in normal unstressed fibroblasts. In these cells, the 9q12 locus was detected by DNA FISH (Fig 1B). While the absence of H3K27me3, a characteristic mark of facultative HC, was not surprising, H4K20me3 enrichment has been well documented at constitutive pericentric HC in mouse (Kourmouli et al., 2004, Schotta et al., 2004, Gonzalo et al., 2005, Terranova et al., 2005) and human lymphocytes (Barski et al, Cell 2007, Capurso et al, 2012). We thus hypothesized that the absence of H4K20me3 enrichment at the 9q12 locus may contribute to the specific behavior of this locus in stressed cells. However, no enrichment of H4K20me3 was observed at the 1q12 locus detected by DNA FISH, in both HeLa and normal fibroblasts, thus ruling out absence of H4K20me3 enrichment as a key determinant of the 9q12 transcriptional activation upon heat shock.

As a step toward a better characterization of chromatin structure at the 9q12 locus, identification of active epigenetic marks was also performed in heat-shocked cells. As shown in Figures 2A, 2B, and 2C, almost all acetylated lysine residues of histone H3 (K4, K9, K18, K23, K27, K36, K56, K64, K122) and H4 (K5, K8, K12, K16, K20) were enriched at nSBs in stressed cells (observed in >90% of the nSBs). Interestingly, no enrichment of H3K4me3, H3K14ac (Fig 2A) and of H3K36me3 (Fig 2B) active marks was observed revealing the existence of a specific epigenetic signature at the transcriptionally active 9q12 locus, different from that of other active euchromatic regions (Filion et al., 2012).

Stress-induced acetylation of histone residues at histone H3 and H4 at nSBs appears as a broad phenomenon since all, but one, of the residues we have tested, undergo acetylation.

Interestingly, H3K9 acetylation correlates with a demethylation of H3K9me3. Indeed, in heat-shocked cells, demethylation of H3K9me3 correlates with an absence of H3K9me3 or an increased percentage of partial colocalisation between HSF1 foci and H3K9me3 (Fig 3A). H3K9me3 demethylation in heat-shocked cells was confirmed by Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) (Fig 3B). While a codetection of H3K9ac and H3K9me3 could not be performed due to the nature of the antibodies available, these data however suggest that

HSF1 binds to pericentric HC despite its enrichment in H3K9me3 and that HSF1 binding triggers the replacement of methylated H3K9 residues by acetylated H3K9 residues.

#### HSF1 triggers global chromatin acetylation through a direct interaction with Histone Acetyltransferases

To better characterize the kinetics of histone acetylation with regard to the kinetics of HSF1 binding and sat III transcription by RNAP II, cells were submitted to a continuous heat shock exposure of 10 to 60 min. The evolution of HSF1 accumulation, of histone acetylation and of elongating RNAPII was analyzed by immunofluorescence. SFRS1, a splicing factor displaying a binding capacity to sat III RNA, was used as a marker of sat III RNA accumulation (Metz et al., 2004). As shown in Figure 4A, the presence of HSF1 and of acetylated foci was observed earlier in time (10 and 20 min HS) at nSBs than the detection of elongating RNAP II and SFRS1 (30 min). Moreover, the evolution of the percentage of nuclei displaying HSF1 and acetylated foci in response to a continuous heat exposure (80% of nuclei displaying both HSF1 and acetylated foci after 30 min of heat shock), suggests that both events are tightly correlated in time.

In stressed cells, three major HATs were tested for their presence at nSBs. Besides p300/CBP, a HAT already identified at nSBs (Jolly et al., 2004), two other HATs, GCN5 and Tip60, were also identified at these bodies by immunofluorescence (Fig 4B). To further unravel the role played by active HSF1 in the recruitment of these three HATs to nSBs, cells were further transfected with Flag-HSF1 and with either Myc-GCN5, Myc-p300 or HA-Tip60. Immunoprecipitations against Flag-HSF1 were further performed with extracts from cells submitted or not to a 20 or 60 min heat shock.

As shown in Figure 4C, specific HSF1 /p300, /Gcn5 or /Tip60 complexes were detected only in extracts from cells submitted to a 20 or 60 min heat shock while not detected in control cells. HSF1 is negatively regulated by HSP70 and, consequently, modification of the HSP70/HSF1 ratio in cells overexpressing HSF1, triggers HSF1 binding to its genomic targets. To test whether HSF1 binding at the 9q12 locus was sufficient to promote an acetylation and transcription of the 9q12 locus in a heat shock independent manner, the transcriptional activation of the 9q12 locus, was tested in cells transfected with HSF1. As shown in Figure 5A, HSF1 foci were present in a fraction of these cells. These foci were enriched in acetylated histones and in sat III transcripts, indicating that HSF1 is able to recruit HATs and to drive acetylation and transcription, when overexpressed, in a heat independent manner. As in heat-shocked cells, no enrichment of H3K4me3 was observed at nSBs in cells overexpressing HSF1 (Fig 5A)

#### BET family members play an essential role in pericentric HC activation upon stress.

BRD proteins represent important actors in transcription initiation. Moreover, the recruitment of at least Brd2 and 3 have been found to bind to specific acetylated histone residues (H4K5, H3K12, H3K14ac) and not on H4K16ac and H3K9ac, suggesting a selectivity of recruitment (Leroy et al. 2008). The distribution of BRD proteins (the BET family members Brd2, 3, 4, and ATAD2 and TAF1/ TAF250) was thus analyzed in stressed cells and their recruitment to nSBs examined. Endogenous Brd2, Brd3, Brd4 were clearly enriched at nSBs in stressed cells (colocalisation with HSF1 foci > 90%) while no recruitment of the TFIID subunit TAF250, and of the co-transcriptional activator ATAD2, was observed, revealing the existence of a selective recruitment of BET proteins to nSBs (Fig 6A and 6B).

To determine the functional implication of BET proteins in HSF1-mediated sat III transcription, the impact of JQ1, a specific inhibitor of BET binding on acetylated histones, was further tested

on HSF1 foci formation, on chromatin acetylation at the 9q12 locus, and on hsp70 and sat III transcription. As expected, no recruitment of Brd4 (Fig 7A) nor of Brd2 and Brd3 proteins (sup 2 figure à faire : images CC IF8) was observed at nSBs, thus validating the efficacy of the JQ1 treatment. In stressed cells, HSF1 targeting to nSBs as well as the formation of acetylated foci was not affected by JQ1 (data not shown). This clearly demonstrated that BET proteins do not play a major role, if any, neither in HSF1 recruitment to- and stabilization at- the 9q12 locus in stressed cells, nor in HSF1-mediated heterochromatin acetylation. In contrast, a significant decrease in the amount of sat III RNA accumulation was also observed in JQ1 treated cells, both by RNA FISH and Northern blot experiments (Fig 7B). This shows that, as expected, BET proteins act on heterochromatin after HSF1 binding and on subsequent chromatin acetylation. This also shows that impairing the recruitment of BET proteins to acetylated chromatin by JQ1 dramatically affects sat III transcription. Surprisingly, in contrast to sat III accumulation, no impact of JQ1 on the stress-induced accumulation of HSP70 transcripts was observed (Fig 7C), therefore identifying BET proteins as essential actors in sat III (and not hsp70) transcriptional activation and JQ1 as a potent new decoupling agent of HSP70 and sat III transcription in heat-shocked cells.

## Discussion

Human pericentric HC enriched in sat II and III is made of compact chromatin fiber. However, based on chromatin fiber fragmentation approaches, the 9q12 locus has been identified as a more opened chromatin structure than other pericentric HC regions (Gilbert et al., 2004). This observation, possibly related to the capacity of the 9q12 locus to be transcribed in stressed cells, prompted us to analyze the epigenetic status of this locus in unstressed and stressed cells. Indeed, the transcriptional activation that we observe at the 9q12 locus in heat-shocked cells, is one of the most dramatic examples of pericentric HC activation. The heat shock model thus offers a unique model to explore the epigenetic mechanisms underlying pericentric HC activation in the different contexts where such activation occurs, including early development (Probst and Almouzni 2008), senescence or cancer (For review see Eymery et al., 2009). The size of the pericentric regions and the development of specific tools partners and probes, facilitates the exploration of these regions by *in situ* approaches allowing a cell to cell analysis. An enrichment of H3K9me3 and H4K20me3 at pericentric HC has been described in several studies. It is for instance clearly observed by immunofluorescence in mouse cells, where pericentric and centromeric HC is easily detectable as chromocenter structures (Kourmouli et al., 2004, Schotta et al., 2004, Terranova et al., 2005). It has also been confirmed in mouse by the enrichment of pericentric major satellites sequences found in H3K9me3 and H4K20me3 chromatin immunoprecipitation (Martens et al., 2007, Gonzalo et al., 2005, Terranova et al., 2005). In human, lymphocytes, both marks have also been identified by ChIP-seq as the top two repressive histone modifications over both sat II and sat III sequences in CD4+ T cells (Barski et al., 2007, Rosenfeld et al., 2008; Capurso et al., 2012). We confirm here the enrichment of H3K9me3 at the sat-enriched pericentric 9q12 locus in HeLa cells, but, surprisingly, not that of H4K20me3. This is also true in human fibroblasts, indicating that the absence of H3K20me3 enrichment at pericentric heterochromatin is not a specific feature of HeLa cells and of tumor cells (Fraga et al., 2005).

Very little is known regarding the repressive function of H4K20 methylation (Kouzarides 2007). Whether the depletion of the H4K20me3 repressive mark from the 9q12 locus could play a role in the high transcriptional potential of human pericentric heterochromatin in heat shocked cells remains therefore an opened question. Nevertheless, such depletion is clearly not sufficient, as we found that the 1q12 locus, also enriched in H3K9me3 but depleted in H4K20me3, is not transcribed upon HS.

