



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle des voies de la déubiquitination de l'histone H2B chez *Arabidopsis thaliana*

Martin Rougée

► **To cite this version:**

Martin Rougée. Caractérisation fonctionnelle des voies de la déubiquitination de l'histone H2B chez *Arabidopsis thaliana*. Génétique des plantes. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS222 . tel-02191523

HAL Id: tel-02191523

<https://theses.hal.science/tel-02191523v1>

Submitted on 23 Jul 2019

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.

Caractérisation fonctionnelle des voies de la déubiquitination de l'histone H2B chez *Arabidopsis thaliana*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°567 Sciences du végétal : du gène à l'écosystème
Spécialité de doctorat : Biologie

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 20/07/2017, par

Martin Rougée

Composition du Jury :

Mr Martin Crespi Directeur de recherche, IPS2 Gif-sur-Yvette	Président
Mme Christel Carles Maître de conférences, UGA Grenoble	Rapporteur
Mr Pascal Genschik Directeur de recherche, IBMP Strasbourg	Rapporteur
Mme Angélique Délérès Chargée de recherche, IBENS Paris	Examineur
Mr Fredy Barneche Directeur de recherche, IBENS Paris	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Chris Bowler de m'avoir accueilli dans son équipe si dynamique et constituée de personnes aussi impressionnantes qu'intéressantes et de m'avoir permis de finir ma thèse dans les meilleures conditions.

J'adresse ensuite mon plus grand remerciement à mon directeur de thèse Fredy Barneche, d'abord pour avoir cru en moi et fait confiance dès mon stage de Master2. Ensuite pour son encadrement, sa disponibilité sans faille, sa capacité d'écoute et ses conseils avisés qui m'ont permis de débiter cette aventure incroyable qu'est la thèse et de la mener à bien dans les meilleures conditions. Merci de m'avoir guidé pour m'aider à grandir professionnellement, en apprenant tous les jours comment mieux expérimenter, mieux interpréter et mieux présenter. Merci enfin pour son aide précieuse apportée à la rédaction de ce manuscrit via les relectures détaillées et les conseils avisés pendant ces mois intenses.

Je remercie les rapporteurs Christel Carles et Pascal Genschik ainsi que les examinateurs Angélique Délérès et Martin Crespi d'avoir accepté d'évaluer mon travail, représenté par ce manuscrit et la soutenance qui suivra. Je remercie également Dao-Xiu Zhou, Daniel Bouyer et Célia Jaeger-Baroux pour avoir été présents lors de mes comités de thèse afin d'aiguiller mon travail.

Je remercie également Sophie Lemoine pour les différentes analyses des données RNA-seq, Tao Ye pour les nombreuses discussions, la patience qu'il a montré pour m'expliquer la bioinformatique et son travail sur les analyses des CHIP-seq, ainsi que Cécile Breyton pour son aide sur les analyses de la structure du DUBm, David Stroebel pour les expériences de FPLC effectuées et Julio Saez-Vasquez pour les expériences de phénotypage sous stress thermique en cours. Merci à Geert de Jaeger pour les expériences de TAP-tag et Vicente Rubio pour sa volonté de mettre en commun nos résultats afin de collaborer de manière efficace. Merci également à Vincent Colot pour les réunions d'équipes en commun très enrichissantes, qui m'ont permis de partager mes résultats et de recevoir des observations et conseils très pertinents de toute son équipe. Merci aussi à François Roudier, Ana Karina Morao et Leandro Quadrana pour leur aide sur des aspects aussi bien techniques que théoriques.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe Bowler Arabidopsis que j'ai côtoyés par le passé : Stéphanie, Massimo et Anne-Sophie et ceux présents aujourd'hui : Imen, Clara et Gianluca. Merci à tous pour vos enseignements, les réponses à mes (trop) nombreuses questions, vos conseils, la complicité et la bonne humeur qui permettent de quand même voir la vie du bon côté

dans les moments difficiles. Merci aussi aux deux stagiaires (petite-)Clara et Axel que j'ai eu le plaisir d'encadrer et qui m'ont apporté une aide efficace pour l'avancement de ma thèse.

Mention spéciale pour Monsieur Gégé qui dès mon premier jour, et tout au long de ma thèse, m'a transmis avec beaucoup de patience et de pédagogie son savoir-faire inégalable, accumulé au cours de ses nombreuses années d'expérience. Merci pour son aide précieuse et sans faille dans de nombreuses expériences ainsi que pour les moments de répit essentiels qu'il savait « imposer » à tout le laboratoire, parfois même à tous les chefs d'équipes du couloir.

De manière générale, un grand merci à toutes les personnes du 4^{ème} étage, ainsi qu'à Elodie du 1^{er} avec qui j'ai eu le plaisir d'interagir, discuter, râler, parler science et partager des moments de détente pendant ces années de thèse.

Sur le plan personnel, merci à mes amis (qui se reconnaîtront), déjà d'être toujours là, ensuite pour les after-work et autres soirées/sorties, tous ces moments de détente nécessaires pour apprécier (ou oublier) le quotidien.

Merci à ma famille pour l'intérêt porté à mon travail malgré mon incapacité à l'expliquer clairement et simplement. Merci surtout à mes parents qui ont toujours tout fait pour aider leurs deux enfants du mieux qu'ils peuvent sans rien demander en retour que des nouvelles. Un remerciement tout spécial pour mon Pépé qui m'a toujours impressionné par ses connaissances et sa rigueur scientifique, et avec qui j'ai toujours passé de très bons moments à discuter et échanger sur la science d'aujourd'hui par rapport à la science d'hier.

Enfin, [tack så mycket](#) à Jen d'être à mes côtés, de m'avoir fait découvrir une nouvelle culture, des gens géniaux, une nouvelle manière de penser et voir le monde (c'était pas gagné), d'avoir enduré d'abord la distance puis la rédaction et surtout d'avoir assez cru en notre histoire pour me rejoindre à Paris. Merci de m'avoir ouvert tant de nouveaux horizons et je suis impatient d'aller de l'avant à tes côtés.

INTRODUCTION

1. Organisation et fonction de la chromatine	5
1.1 Organisation nucléaire de la chromatine chez <i>Arabidopsis</i>	5
1.2 Marques et composition de la chromatine	6
2. Mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des états chromatinien	8
2.1 Dynamiques chromatiniennes associées à l'activité transcriptionnelle des gènes.....	8
Etablissement d'un état CS1 : le rôle des complexes COMPASS, SAGA et PAF1	8
L'organisation du module de déubiquitination du complexe SAGA	10
Implication fonctionnelle du DUBm de SAGA sur l'expression des gènes en lien avec la mono-ubiquitination de l'histone H2B	11
Dynamiques impliquant H2Bub et expression des gènes chez les plantes	12
2.2 Mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des états de type Polycomb : les activités PRC2 et PRC1.....	13
2.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des états hétérochromatiniens.....	15
L'hétérochromatine présente un fort enrichissement en méthylation de l'ADN	15
Différentes significations fonctionnelles de l'enlèvement de H2Bub sur les gènes et les régions silencées	16
3. Dynamiques chromatiniennes en réponse aux signaux lumineux chez les plantes	18
3.1 Les voies des signaux lumineux convergent vers des mécanismes chromatinienns.....	18
De nombreuses voies de perception de la lumière convergent vers des mécanismes de régulation de l'expression du génome	18
La photomorphogenèse est activement réprimée en absence de lumière.....	19
La transition skoto/photomorphogénique	21
3.2 Dynamiques chromatiniennes associées à la photomorphogenèse chez <i>Arabidopsis</i>	21
Dynamiques chromatiniennes au niveau des gènes de réponse à la lumière.....	22
Dynamiques chromatiniennes en réponse à la lumière à l'échelle du noyau	23
3.3 Dynamiques chromatiniennes impliquant DET1 et H2Bub chez <i>Arabidopsis</i>	24
Une fonction chromatinienne de DET1	24
4. Objectifs de la thèse	26