Altogether, these results suggest that HSF1 targeting to specific pericentric regions in human cells primarily relies on the capacity of HSF1 to bind to sat III DNA repeats (Jolly et al., 2004, Eymery et al., 2010).

Therefore, the enrichment of H3K9me3 at pericentric HC is not a barrier to HSF1 binding and HSF1 capacity to selectively activate some heterochromatic regions. Accordingly, in yeast, SIR-generated HC was also found to be permissive to the constitutive binding of HSF and of components of the preinitiation complex (PIC), TBP and RNAPII (Sekinger and Gross, 2001), in a model where a heat shock gene was flanked by mating-type silencers. We now broaden these observations to an endogenous locus in human cells, and confirm the capacity of HSF1 to promote a rapid deposition of active epigenetic marks at regions enriched in H3K9me3, reinforcing the classification of HSF1 in the category of pioneer transcription factors (Fujimoto et al., 2012).

The capacity of HSF1 to rapidly and efficiently activate the transcription of HC very likely relies on its capability, shown here, to directly interact with many HATs, and to drive a large amount

of each of them to pericentric HC. The binding of p300/CBP to HSF1 (Xu et al., 2008, Zhang et al., 2011) and an enrichment of CBP at nSBs (Jolly et al., 2004) have both already been described. We extend here this finding to two other essential transcriptional co-activators with HAT activities, each belonging to an additional HAT family: Gcn5, from the GNAT (General Control Non-Derepressible 5 (Gcn5)-related N-Acetyltransferases) family, and Tip60, from the MYST (Monocytic Leukemia Zinc Finger Protein (MOZ), Ybf2/Sas3 (YBF2), Sas2 and Tat Interacting Protein (Tip60) family. The high number of acetylated histone marks found at nSBs strengthens the idea that chromatin acetylation at nSBs results from the active targeting of HAT through a HSF1-driven process. It also reinforces the possibility that a global recruitment of HATs and their depletion from the rest of the nucleus may participate to the global down regulation of gene expression also reported in heat-shocked cells (Fritah et al., 2009). The transcriptional activation of sat III by HSF1 could represent a powerful way to trigger a rapid remodeling of gene expression.

Acetylation of all four H2A, H2B, H3 and H4 histones at nSBs has already been reported (Jolly et al., 2004, Rizzi et al., 2004) and is consistent with the active transcriptional state of heterochromatin upon HS. We now show that acetylation targets lysine residues at the N terminal histone tails but also, in the case of H3K36, H3K56, H4K122, at histone fold motifs. Surprisingly, three active marks of histone H3 (K14ac, K4me3 and K36me3), were not detected at nSBs. Interestingly, a global deacetylation of most lysine residues but H3K14, has been reported in heat-shocked cells (Fritah et al., 2009) reinforcing the idea that H3K14ac may indeed display a specific behavior and role in heat-shocked cells. Our observation that H3K4me3 is not enriched at transcriptionally active pericentric HC strengthens observations made by others on a model of stable episomal vectors, showing that the presence of H3K4me3 is inversely correlated to the presence of 5-methylcytosins at pericentric HC (Okitsu and Hsieh, 2007). Indeed, pericentric HC is known to be enriched in 5-methylated cytosins, in both unstressed cells (Ting et al., 2011) and in cells submitted to the conditions of heat shock we used (Eymery et al., 2009; Tilman et al., 2012). Finally, H3K36me3 is associated with elongated polymerase. Notably, H3K36me3, has been found to be enriched at exonic regions, most particularly at constitutively expressed exons, as compared to intronic segments (Kolasinska-Zwierz et al., 2009; for review see Sims and Reinberg 2009). Evidence are still missing that sat III RNA are spliced, and essential components of the spliceosomes machinery have not been detected at nSBs (for review see Biamonti and Vourc'h 2009). Absence of H3K36me3 enrichment at nSBs suggests that sat III RNA may not be spliced and that H3K36me3 may thus not be necessary to specify which exons should be incorporated or removed by the splicing machinery.

While our immunofluorescence and immunoprecipitation experiments bring evidence for a direct role of HSF1 in the recruitment of HATs to nSBs, we also show that overexpressing HSF1 is sufficient to drive histone acetylation and transcriptional activation at nSBs, even in the absence of stress. HSF1 overexpression, by modifying the ratio between HSF1 and its repressive partners promotes HSF1 binding to DNA (Morimoto 1993). Interestingly, the formation of constitutive HSF1 stress foci has already been reported as a consequence of HSF2 overexpression (Sandqvist et al., 2009). Our observation that HSF1 overexpression is sufficient to trigger chromatin acetylation and sat III accumulation at nSBs suggests that active HSF1 is able to drive HATs to nSBs, even in the absence of stress.

nSBs are depleted in H3K27me3, but enriched in H3K27Ac mark, similar to the transcriptionally active enhancers that express non-coding enhancers RNA (e-RNA) (Djeballi

et al., 2012, Kaikkonen et al., 2013). Whether sat III RNA could regulate specific transcriptional programs during HS response is an exciting question that should be further explored.

Acetylated residues, within the N terminal tails and histone fold motifs bring additional negative charges on histone, and/or serve as platforms for the recruitment of essential transcription factors.

Our data now point to the important role of acetylation in the selective recruitment of Bromodomain proteins Brd2, Brd3, and Brd4 on nSBs, with a role in sat III accumulation. Our data also bring evidence that, despite the fact that certain residues have been identified for their specific role in Brd2 and 3 binding (Leroy et al. 2007), the other acetylated residues we have identified at nSBs do not prevent their binding to chromatin.

Our finding that JQ1, selectively impairs the accumulation of sat III and not of hsp70 transcripts reveals major differences in the mechanisms underlying sat III and hsp70 gene transcription. Differences of chromatin compaction between hsp70 gene and sat III sequences could set the basis for the differences of JQ1 impact we observe. The Brd2 protein has been found to display an intrinsic histone chaperone activity, rendering nucleosomes marked by acetylation, permissive to the passage of elongating RNAPII (Leroy et al., 2008). Our data are therefore also fully in line with recent data of Ozato's group, who showed that Brd4 activates transcriptional elongation through two different ways. One, specifically found at enhancers, relies on the acetyl binding property of the Brd4 bromodomain and involves the histone chaperone activity of BET proteins (Kanno et al, 2014). A second way, not impaired by JQ1, would rely on the capacity of Brd4 to recruit the P-TEFb complex allowing RNA pol II phosphorylation and release from pausing at transcription start sites (Peterlin and Price 2006). The JQ1-mediated inhibition of sat RNA production indicates that the histone chaperone function of BET proteins is preferentially required for HC transcription. This constitutes an additional common feature between HC transcriptional activation under HS, and enhancer transcriptional activation to regulate neighboring genes. On the other hand, although nothing is known on a possible role of BET proteins in the previously reported PTEFb recruitment on Hsp70 promoter to release the RNA pol II pausing (Ni et al 2004, 2008, Yoon et al 2011), such a role would not be impaired by JQ1, which is consistent with our findings.

Whatever the structural and/or mechanistic basis underlying these differences, the possibility to uncouple sat III and hsp70 gene transcription should help us to unravel the specific role of sat III transcripts in the heat shock response in the various different physiopathological contexts, such as cancer (Eymery et al., 2009, for review see Biamonti and Vourc'h 2011; Vourc'h and Biamonti 2011), for which an accumulation of sat III RNA has been detected.

### **Acknowledgements**

We thank J.-M. Escudier (Plateforme de synthèse d'Oligonucléotides modifiés de l'Interface Chimie Biologie de l'ITAV-Toulouse -France) for the synthesis of oligonucleotide probes for in situ analysis. We are very grateful to Mariano Rocchi (University of Bari, Italy) for human-hamster hybrid cell lines.

### **Funding**

Institut National du Cancer (EPISTRESS project);  
Association de la Recherche sur le Cancer (# to C. V.); ARECA framework program (to C.V., S.K. and E.G.). Institut national du Cancer (Epistress) (to C.V., S.K., and Z.H.)

### **References**

Akerfelt, M., Morimoto, R. I., Sistonen L. (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:545-55.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823-837.

Biamonti, G., and Vourc'h, C. (2010). Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(6), a000695.

Brès, V., Yoh, S. M., and Jones, K. A. (2008). The multi-tasking P-TEFb complex. *Current opinion in cell biology*, 20(3), 334-340.

Capurso, D., Xiong, H., and Segal, M. R. (2012). A histone arginine methylation localizes to nucleosomes in satellite II and III DNA sequences in the human genome. *BMC genomics*, 13(1), 630.

de Nadal, E., Ammerer, G., and Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 833-845.

Eymery, A., Callanan, M., Vourc'h, C. (2009) The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int J Dev Biol* 53:259-68

Eymery A., Horard B., El Atifi-Borel M., Fourel G., Berger F., Vitte A. L., Van den Broeck A., Brambilla E., Fournier A., Callanan M., Gazzeri S., Khochbin S., Rousseaux S., Gilson E., Vourc'h C. (2009) A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res* 19:6340-54

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., Harmen J. Bussemaker H. J., and van Steensel, B. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell*, 143, 212-224.

Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West N., Cameron M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., La Thangue, N., French, C. A., Wiest, O., Kung, A. L., Knapp, S., Bradner, J. E. (2010). Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468, 1067-1073.

Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K. Iyer, N. G., Pérez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Cano, A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M. A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T. and Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, 37, 391-400.

Fujimoto, M., Takaki, E., Takii, R., Tan, K., Prakasam, R., Hayashida, N., Iemura S., Natsume, T., and Nakai, A. (2012). RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Molecular Cell*, 48, 182-194.

Gajiwala, K. S., and Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10, 110-116.

Gilbert N., Boyle S., Fiegler H., Woodfine K., Carter N. P., Bickmore W.A. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell*. 2004. 118:555-66.