RESULTATS PARTIE 1

1. Caractérisation d'un module de déubiquitination de la marque H2Bub chez <i>Arabidopsis thaliana</i>, régulé par la signalisation lumière	28
Contexte	28
1.1 Mise en évidence et caractérisation du module <i>UBP22-AtSGF11-AtSUS1</i> d' <i>Arabidopsis</i>	28
Identification et description des composants d'un DUBm chez <i>Arabidopsis</i>	28
UBP22 interagit avec AtSGF11 et AtSUS1 <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	29
UBP22 est présente dans des complexes de plus haut poids moléculaire	32
Analyse de la structure du DUBm potentiel d' <i>Arabidopsis</i>	32
Conclusion	33
1.2 Etude de la fonction d'UBP22 et du module de type SAGA chez <i>Arabidopsis</i>	34
Les protéines du module <i>UBP22-AtSGF11-AtSUS1</i> sont nucléaires	34
Les protéines UBP22 et AtSGF11 impactent le niveau global de la marque H2Bub.....	34
UBP22 est l'homologue d' <i>Ubp8</i>	36
Conclusion	36
1.3 DET1 impacte le module <i>UBP22-AtSGF11-AtSUS1</i> d' <i>Arabidopsis</i>	36
La stabilité des protéines AtSGF11 et UBP22 est régulée au cours de la photomorphogenèse ..	36
La dégradation de AtSGF11 est influencée par DET1	37
AtSGF11 et UBP22 sont des régulateurs positifs de la fonction de DET1 à l'obscurité	38

Conclusion	39
RESULTATS PARTIE 2	
2. Analyse fonctionnelle des gènes <i>UBP22</i> et <i>UBP26</i>	41
Contexte	41
2.1 Effet synergique d'<i>ubp22</i> et <i>ubp26</i> sur la physiologie, la chromatine et l'expression des gènes	41
Le double mutant <i>ubp22ubp26</i> est affecté dans son développement végétatif.....	41
Le double mutant <i>ubp22ubp26</i> est affecté dans son développement racinaire.....	42
L'effet de la mutation <i>ubp26</i> sur le développement de la graine est aggravé dans <i>ubp22ubp26</i>	42
Impact de la double mutation sur les marques de la chromatine.....	43
Etude de l'expression des gènes dans les lignées mutantes pour <i>UBP22</i> et <i>UBP26</i>	44
L'expression des gènes de l'horloge est affectée dans les mutants <i>ubp22</i> et <i>ubp26</i>	46
Conclusion	46
2.2 Etude des cibles génomiques de l'activité d'<i>UBP22</i> et <i>UBP26</i>.....	47
Etude des gènes gagnant et perdant H2Bub dans les différents génotypes	47
Normalisation des résultats du ChIP-seq.....	49
Conclusion	51
RESULTATS PARTIE 3	
3. Etude de l'influence d'<i>UBP26</i> sur la répression transcriptionnelle	53
Contexte	53
3.1 <i>UBP26</i> forme un ou plusieurs complexes de haut poids moléculaire	53
Conclusion	54
3.2 <i>UBP26</i> influence positivement le dépôt ou le maintien de H3K27me3 à large échelle	55
Un lien possible entre <i>UBP26</i> et H2Bub avec l'établissement ou le maintien de H3K27me3.....	55
Profilage génomique du niveau de H3K27me3 par ChIP-seq.....	56
De nombreux gènes perdent un domaine H3K27me3 dans <i>ubp26</i> et <i>ubp22ubp26</i>	56
L'analyse différentielle des niveaux de H3K27me3 montre que des milliers de gènes sont hypo-	
marqués dans les lignées <i>ubp26</i> et <i>ubp22ubp26</i>	58
Une absence de lien évident entre défaut de déubiquitination de H2Bub et perte de H3K27me3	
.....	59
Conclusions.....	59
3.3 Etude du lien entre la perte de H3K27me3 et les changements d'expression des gènes dans les	60
lignées <i>ubp26</i>.....	60
Conclusion	61
3.3 <i>UBP26</i> affecte l'organisation et la régulation de régions hétérochromatiniennes	62
De nombreux TEs péricentromériques sont dérégulés en absence d' <i>UBP26</i>	62
L'organisation nucléaire est affectée chez <i>ubp26</i>	63
Conclusion	63
DISCUSSION	
4.1 Un module de déubiquitination de type SAGA-DUBm atypique chez <i>A. thaliana</i>	66
4.2 La régulation du DUBm par la signalisation lumière.....	68
4.3 La redondance fonctionnelle partielle entre <i>UBP22</i> et <i>UBP26</i>.....	70
4.4 <i>UBP22</i>, <i>UBP26</i> et la régulation de l'expression des gènes	71
4.5 <i>UBP26</i> et la répression des gènes via une activité Polycomb.....	73
4.6 <i>UBP26</i> et l'hétérochromatine.....	75
4.7 Conclusions	76

MATERIEL ET METHODES

-Matériel végétal	78
-Conditions de culture	78
5.2 Méthodes	79
Phénotypage.....	79
Analyses d'expression.....	80
Analyse des modifications d'histones.....	80
Cytologie.....	82
Analyses bio-informatiques	83
5.3 Buffers.....	84
5.4 Primers	86

REFERENCES

Introduction

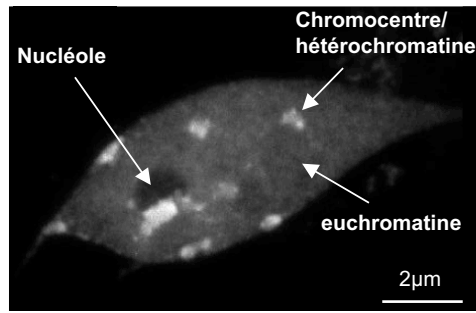
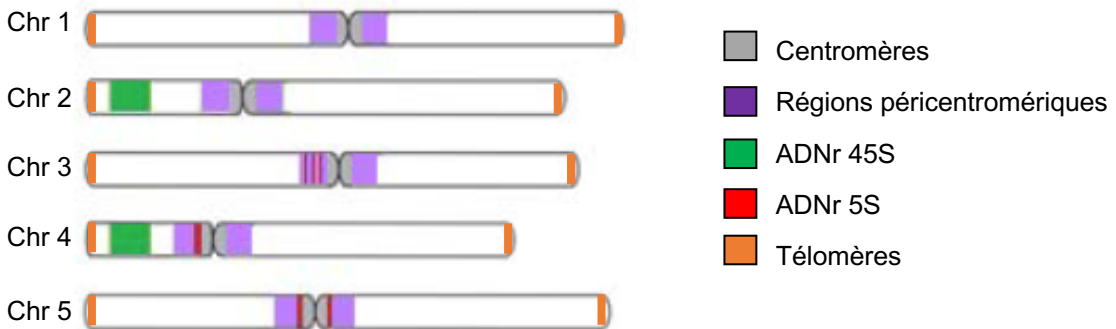


Figure 1. Observation cytologique d'un noyau de mésophile de cotylédon mature d'*Arabidopsis thaliana*

Coloration de l'ADN au DAPI d'un noyau de cotylédon d'*A. thaliana* faisant apparaître les différents chromocentres constituant l'hétérochromatine. L'euchromatine, moins condensée occupe le reste du noyau.

A



B

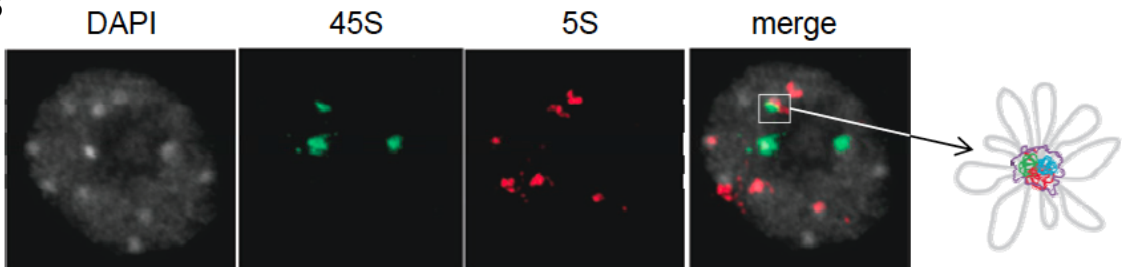


Figure 2. Organisation des régions hétérochromatiniennes

(A) Représentation schématique des cinq chromosomes d'*Arabidopsis* avec la position des régions centromériques, péri-centromériques ainsi que l'ADNr codant les sous unités 45S et 5S des ribosomes (Benoit et al., 2013). (B) Localisation sub-nucléaire des répétitions 45S et 5S par FISH dans des noyaux de plantules de trois semaines. L'ADN est coloré au DAPI. D'après Vasquez et Gadal (2010). Le schéma représente un chromocentre avec les régions condensées au centre (ADNr en rouge et vert, centromères en bleu et péri-centromères en violet) et les boucles d'euchromatines émanant du chromocentre (gris) pour former des territoires chromosomiques. D'après Fransz et De Jong (2011).

1. Organisation et fonction de la chromatine

Du fait de leur mode de vie principalement sessile, les plantes sont des organismes ne pouvant échapper aux changements de leur environnement. Ces organismes disposent d'un très haut niveau de plasticité phénotypique leur permettant de s'adapter rapidement à des changements biotiques et abiotiques très variés. Cette plasticité provient de nombreux mécanismes d'adaptation physiologiques et développementaux qui peuvent avoir lieu durant toute la vie de la plante, notamment lors des transitions développementales, mais aussi à des stades végétatifs avec notamment une régulation continue de la morphogenèse. La plupart de ces réponses adaptatives sont dépendantes de changements de l'expression des gènes nucléaires, mitochondriaux et plastidiaux. Ces adaptations peuvent impliquer une reprogrammation profonde de l'expression du génome au cours de laquelle différents mécanismes chromatinien présents chez les plantes sont mis à contribution pour permettre de moduler l'activité transcriptionnelle et optimiser les changements d'expression de gènes (Pikaard and Scheid, 2014).

1.1 Organisation nucléaire de la chromatine chez *Arabidopsis*

Chez tous les eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines histones formant la chromatine, elle-même organisée fonctionnellement et structurellement au sein du noyau cellulaire. La visualisation de l'ADN par coloration au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dans des noyaux interphasiques de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* met en évidence son organisation en trois types de structures distinctes (Figure 1). Premièrement, 8 à 10 chromocentres en surbrillance caractéristiques de l'ADN très condensé sont visibles à la périphérie du noyau et correspondent à l'hétérochromatine. Deuxièmement, un marquage moins intense permet d'identifier l'euchromatine qui correspond à de l'ADN moins condensé. Enfin, le nucléole contenant l'essentiel des gènes ribosomiques actifs apparaît très peu marqué (Fransz et al., 2002). De nombreuses analyses génétiques et moléculaires ont permis de mieux caractériser la structure et l'activité de ces différents domaines organisationnels (revu dans Fransz and de Jong, 2011; Meier et al., 2017). L'euchromatine comprend la majorité des gènes codant des protéines, ceux-ci pouvant être actifs, inactifs ou encore réprimés. De manière générale l'euchromatine présente des niveaux de condensation assez faibles et représente le siège de la transcription (Figure 2A). Par opposition, l'hétérochromatine fortement compactée et majoritairement répressive à la transcription, contient principalement les éléments répétés du génome décrits ci-dessous :

- Les centromères, formés de courtes séquences répétées de 180pb
- Les régions péri-centromériques très riches en éléments transposables (TE)
- Les régions télomériques formées de répétitions CCCTAAA

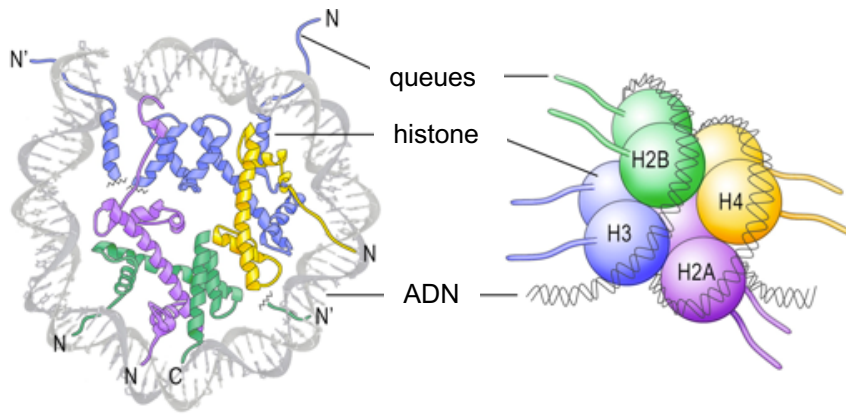


Figure 3. Le nucléosome

Représentation schématique d'un nucléosome. L'octamère d'histone est composé de deux hétérodimères H2A/H2B (violet/vert), deux hétérodimères H3/H4 (bleu/jaune) organisé en tétramères autour duquel s'enroule l'ADN. D'après Gräff et Mansuy (2008).

- Les unités répétées d'ADN ribosomique (ADNr) 45S présentes dans les Régions Organisatrices du Noyau (NOR) sur les chromosomes 2 et 4, ainsi que les copies d'ADNr 5S présentes au niveau des régions péracentromériques des chromosomes 3, 4, et 5.