Gonzalo S., García-Cao M., Fraga M. F., Schotta G., Peters A. H., Cotter S.E., Eguía R., Dean D. C., Esteller M., Jenuwein T., Blasco M.A. (2005) Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat Cell Biol*. 7:420-8.

Grady, D. L, Ratliff, R. L. Robinson, D. L. McCanlies, E. C. Meyne, J. and Moyzis. R. K. 1992. Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:1695–1699.

Jolly, C., Konecny, L., Grady, D. L., Kutsikova, Y. A., Cotto, J. J., Morimoto, R. I., and Vourc'h, C. (2002) In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol* 156:775-81

Jolly, C., Metz, A., Govin, J., Vigneron, M., Turner, B. M., Khochbin, S., Vourc'h, C. (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* 164: 25-33

Kanno, T., Kanno, Y., LeRoy, G., Campos, E., Sun, H. W., Brooks, S.R., Vahedi, G., Heightman T. D., Garcia. B. A., Reinberg, D., Siebenlist, U., O'Shea, J. J., Ozato, K. (2014) BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones. *Nat Struct Mol Biol*. 21:1047-57.

Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X. S., and Ahringer, J. (2009) Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nature genetics*, 41:376-381.

Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevhaiah, S., Burgoyne, P., Wu, R., Gilbert, D. M., Bongiorno, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Shi W., Fundele, R., and Singh, P.B. (2004) Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J Cell Sci*. 117:2491-501.

Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.

Lee, J. S., Smith, E., and Shilatifard, A. (2010) The language of histone crosstalk. *Cell*, 142, 682-685.

Legube, G., Linares, L. K., Lemercier, C., Scheffner, M., Khochbin, S., and Trouche, D. (2002) Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *The EMBO journal*, 21, 1704-1712.

Lemercier, C., Legube, G., Caron, C., Louwagie, M., Garin, J., Trouche, D., and Khochbin, S. (2003) Tip60 acetyltransferase activity is controlled by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 4713-4718.

LeRoy, G., Rickards, B., and Flint, S. J. (2008) The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Molecular cell*, 30,51-60.

- Lindquist, S., and Craig, E. A. (1988) The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22, 631-677.
- Littlefield, O., and Nelson, H. C. (1999) A new use for the 'wing' of the 'winged' helix-turn-helix motif in the HSF–DNA cocystal. *Nature Structural & Molecular Biology*, 6, 464-470.
- Lu, J, and Gilbert, D. M. (2007) Proliferation-dependent and cell cycle–regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. *The Journal of cell biology*, 179, 411-421.
- Magnani, L., Eeckhoutte, J., and Lupien, M. (2011) Pioneer factors: directing transcriptional regulators within the chromatin environment. *Trends in Genetics*, 27, 465-474.
- Martens, J. H., O'Sullivan, R. J., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P., and Jenuwein, T. (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *The EMBO journal*, 24, 800-812.
- Metz, A., Soret, J., Vourc'h, C., Tazi, J., and Jolly, C. (2004) A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J Cell Sci.* 117:4551-8.
- Morimoto, R. I. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259, 1409-1409.
- Okitsu, C. Y, and Hsieh, C. L. (2007) DNA methylation dictates histone H3K4 methylation. *Molecular & cellular biology*, 27, 2746-2757.
- Peterlin, B. M., and Price, D. H. (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Molecular cell*, 23, 297-305.
- Petes, S. J., and Lis, J. T. (2008) Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci. *Cell*, 134, 74-84
- Petes, S. J., and Lis, J. T. (2012) Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation. *Trends in Genetics*, 28(6), 285-294
- Petes, S. J., and Lis, J. T. (2012) Activator-induced spread of poly (ADP-ribose) polymerase promotes nucleosome loss at Hsp70. *Molecular cell*, 45, 64-74
- Pezer, Z., and Ugarkovic, D. (2012) Satellite DNA-associated siRNAs as mediators of heat shock response in insects. *RNA biology*, 9, 587-595
- Probst, A. V., and Almouzni, G. (2008) Pericentric heterochromatin: dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation*, 76, 15-23.
- Rizzi N., Denegri M., Chiodi I., Corioni M., Valgardsdottir R., Cebianchi F., Riva S., and Biamonti G (2004) Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock *Mol Biol Cell* 15, 543-51
- Rosenfeld J. A., Wang Z., Schones D. E., Zhao K., DeSalle R., and Zhang MQ. (2009) Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC genomics*, 10, 143.

Sanchez, R., and Zhou, M. M. (2009) The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Current opinion in drug discovery & development*, 12, 659.

Sandqvist, A., Björk, J. K., Åkerfelt, M., Chitikova, Z., Grichine, A., Vourc'h, C., Jolly C., Salminen, T.A., Nymalm Y., and Sistonen, L. (2009) Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Molecular biology of the cell*, 20, 1340-1347.

Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G.,... and Jenuwein, T. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & development*, 18, 1251-1262.

Sengupta, S., Parihar, R., Ganesh, S. 2009. Satellite III noncoding RNAs show distinct and stress-specific patterns of induction. *Biochemical and biophysical research communications* 382: 102–107.

Sekinger, E. A., and D. S. Gross. 2001. Silenced chromatin is permissive to activator binding and PIC recruitment. *Cell* 105:403–414.

Sims III, R. J., and Reinberg, D. (2009) Processing the H3K36me3 signature. *Nature genetics*, 41, 270-271.

Smith, S. T., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E. and Mazo, A. (2004) Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nature cell biology*, 6, 162-167.

Sullivan, E. K., Weirich, C. S., Guyon, J. R., Sif, S., and Kingston, R. E. (2001) Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human SWI/SNF. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 5826-5837.

Terranova, R., Sauer, S., Merckenschlager, M., and Fisher, A. G. (2005) The reorganisation of constitutive heterochromatin in differentiating muscle requires HDAC activity. *Experimental cell Research*, 310, 344-356.

Tilman, G., Arnoult, N., Lenglez, S., Van Beneden, A., Loriot, A., De Smet, C., and Decottignies, A. (2012) Cancer-linked satellite 2 DNA hypomethylation does not regulate Sat2 non-coding RNA expression and is initiated by heat shock pathway activation. *Epigenetics*, 7, 903-913.

Ting, D. T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B. W., Akhavanfard, S., Coffman E. J, Contino G, Deshpande V., lafrate, A. J. Letovsky S. Rivera M.N., Bardeesy, N, Maheswaran S, and Haber, D. A. (2011) Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science*, 331, 593-596.

Valgardsdottir, R., Chiodi, I., Giordano, M., Rossi, A., Bazzini, S., Ghigna, C., Riva S and Biamonti, G. (2008) Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells. *Nucleic acids research*, 36, 423-434.

Vourc'h, C., and Biamonti, G. (2011) Transcription of satellite DNAs in mammals. In *Long Non-Coding RNAs* (pp. 95-118) Springer Berlin Heidelberg.

Wu, B., Hunt, C and Morimoto, R. I. (1985) Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 330-341.

Xu, D., Zalmas, L. P., and La Thangue, N. B. (2008) A transcription cofactor required for the heat-shock response. *EMBO reports*, 9, 662-669.

Yuan, C. X, and Gurley, W. B. (2000) Potential targets for HSF1 within the preinitiation complex. *Cell stress & chaperones*, 5, 229.

Zobeck, K. L, Buckley, M. S., Zipfel, W. R., and Lis, J. T. (2010) Recruitment timing and dynamics of transcription factors at the Hsp70 loci in living cells. *Molecular Cell*, 40, 965-975.

## Figures

**Figure 1:** Status of the repressive histone marks at the 9q12 locus in unstressed HeLa cells. Repressive H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3 histone marks was analyzed by immunodetection (red signals) in cells transfected with the DBD-TRIM HSF1-GFP mutant, as a way to visualize the 9q12 locus in these cells (green signals) (A). Compared fluorescence profiles of HSF1 and Post translational histone modifications (B) are shown. The status of H4K20me3 at the 1q12 and 9q12 loci was also analyzed in human fibroblasts. H3K20me3 was detected by immunofluorescence together with the 9q12 locus detected by DNA FISH (green signals) (B). Bar = 5µm

**Figure 2:** Status of active histones H3 (A and B) and H4 (C) marks at the 9q12 locus in HeLa stressed cells.

Active H3 (A and B) and H4 histone (C) marks (Red signals) were detected together with HSF1 (green signals) by immunofluorescence. Compared fluorescence profiles of HSF1 and of H3K4me3 (A), H3K14ac (A), and H3K36me3 (B) are shown. Barr: 5 µm

**Figure 3:** Loss of H3K9me3 at the 9q12 locus in HeLa cells in heat-shocked cells. Graph showing the evolution of H3K9me3 enrichment at the 9q12 locus. H3K9me3 and was detected at by immunofluorescence. The 9q12 locus was detected by DNA FISH (unstressed cells) or with antibodies against HSF1 (heat shocked cells) (A). Stress-induced loss of H3K9me3 at the 9q12 locus was confirmed by Chromatin Immuno-Precipitation (B) (error bars are calculated from 3 independent experiments).

**Figure 4:** Gcn5, Tip60 and p300 HATs are recruited at nSBs through their interaction with HSF1. Kinetics of HSF1 recruitment, H4 acetylation and RNA pol II recruitment and SRSF1 at nSBs in HeLa cells. Evolution in the percentages of cells displaying nSBs enriched in HSF1, acetylated histones, RNA pol II and SRSF1 at nSBs in the course of the heat shock response determined by immunofluorescence over a kinetics of continuous heat shock exposure (A). Colocalisation between endogenous GCN5 and Tip60 (red signals) and endogenous HSF1 (green signals) detected by immunofluorescence. A higher magnification of the framed areas is also presented (B) (scale bar = 5µm). Co-immunoprecipitation of Flag-HSF1 with HA-Tip60, Myc-GCN5 or Myc-p300. All three HATs were detected in Flag-HSF1 immunoprecipitates from stressed HeLa cells (C).