Le modèle décrit par le Dr Paul Fransz et ses collaborateurs en 2002 (Fransz et al., 2002) propose que certains éléments hétérochromatiniens, tels que des éléments transposables, servent de points d'ancrage hétérochromatiniens dans les chromocentres, induisant ainsi la formation de boucles d'euchromatine émanant des chromocentres (Figure 2B). Ce type de d'organisation participerait à la formation de territoires chromosomique dans le noyau (Fransz and de Jong, 2011).

Chez les métazoaires, la membrane interne du noyau est tapissée par un maillage, appelé lamina, qui s'associe avec certaines régions chromatinienne et permet l'ancrage de différents facteurs et régions chromatinienne appelées Lamina-Associated Domains ou LAs (Strambio-De-Castillia et al., 2010). Les plantes ne possèdent pas de lamines, néanmoins plusieurs études récentes ont révélé l'importance de la périphérie nucléaire chez *Arabidopsis* pour l'organisation du noyau. En effet, les quatre membres de la famille de protéines CROWDED NUCLEI (CRWN1, 2, 3 et 4) pourraient accomplir la fonction des lamines chez *Arabidopsis* et sont impliquées dans le contrôle de la forme des noyaux et l'organisation de l'hétérochromatine (Dittmer et al., 2007). La localisation de certaines des protéines CRWN vers la partie interne de la membrane nucléaire suggère qu'elles pourraient participer à positionner des chromocentres à la périphérie (revu dans Meier et al, 2017).

1.2 Marques et composition de la chromatine

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Chaque nucléosome est composé de deux hétérodimères H2A/H2B et deux hétérodimères H3/H4 organisés en tétramères auxquels viennent s'associer des histones de liaison H1 (Figure 3). L'octamère d'histones sert de support pour l'enroulement de la molécule d'ADN ; chaque nucléosome est entouré de 147 paires de bases d'ADN et est relié au suivant par un fragment d'ADN de liaison dont la taille varie généralement entre 20 et 90 paires de bases suivant l'état de compaction de la chromatine. Chaque nucléosome forme une structure globulaire de laquelle émane les queues amino-terminales de chacune de ses histones (Khorasanizadeh, 2004). De plus, des variants d'histones codés par des gènes distincts peuvent être incorporés lors de la réplication ou de façon indépendante à celle-ci, changer les propriétés locales de la chromatine et ainsi influencer différents mécanismes nucléaires comme la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN (Talbert and Henikoff, 2016).

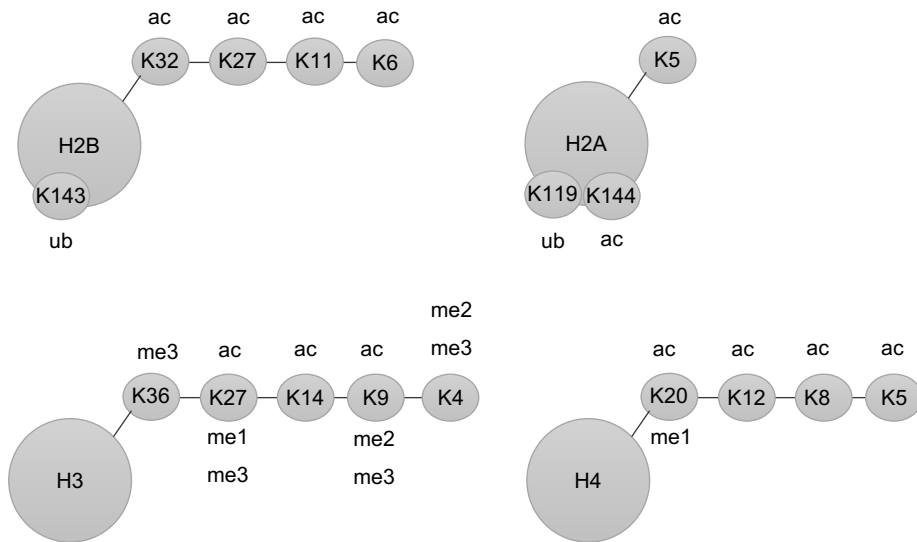


Figure 4. Modifications post-traductionnelles des histones d'*A. thaliana*

Représentation schématique des quatre histones H2A, H2B, H3, H4 et leurs PTMs, l'acétylation (ac) l'ubiquitination (ub) et la méthylation (me) identifiées chez *Arabidopsis thaliana*

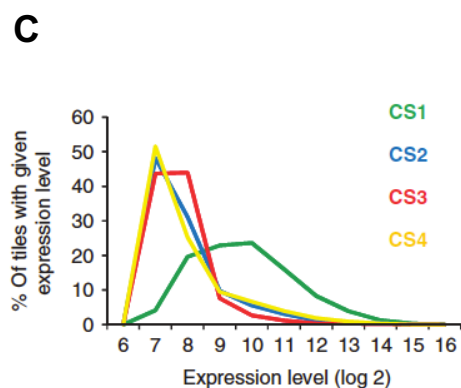
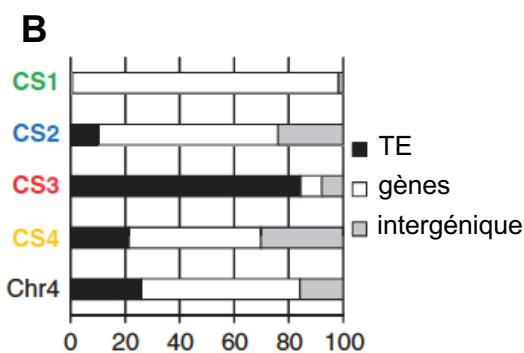
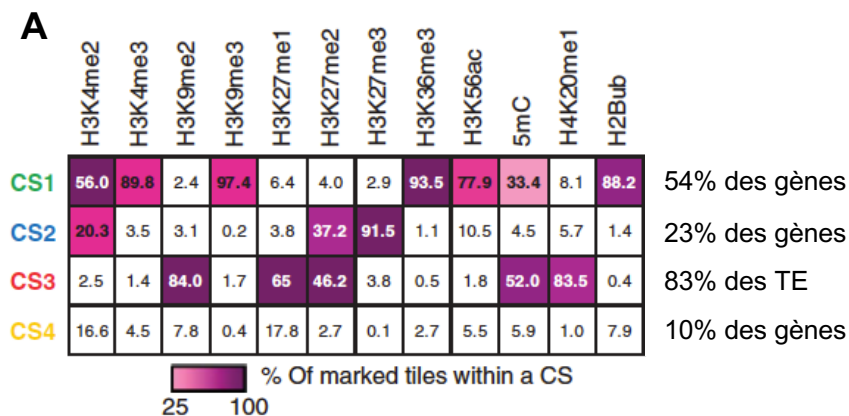


Figure 5. Quatre états principaux de l'organisation de la chromatine chez *Arabidopsis thaliana*

(A) Tableau récapitulatif des quatre états chromatinien principaux déterminés par l'enrichissement d'une douzaine de marques de la chromatine (B) Proportion relative de TEs, gènes et régions intergéniques présents dans chaque état chromatinien. (C) Représentation du niveau d'expression de chaque type d'état chromatinien. D'après Roudier et al., (2011).