**Figure 5:** Overexpressed HSF1 directs chromatin acetylation at nSBs in unstressed HeLa cells. HSF1 foci were detected in cells transiently transfected with HSF1-GFP. HSF1 foci correspond to regions of hyperacetylated chromatin and of sat III RNA accumulation, thus demonstrating that DNA-binding competent HSF1 directs chromatin acetylation at the 9q12 region in a stress-independent manner (A). No accumulation of H3K4me4 was observed at nSBS in these cells (B).

**Figure 6:** Specific Bromodomain-containing proteins are recruited to the 9q12 locus in stressed HeLa cells.

Bromodomain containing proteins (green signals) were co-detected with HSF1 (red signals) by immunofluorescence on both unstressed and stressed cells. Endogenous Brd2, Brd3 and Brd4 are enriched at nSBs in stressed cells together with endogenous HSF1 (green signal) while TAF<sub>250</sub> and ATAD2 are not (A). Absence of TAF1 and ATAD2 enrichment at the 9q12 locus was confirmed by comparative analysis of TAF1 or ATAD2 with HSF1 fluorescence profiles (B).

**Figure 7:** Inhibition of Brd proteins binding to acetylated chromatin impairs the transcriptional activation of sat III sequences by RNA Polymerase II cells.

HSF1 (green signal) was co-detected with Brd4 by immunofluorescence (red signal). No enrichment of Brd4 was observed at nSBs in HeLa cells treated with JQ1 (A). hsp70 (red signals) and Sat III RNA (green signals) are detected with RNA FISH (same exposure time were used in both conditions) (B). Impact of JQ1 on hsp70 and sat III RNA accumulation was confirmed by Northern blot on RNA fractions prepared from unstressed and stressed cells treated or not with JQ1 (C).

## Supplementary Figures

### Figure S1

Satellite III sequences of pericentric chromosome 1 are not transcriptionally activated upon Heat shock.

Hamster cells containing a unique human chromosome (either chromosome 1 or chromosome 9) were analyzed for their capacity to form HSF1 foci (detected by immunofluorescence) and to transcribe satellite sequences upon heat shock. Satellite RNA from chromosome 1 and chromosome 9 were detected by SRSF1. Only hamster cells containing chromosome 9 are actively transcribed and contain HSF1 foci (red signal) colocalizing with and SRSF1 (green signal).

### Figure S2

Detection of endogenous Brd2 and Brd3 by immunofluorescence in heat shocked HeLa cells. While endogenous Brd2 and Brd3 proteins accumulate at nSBs upon heat shock, no accumulation of endogenous BRD2 and BRD3 is observed in heat-shocked cells treated with JQ1.