De nombreux acides aminés de chaque histone, particulièrement le long des queues N-terminales, peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles (PTMs) (Figure 4) (Rothbart and Strahl, 2014). Ces marques de la chromatine comme l'acétylation, peuvent induire des changements physico-chimiques des histones et modifier directement la structure de la chromatine. Elles peuvent aussi être reconnues par d'autres protéines et influencer l'activité locale du domaine chromatinien. La variation de l'ensemble de ces marques de la chromatine le long du génome forme ainsi l'épigénome : un niveau d'information complémentaire qui se superpose à la séquence de l'ADN et qui se différencie lors de la génération de différents types ou spécialisations cellulaires en réponse à des signaux internes ou externes (Olins and Olins, 2003; Zhou et al., 2011). Les histones peuvent être sujettes à des dizaines de PTMs différentes et les mécanismes et implications fonctionnelles de l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation de résidus lysines, arginines et sérines des queues N-terminales des histones ont été intensivement étudiés (Bannister and Kouzarides, 2011). La mono-ubiquitination des histones H2A et H2B au niveau de leur partie globulaire (H2Aub, H2Bub) a également été très étudiée du fait de leur rôle prédominant dans la répression ou l'activation transcriptionnelle. Comme décrit plus en détail ci-dessous, l'ADN lui-même peut être modifié, par la méthylation des cytosines (Revu dans Law and Jacobsen, 2010). Plusieurs de ces marques peuvent être présentes au niveau d'un même nucléosome ainsi que sur les nucléosomes adjacents et former ainsi des unités fonctionnelles de taille variable caractérisées par une combinaison de marques et s'associant préférentiellement à certaines catégories d'éléments génomiques et niveaux d'expression (Kharchenko et al., 2011; Roudier et al., 2011; Sequeira-Mendes et al., 2014). Les marques d'histones sont abrégées en écrivant d'abord l'histone modifiée, puis le résidu modifié, ensuite le type de modification et enfin le nombre de fois que cette modification est ajoutée. Par exemple, la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 s'écrit H3K4me3 et la mono-ubiquitination de l'histone H2B s'écrit H2Bub. Chez *Arabidopsis*, l'analyse de la distribution génomique d'une douzaine de marques chromatiniennes a permis de définir quatre états chromatiniens principaux annotés signatures chromatiniennes CS1 à CS4 qui couvrent plus de 80% du génome et sont caractéristiques des différents états fonctionnels de la chromatine (Figure 5) (Roudier et al., 2011)

- CS1 est enrichi en H3K4me2/3, H3K36me3, H3K9me3, H3K56ac et H2Bub. Il est caractéristique des gènes exprimés.
- CS2 est enrichi en H3K27me3 et correspond à des gènes réprimés par une activité de type *Polycomb*.
- CS3 enrichi en H3K9me2, H3K27me1, H4K20me1 et en méthylation de l'ADN dans tous les contextes de séquence et est principalement présent sur les séquences réprimées telles que les séquences répétées et les éléments transposables.

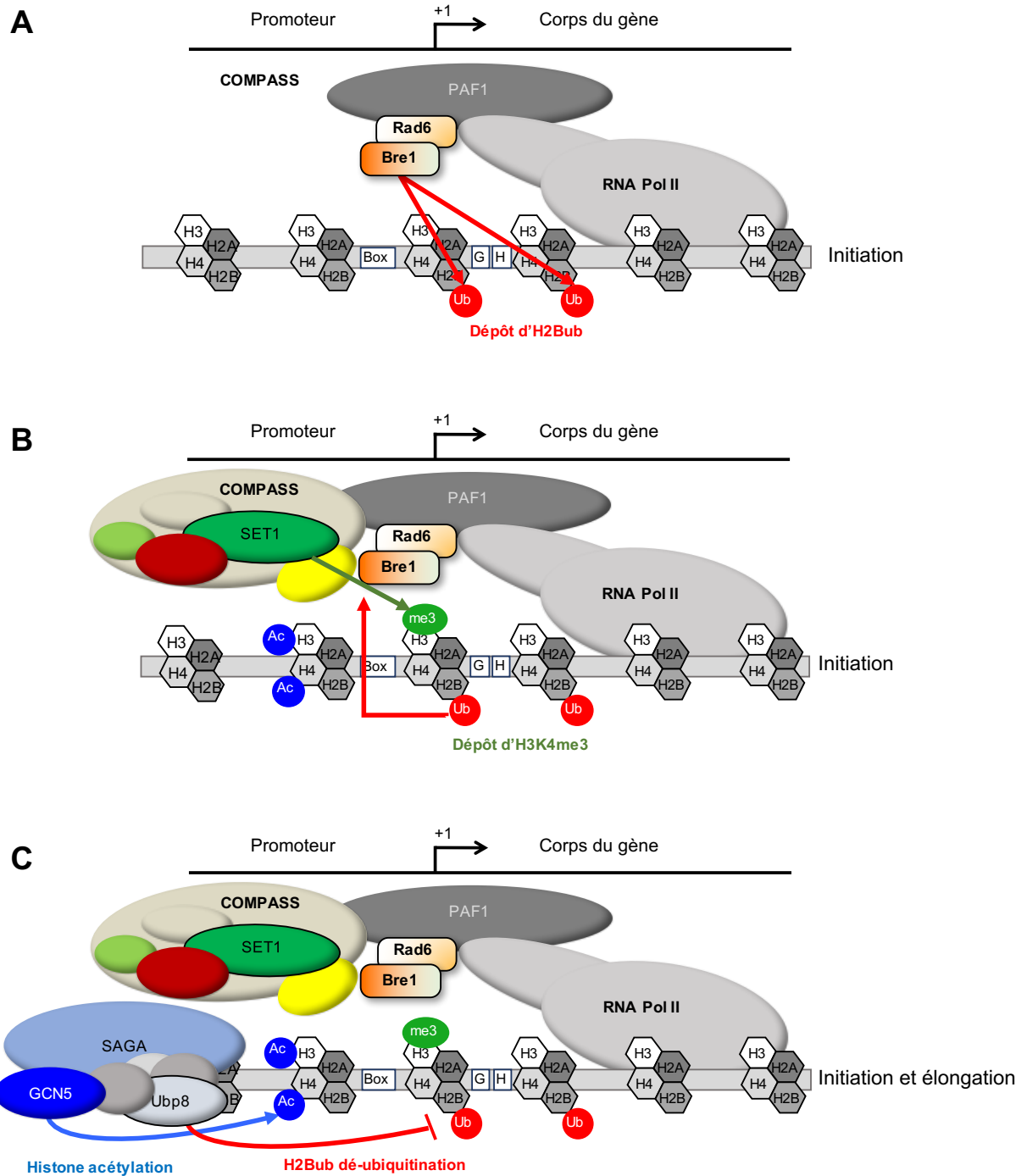


Figure 6. Un cycle d'ubiquitination/déubiquitination de l'histone H2Bub au cours de la transcription chez *S. cerevisiae*

(A) Lors de l'initiation de la transcription, le recrutement du complexe PAF1 va permettre à Rad6 et Bre1 de déposer H2Bub. (B) La déposition d'H2Bub permet ensuite au complexe COMPASS via sa sous-unité Set1 de déposer H3K4me3 sur le nucléosome +1. (C) Afin d'effectuer la transition entre l'initiation et l'élongation de la transcription, le complexe SAGA est recruté et catalyse d'une part l'enlèvement d'H2Bub via sa sous-unité ubiquitine protéase Ubp8 et d'autre part l'acétylation des histones H3 et H4 par la sous-unité GCN5. Le complexe SAGA suit l'ARN Pol II lors de l'élongation, créant un cycle de dépôt et d'enlèvement d'H2Bub favorisant la processivité de l'ARN polymérase. D'après Weake et Workman (2008).

- CS4 ne possède aucune marque majoritaire et est fréquemment associé aux régions intergéniques ainsi qu'aux gènes peu exprimés.

Un type d'organisation de la chromatine très similaire comprenant 5 états principaux a aussi été proposé chez la drosophile (Filion et al., 2010). La répartition de ces états chromatiniens le long du génome montre un découpage en domaines correspondant au statut fonctionnel des différentes unités transcriptionnelles (Figure 5). Une analyse combinatoire affinée par la suite permis de distinguer des sous-types d'états chromatiniens avec des distributions génomiques plus fines (Sequeira-Mendes et al., 2014).

La définition de ces états chromatiniens obtenu sur des plantules entières a permis d'établir un épigénome de référence (Roudier et al., 2011; Sequeira-Mendes et al., 2014) mais la chromatine est très dynamique, le dépôt de chaque marque étant réversible par des mécanismes actifs d'enlèvement de la marque par l'éviction et l'incorporation de nouvelles histones, ou de façon passive lors de la réplication.

2. Mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des états chromatiniens

2.1 Dynamiques chromatiniennes associées à l'activité transcriptionnelle des gènes

L'établissement de l'état chromatinien CS1 implique le dépôt réversible de nombreuses marques chromatiniennes telles que H3K4me3, H3K36me3, H2Bub, et l'acétylation de H3 et H4 à plusieurs résidus. L'établissement et le maintien de cet état chromatinien caractéristique des gènes exprimés impliquent différents mécanismes de dépôt mais aussi un équilibre avec les mécanismes d'enlèvement de la marque H2Bub, comme expliqué ci-dessous.

Etablissement d'un état CS1 : le rôle des complexes COMPASS, SAGA et PAF1

La dynamique d'établissement de l'état de type CS1 et son lien avec la transcription ont été caractérisés en détail chez l'espèce modèle de levure *S. cerevisiae* (Weake and Workman, 2008). Ce qui a permis de montrer que l'établissement d'un état CS1 résulte de l'action séquentielle de différentes activités de modification de la chromatine qui est initiée lors de l'activation de la transcription suivant un modèle dynamique décrit ci-dessous (Figure 6).

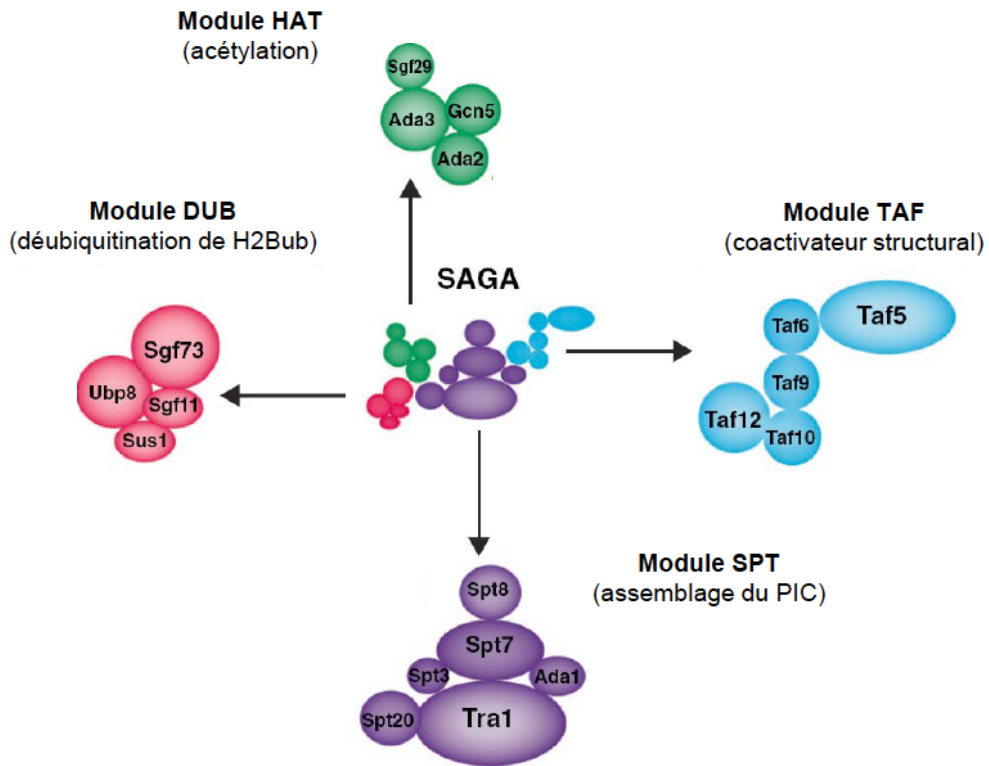


Figure 7. Les quatre modules du complexe SAGA chez *S. cerevisiae*

Les 21 sous-unités du complexe SAGA de *S. cerevisiae* sont organisées en quatre modules distincts indiqués par un code couleur : le module HAT (histone acetyltransferase), DUB (deubiquitination), SPT (Suppressor of Ty element) et TAF (TATA binding protein-associated factor). La position des différentes protéines entre elles s'appuie sur des données d'interactions protéiques. D'après Samara and Wolberger, (2011).

L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II induite par phosphorylation de la sérine 5 de son domaine C-terminal permet l'association du complexe Polymerase Associated Factor1 (PAF1) au site d'initiation de la transcription. PAF1 permet à l'ubiquitine E2 conjuguase Rad6 et à l'E3 ubiquitine ligase Bre1 de mono-ubiquitiner l'histone H2B sur sa lysine 123 (Figure 6A) (Hwang et al., 2003; Wood et al., 2003). En effet, le dépôt d'une ubiquitine, un peptide de 76 acides aminés, nécessite trois étapes. Tout d'abord une activation ATP-dépendante de l'ubiquitine par une enzyme E1. Une enzyme de conjugaison E2 prend ensuite en charge l'ubiquitine, et enfin une enzyme E3 ligase détermine la spécificité du substrat et lie l'ubiquitine de manière covalente à une lysine (Hochstrasser, 1996). H2Bub permet dans un second temps le recrutement de COMplex of Proteins ASSociated with SET1 (COMPASS) pour déposer la marque H3K4me3 *via* sa sous-unité histone méthyltransférase Set1 (Ruthenburg et al., 2007), menant au recrutement d'autres facteurs impliqués dans la machinerie transcriptionnelle (Vermeulen et al., 2007). De plus, le dépôt de H2Bub permet également à l'histone méthyltransférase Dot1 de catalyser le dépôt de H3K79me3, une marque associée à la transcription qui n'est pas présente chez *Arabidopsis*. Ainsi chez cette espèce, le dépôt de H2Bub est un prérequis à la triméthylation de H3K4 et de H3K79 (Figure 6B) (Sun and Allis, 2002). Ce crosstalk *trans*-histone strict entre deux marques de la chromatine a donné naissance à la notion de code histone (Sun and Allis, 2002).