## Competing interest

The authors declare no competing interests

**Fig. 1**

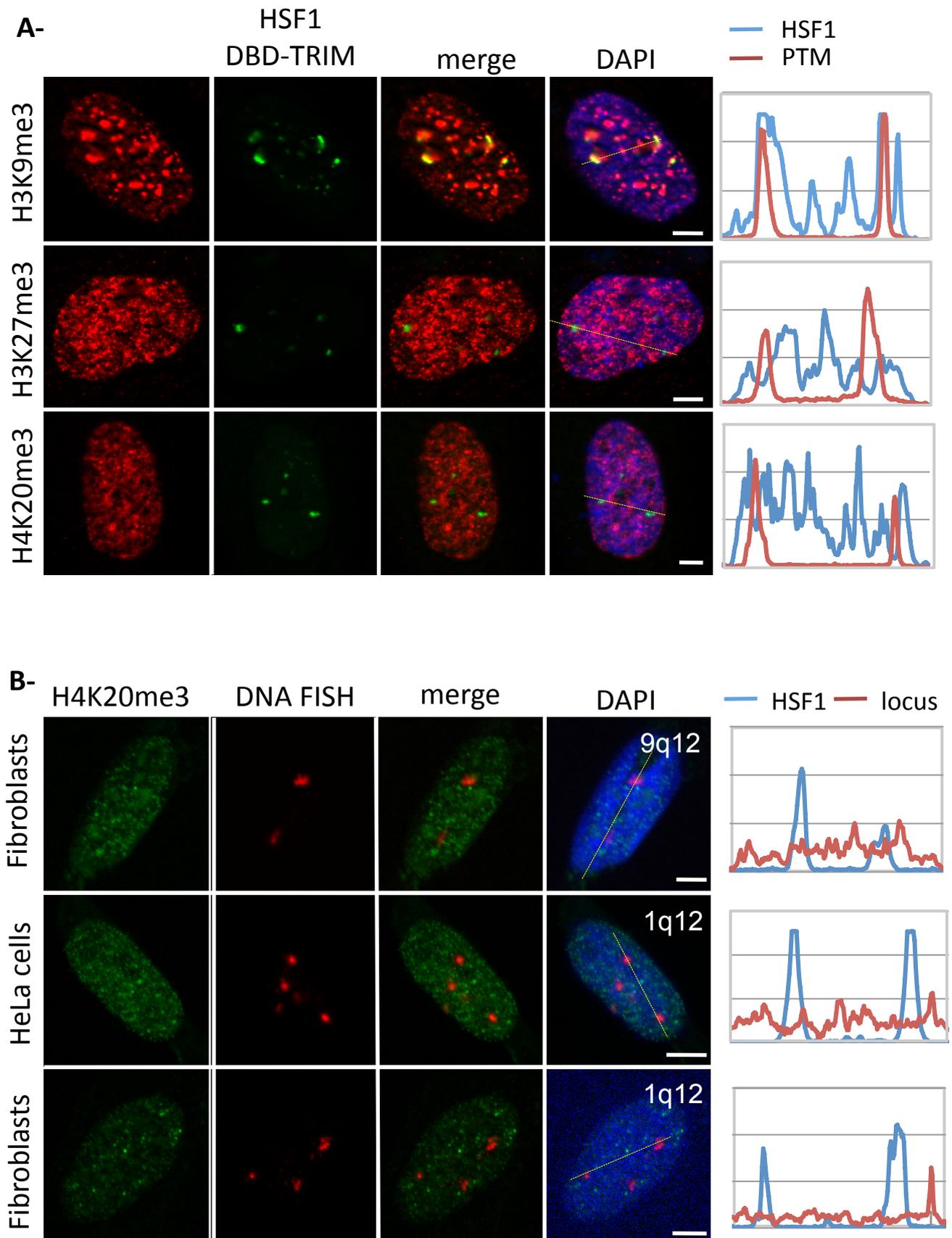


Fig. 2

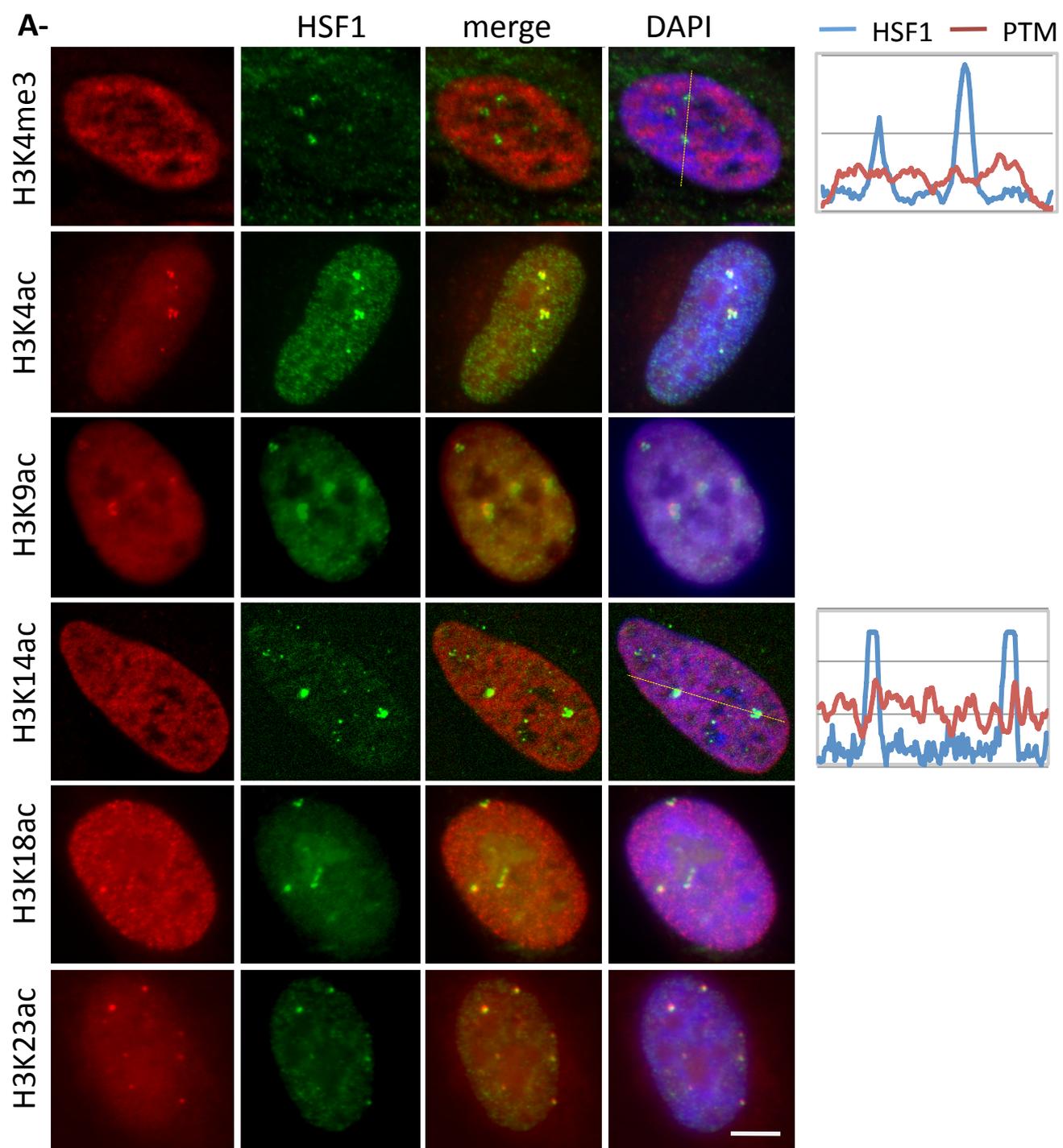


Fig. 2

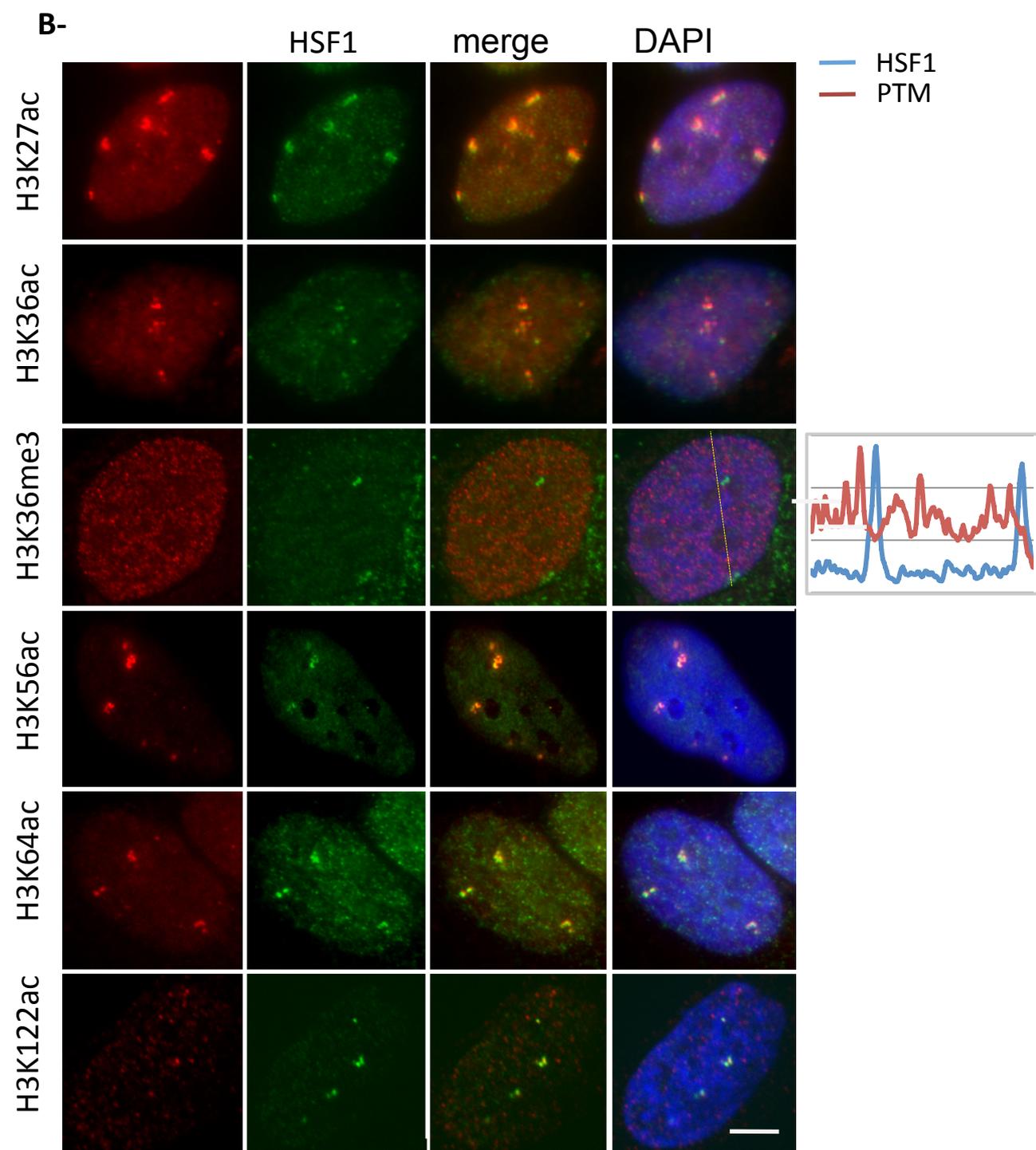
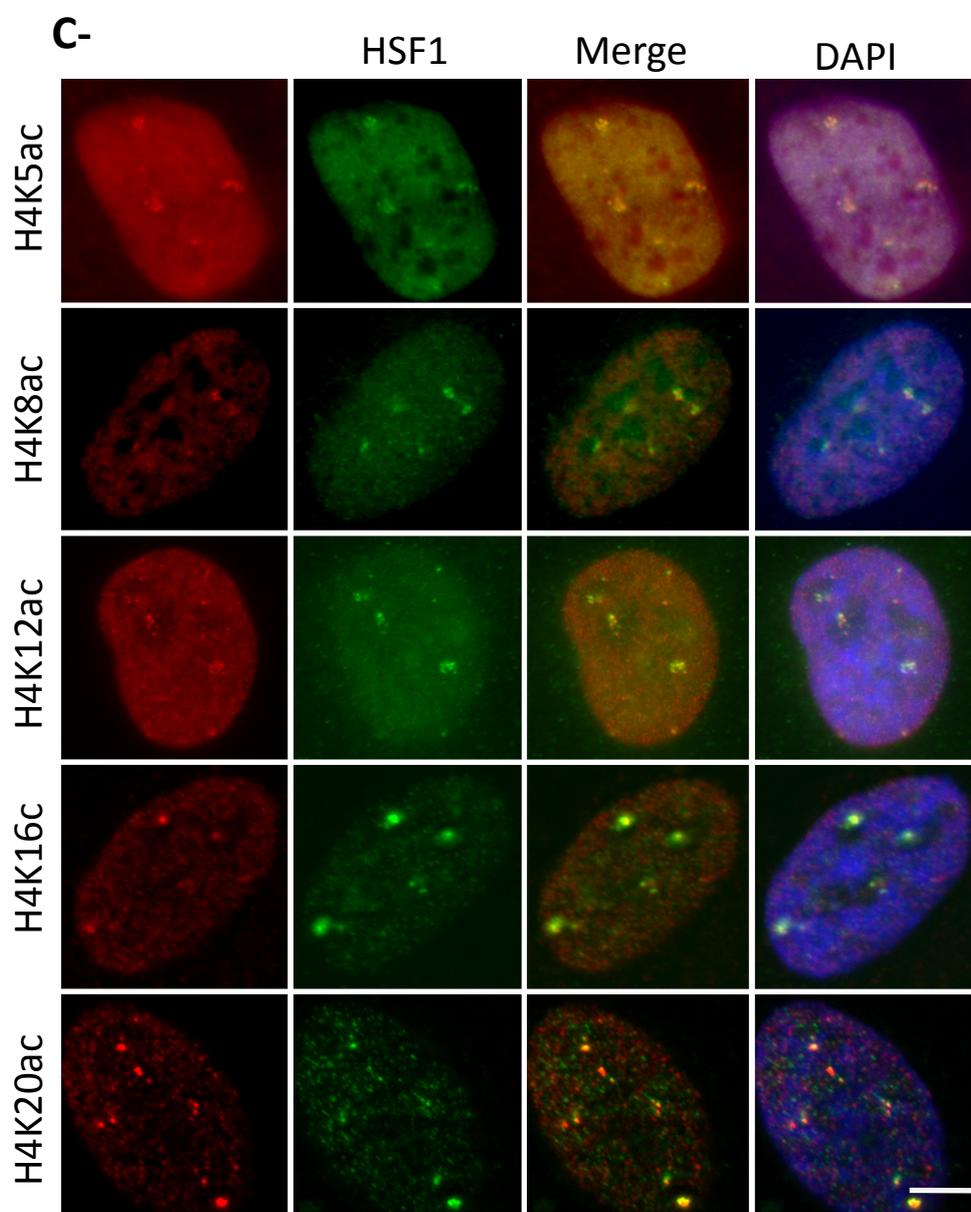
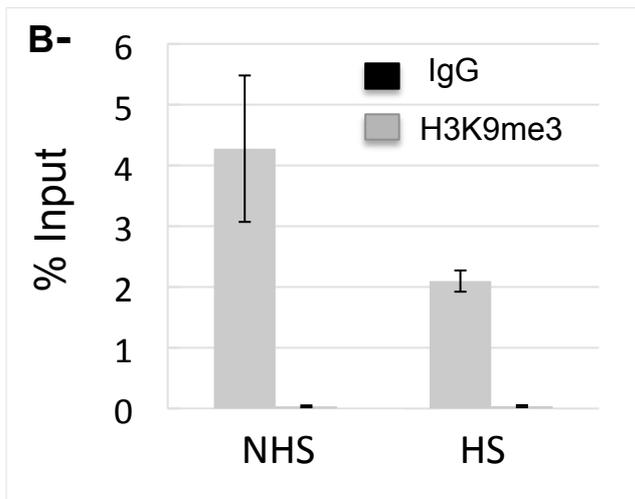
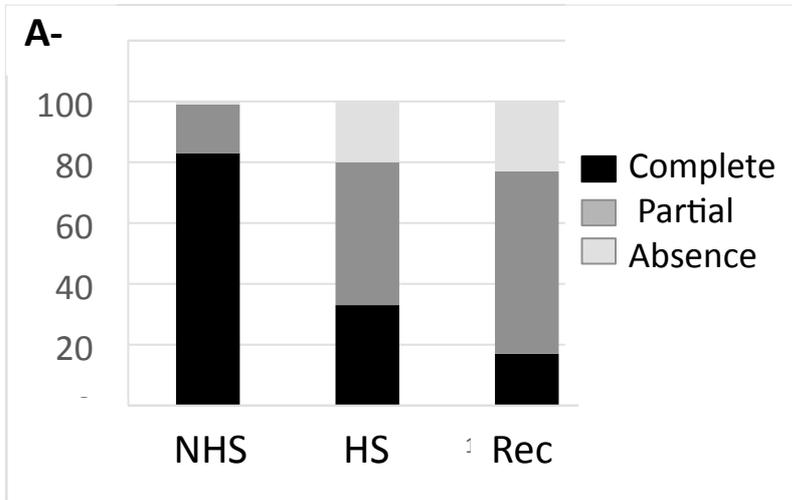