Chez la drosophile, des homologues de ScSet1 sont les histones méthyltransférases dSET1, Trithorax (Trx) et Trithorax-related (Trr) capables de former trois complexes COMPASS-like distincts capables de méthyler H3K4 (Mohan et al., 2011). Chez l'humain, les homologues de ScSet1 sont hSet1A/B et les protéines Mixed Lineage Leukemia 1 à 5 (MLL1-5), qui forment trois types de complexes COMPASS-like (hSET1A/B, MLL1/2 et MLL3/4) (Eissenberg and Shilatifard, 2009). De manière intéressante, le cross-talk entre le dépôt de H2Bub et H3K4me3 est très conservé chez l'humain (Shilatifard, 2006) et chez certaines lignées cellulaires de drosophile (Smith and Shilatifard, 2009).

Le dépôt de H2Bub est un évènement transitoire dans le processus de transcription. En effet le complexe Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) de *S. cerevisiae* est composé de quatre sous-complexes qui possèdent plusieurs fonctions dont deux activités enzymatiques de modification de la chromatine, permettant *in fine* une activation et une élongation optimale de la transcription (Figure 7) (Samara and Wolberger, 2011). SAGA est un complexe gigantesque qui est recruté au niveau du promoteur des gènes lors de la transition entre les phases d'initiation et d'élongation de la transcription. Le module SPT (Suppressor of Ty element) permet d'organiser le complexe SAGA, le module TAF (TATA binding protein-associated factor) est un co-activateur structural et le module de

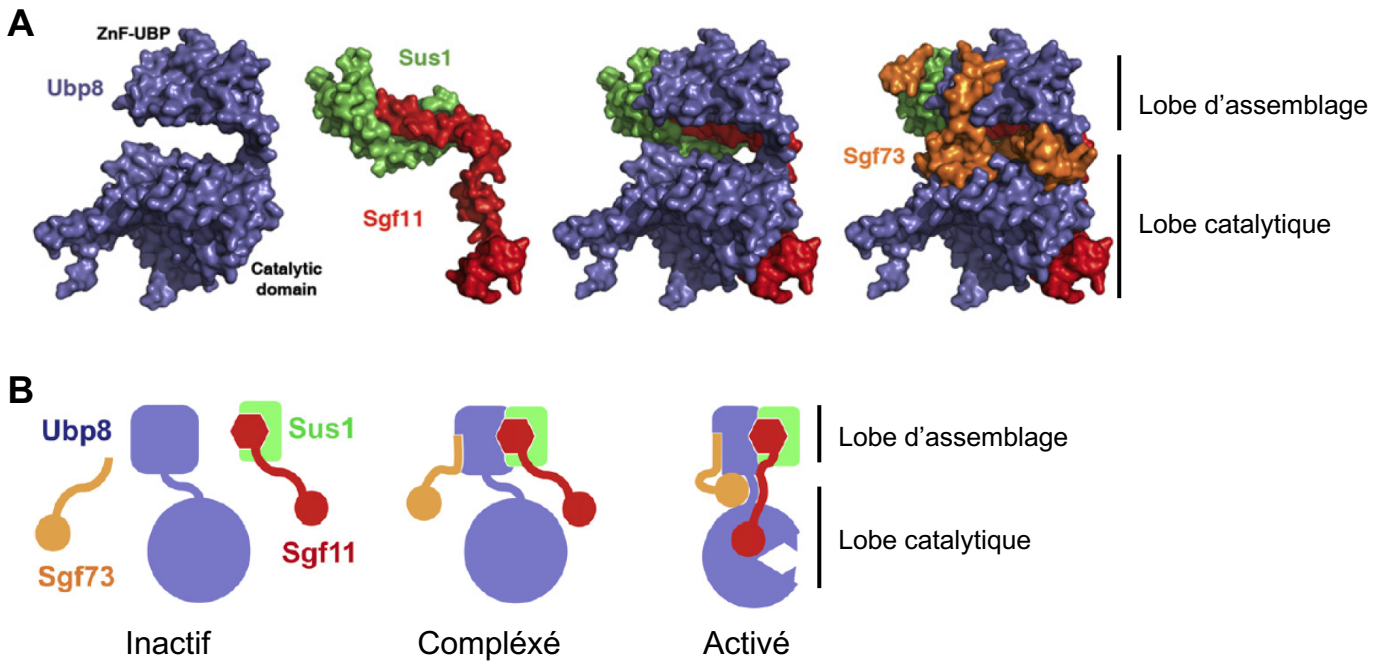


Figure 8. Structure du DUBm de *S. cerevisiae*

(A) Représentation de surface des différentes sous-unités du DUBm de SAGA et leurs interactions. (B) Le domaine doigt de zinc (ZnF) d'Ubp8 (carré violet) interagit avec l'hélice N-terminale de Sgf11 (hexagone rouge) et le tout est encapsulé par Sus1. Les ZnF de Sgf11 (cercle rouge) et de Sgf73 (cercle orange) sont nécessaires pour que Ubp8 puisse être activé. D'après Köhler et al., (2010).

déubiquitination (DUBm) composé des protéines Sgf11, Sus1 et Sgf73 et de la sous-unité catalytique ubiquitine-protéase Ubp8 permet la déubiquitination de l'histone H2Bub (Henry et al., 2003; Köhler et al., 2006; Lee et al., 2009). De la même manière que son dépôt, l'enlèvement de H2Bub est impliqué dans la transcription des gènes en recrutant notamment la kinase Ctk1 qui phosphoryle l'ARN polymérase sur sa sérine-2, modification associée à l'élongation de la transcription, Ubp8 accompagne également l'ARN polymérase durant l'élongation (Figure 6C) (Wyce et al., 2007). Des cycles d'ubiquitination/déubiquitination tout au long de la transcription faciliteraient la processivité de la polymérase au travers des barrières nucléosomales.

Pour finir, le module HAT (Histone AcetylTransferase) du complexe SAGA comprend l'acétyltransférase General Control Non-repressible 5 (GCN5) (Grant et al., 1999; Kuo et al., 1998). L'acétylation des histones permet de modifier leur charge et de distendre leur interaction avec l'ADN, favorisant ainsi un état décondensé facilitant à son tour le recrutement de l'ARN polymérase II et le dépôt de la marque H3K4me3 (Govind et al., 2007). Ce module est conservé chez l'humain mais aussi chez les plantes, organismes dans lesquels GCN5 est étudiée pour son implication dans la régulation des gènes lors de réponses adaptatives (Moraga and Aquea, 2015). Chez Arabidopsis, GCN5 cible principalement H3 et H4 et dans une moindre mesure H2A et H2B (Earley et al., 2007). Des plantes un mutantes hypomorphes pour *GCN5* ont des niveaux réduits d'acétylation de H3 et H4 en particulier sur les gènes de réponse à la lumière et l'expression de ces gènes est réduite dans ce mutant (Benhamed et al., 2006).