Fig. 2

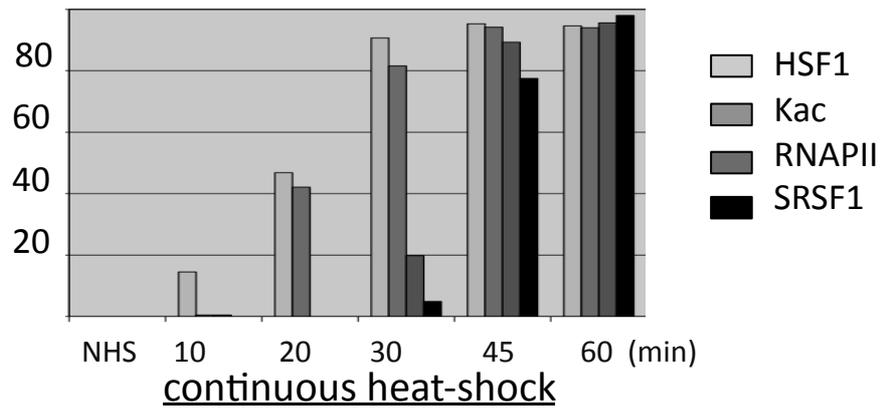


**Fig. 3**

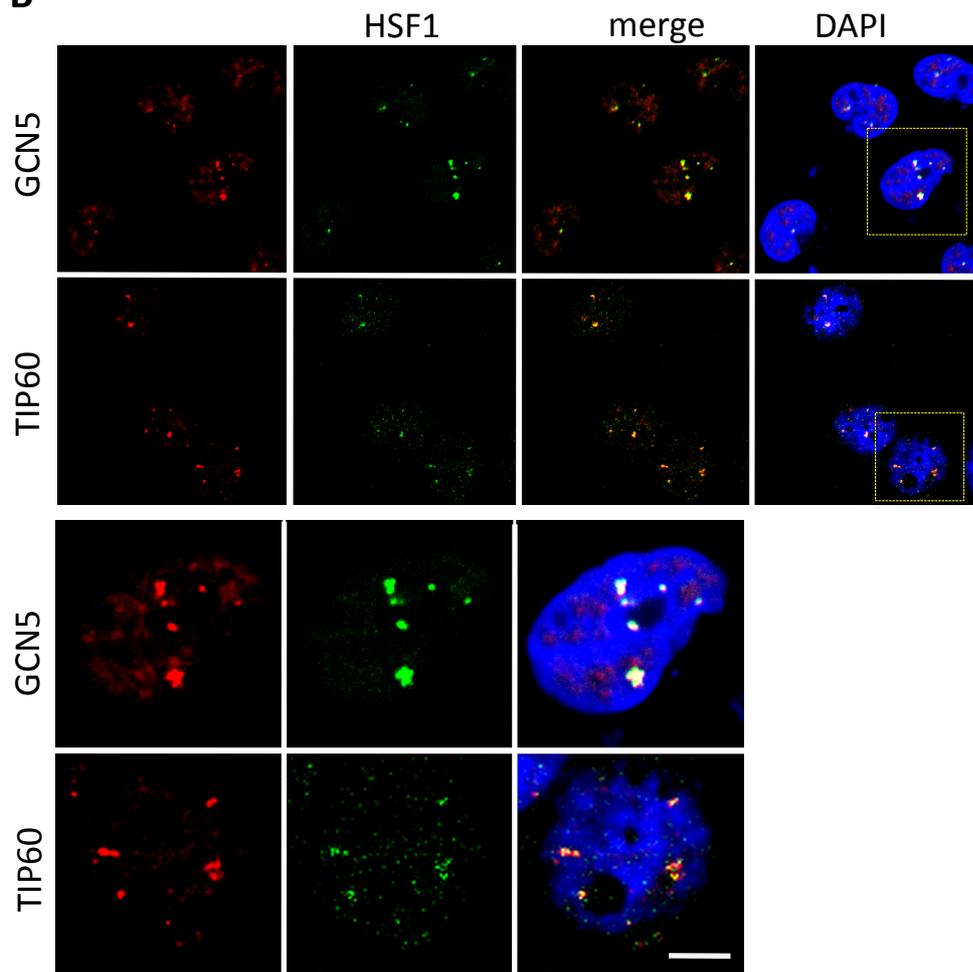


**Fig. 4**

**A-**



**B-**



**Fig 4.**

**A-**

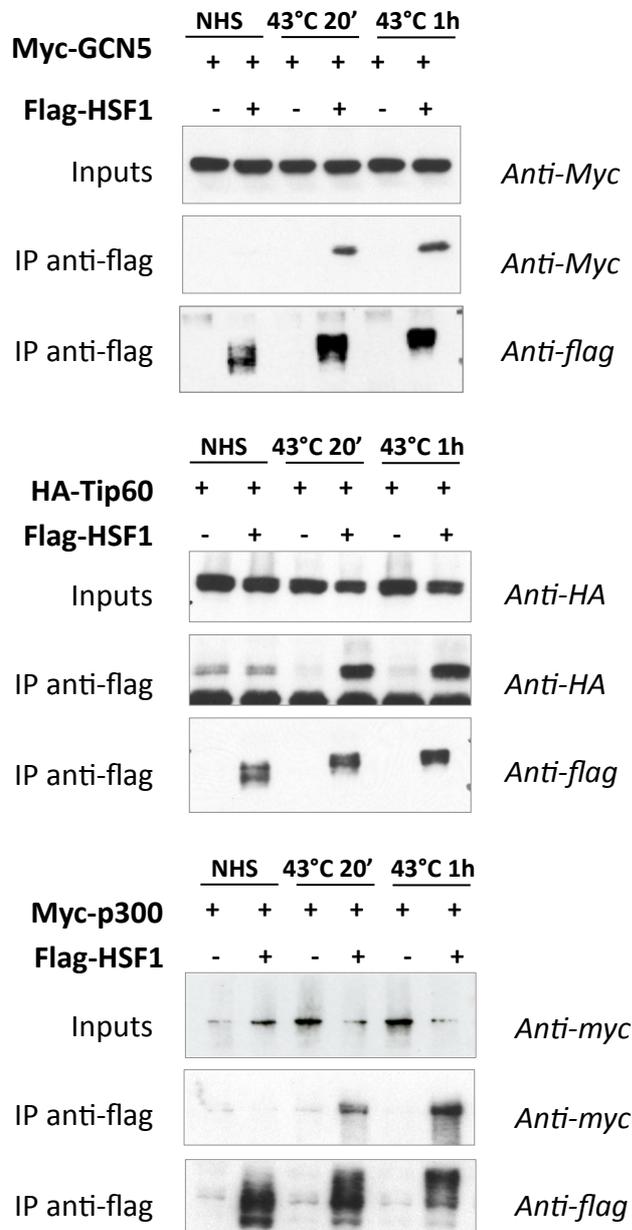


Fig.5

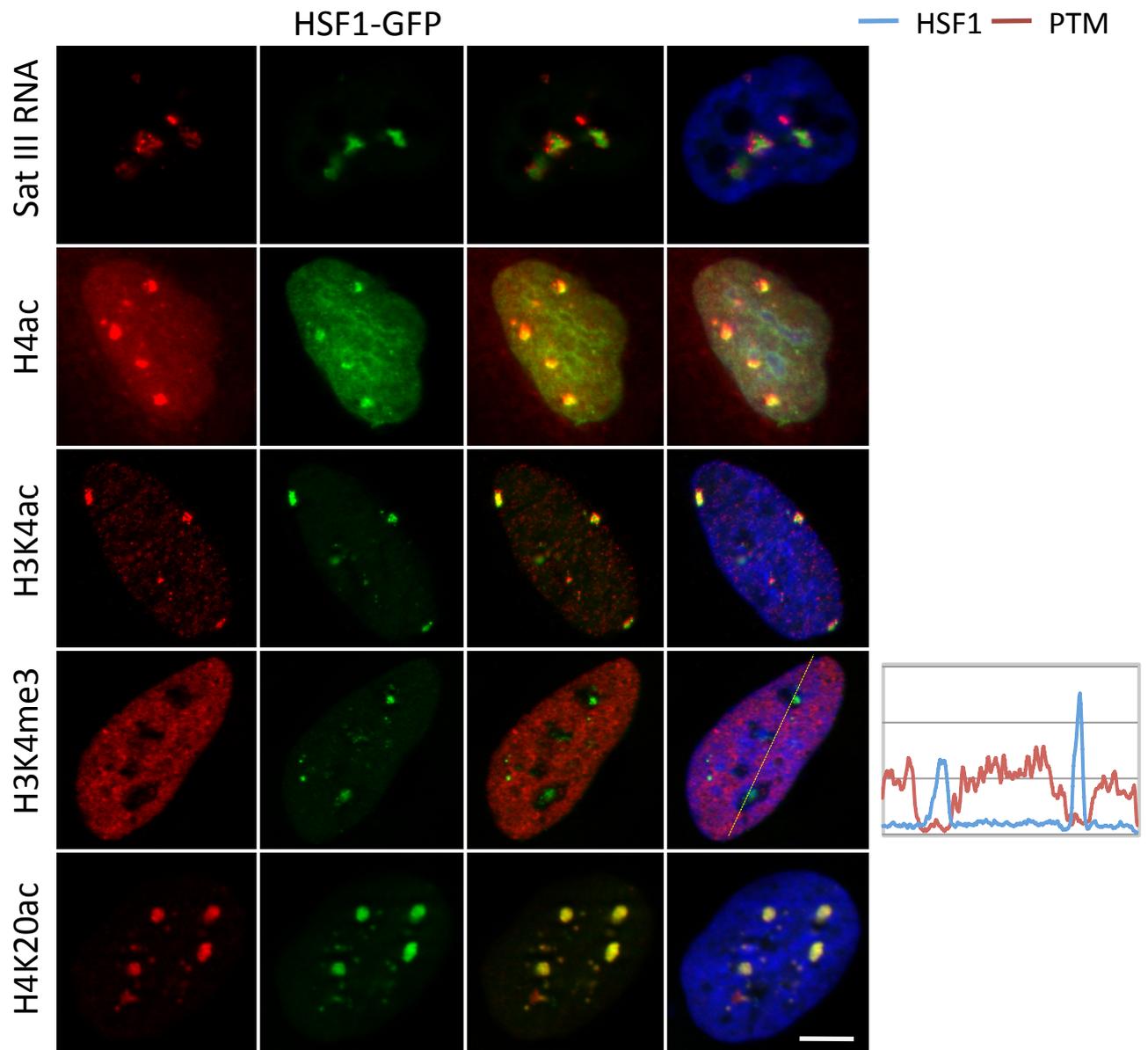
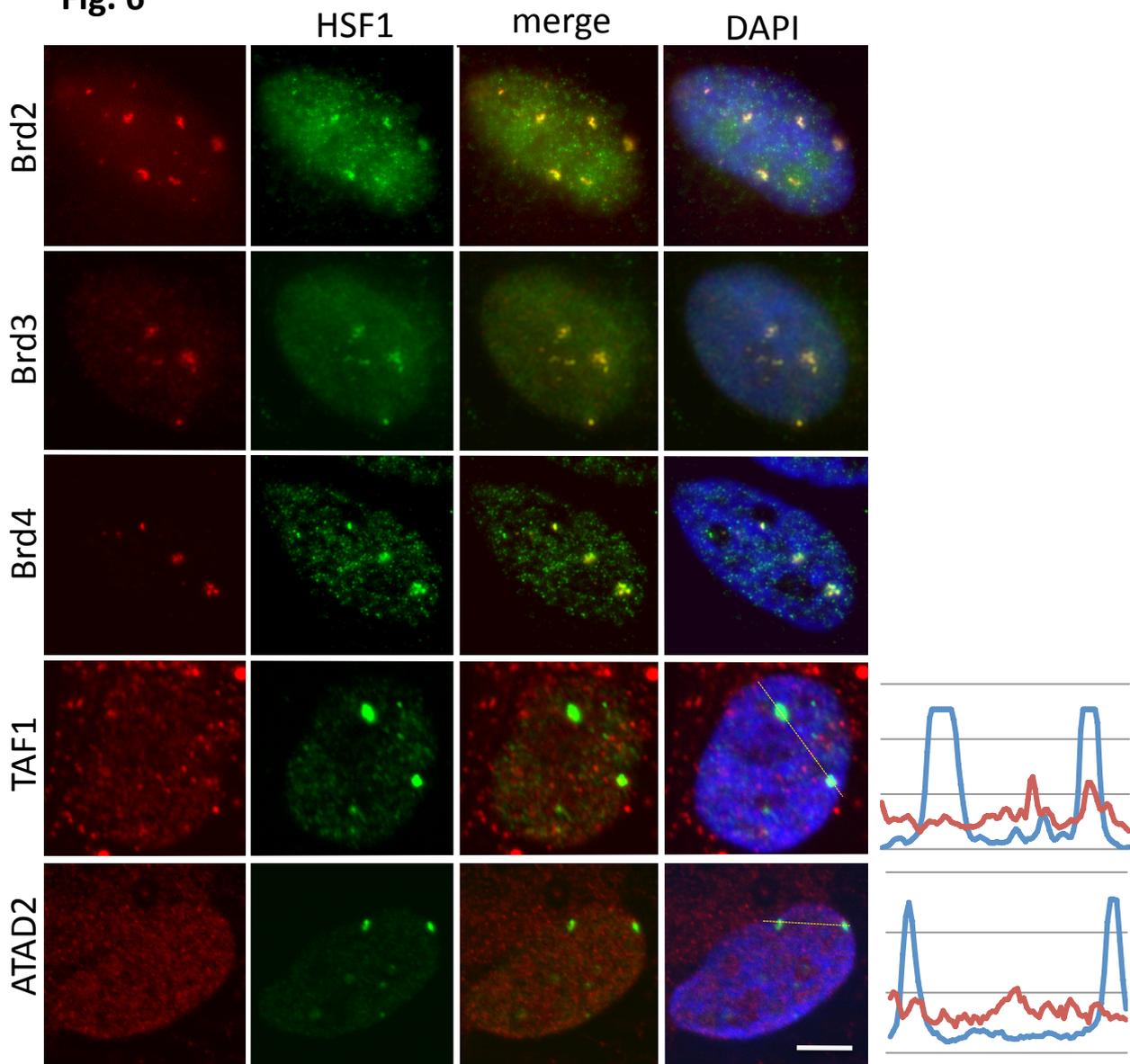
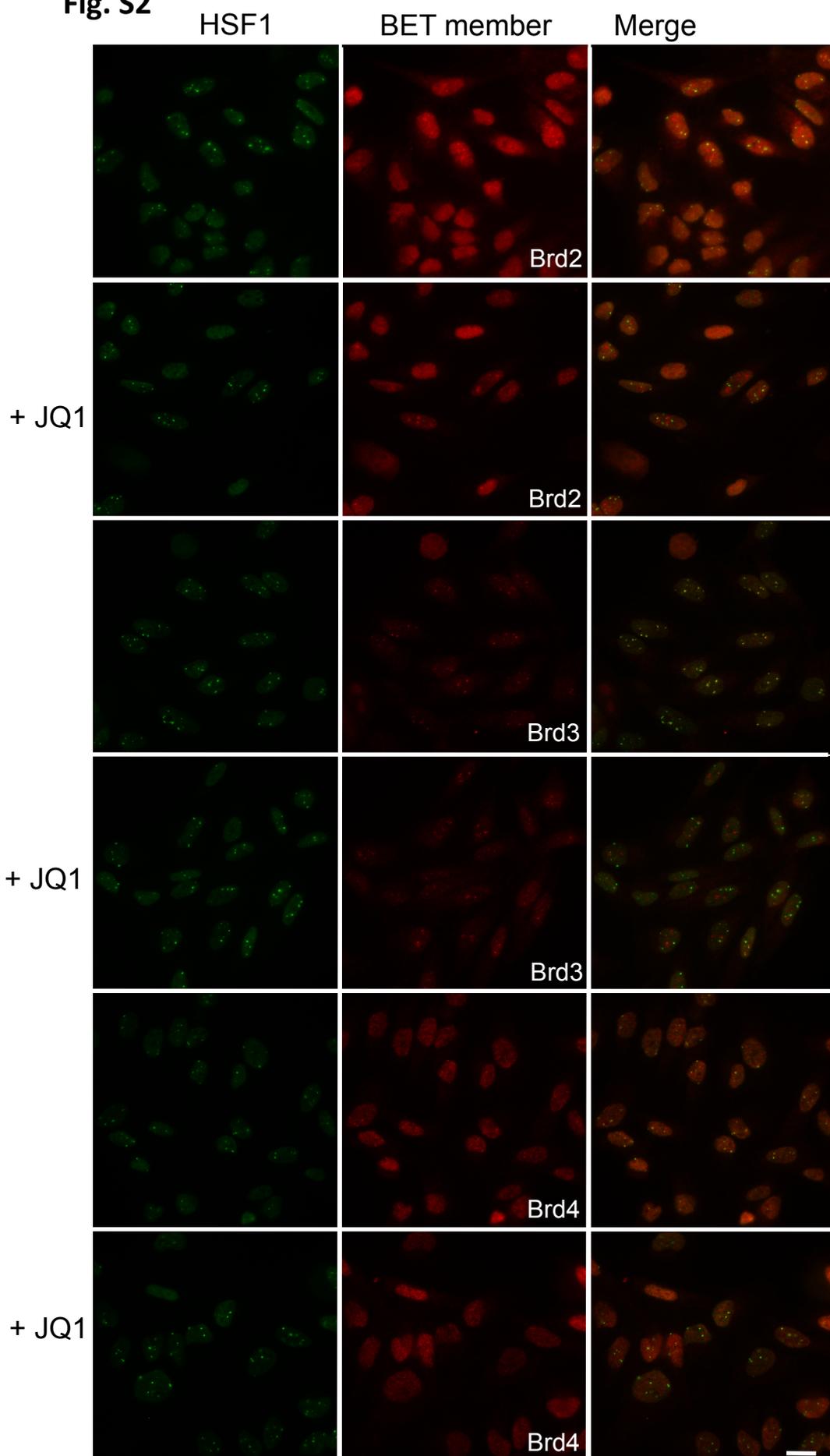


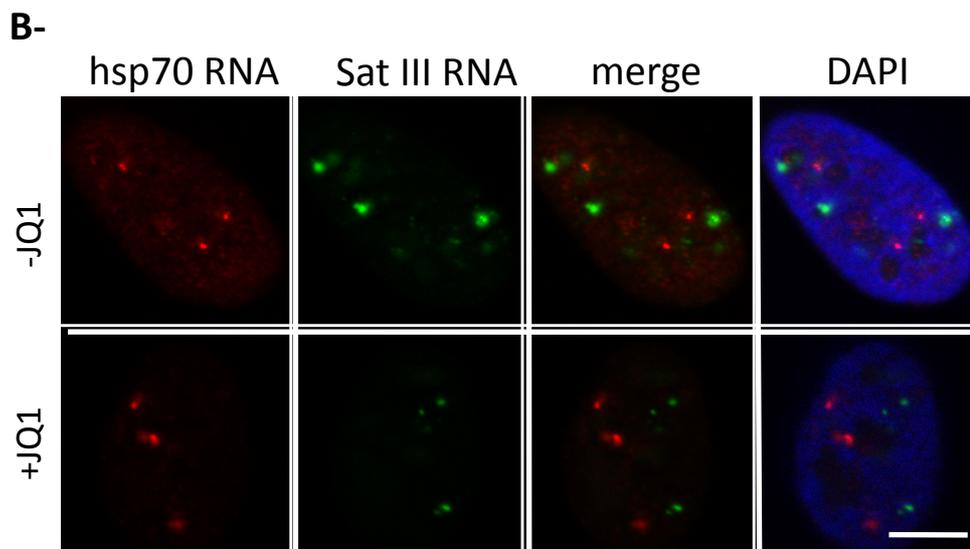
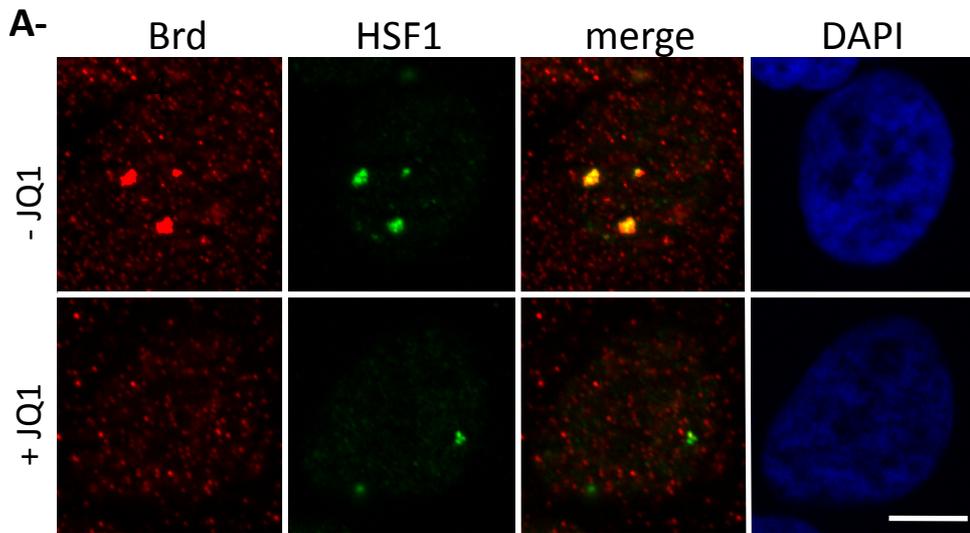
Fig. 6



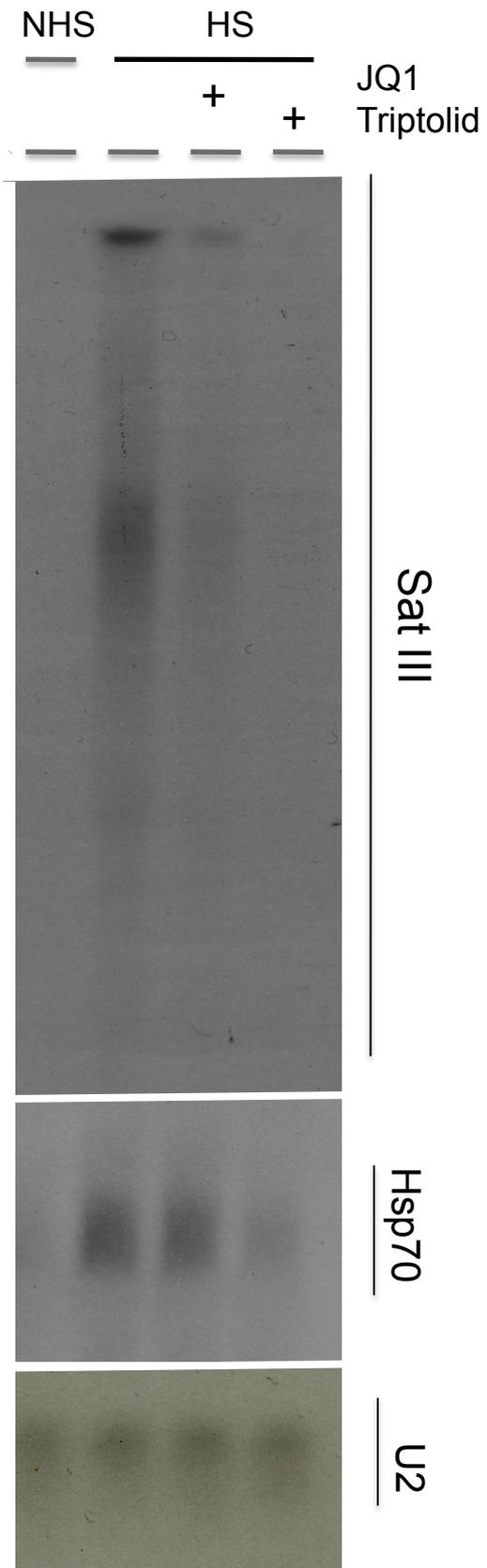
**Fig. S2**



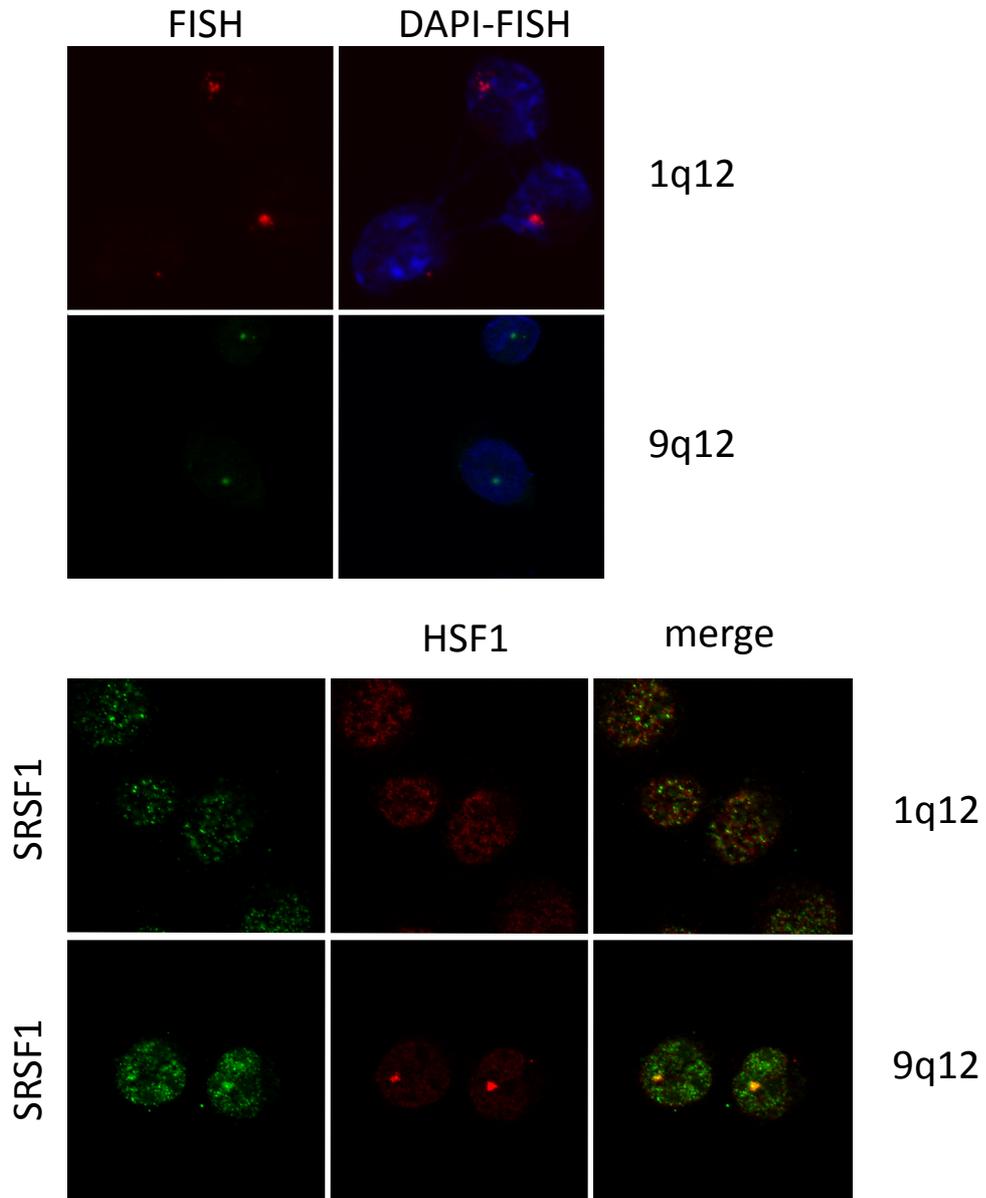
**Fig. 7**



C-



**Fig. S1**



**Fig. S3**