L'organisation du module de déubiquitination du complexe SAGA

Le DUBm est composé de deux lobes : le lobe d'assemblage et le lobe catalytique organisés respectivement autour d'un domaine en doigt de zinc et du domaine Ubiquitin Protease (UBP) d'Ubp8 (Figure 8). Le lobe d'assemblage du module est formé par l'interaction du doigt de zinc d'Ubp8 avec la longue hélice N-terminale de Sgf11. Cette interaction est stabilisée par Sus1 qui encapsule l'hélice de Sgf11 à Ubp8. Le lobe catalytique est constitué du domaine UBP d'Ubp8 et du domaine en doigt de zinc de Sgf11. Les 104 premiers acides aminés de la protéine Sgf73 sont situés entre les deux lobes, avec un doigt de zinc lié au domaine UBP d'Ubp8. Le reste de la protéine Sgf73 permet de lier le DUBm au complexe SAGA (Durand et al., 2014; Köhler et al., 2010; Lee et al., 2009; Samara et al., 2010).

L'activité de déubiquitination d'Ubp8 est dépendante de son association avec les trois autres protéines du DUBm (Lee et al., 2005). En effet, l'analyse structurale de ce module par surexpression et purification des différentes protéines de *S. cerevisiae* puis cristallisation avec et sans un peptide ubiquitine (Figure 8) a révélé que chacune des quatre protéines interagit avec les trois autres pour

A

<i>S. cerevisiae</i>	Drosophile	Humain	<i>A. thaliana</i>
Sus1	E(y)2	ENY2	nd
Sgf11	Sgf11	ATXN7L3	nd
Sgf73	Ataxin7	ATXN7L3	nd
Ubp8	Nonstop	USP22	nd

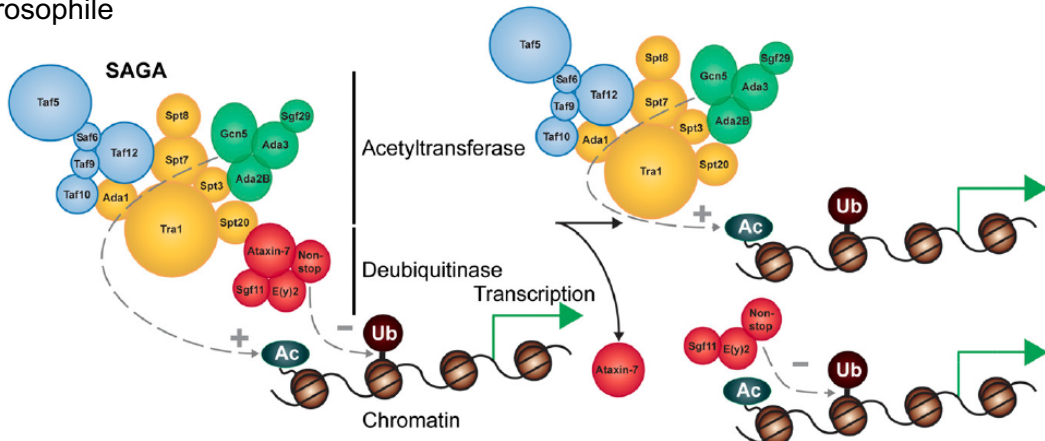
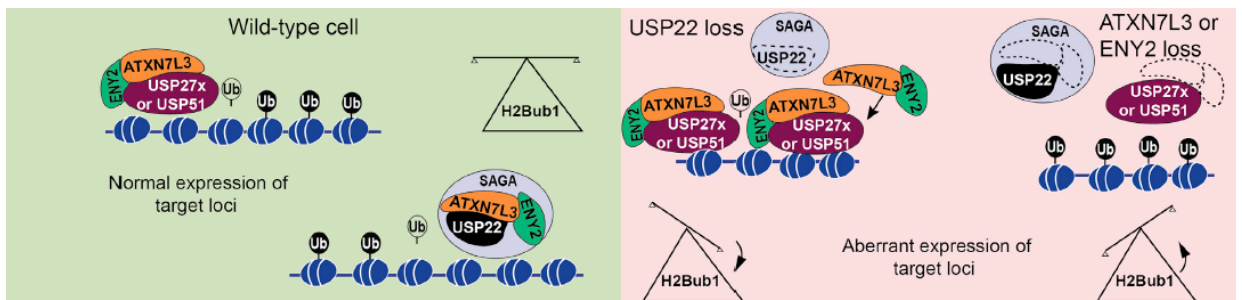
B Drosophile**C Humain**

Figure 9. La déubiquitination d'H2Bub par des complexes SAGA chez l'humain et la drosophile
(A) Tableau récapitulatif des composants du DUBm chez *S. cerevisiae* et leurs homologues caractérisés chez l'Humain, la Drosophile et non déterminés (nd) chez les plantes. **(B)** déubiquitination d'H2Bub chez la drosophile par la protéine Nonstop au sein du DUBm lié au complexe SAGA. Contrairement à la levure, la perte de la protéine ATXN7 liant le DUB à SAGA (homologue Sgf73 chez la levure) entraîne la formation d'un DUBm indépendant et actif. D'après Mohan et al., (2013). **(C)** Mécanisme de déubiquitination d'H2Bub chez l'humain par USP22 au sein du DUBm lié à SAGA et par USP27 et USP51, en compétition avec USP22 pour interagir avec ATXN7L3 et ENY2 et former d'autres types de DUBm. D'après Atanassov et al., (2015).

former un ensemble très compact (Köhler et al., 2010; Samara et al., 2010). L'organisation et l'activité de ce module sont donc centrés sur les différents doigts de zinc (ZnF) d'Ubp8 et de Sgf73, ce qui est mis en évidence par l'observation que la délétion du ZnF d'Ubp8 perturbe l'assemblage de l'ensemble du module (Köhler et al., 2010). Le domaine en doigt de zinc de Sgf11 permet le bon repliement des deux lobes du module et interagit avec l'ADN nucléosomal permettant à Ubp8 de débubiquitiner H2Bub (Köhler et al., 2014; Samara et al., 2012). Pour finir, le ZnF de Sgf73 est essentiel pour l'activité enzymatique d'Ubp8 et agit en synergie avec le ZnF de Sgf11 (Köhler et al., 2010).

Implication fonctionnelle du DUBm de SAGA sur l'expression des gènes en lien avec la mono-ubiquitination de l'histone H2B

Alors que la poly-ubiquitination sert généralement de mécanisme d'adressage des protéines au protéasome pour leur dégradation, la mono-ubiquitination a plutôt une fonction de signalisation et/ou de modification des propriétés physico-chimiques de la protéine cible (Sadowski et al., 2012). L'ubiquitine a un poids moléculaire d'environ 8,5 kDa ce qui représente plus d'un tiers de celui d'une protéine histone H2B. L'ajout d'une modification si imposante au sein du nucléosome inhibe la compaction de la chromatine *in vitro* (Fierz et al., 2011) et facilite le réassemblage des nucléosomes lors de l'élongation de la transcription (Batta et al., 2011; Fleming et al., 2008). Chez les espèces où la mono-ubiquitination de l'histone H2B a été étudiée, cette marque est présente sur la plupart des gènes transcrits (Bonnet et al., 2014). L'ensemble des machineries permettant des dynamiques de dépôt et enlèvement de H2Bub est également conservée chez de nombreux eucaryotes (Figure 9A). Le DUBm présent chez la drosophile est similaire à celui de *S. cerevisiae* (Figure 9B). L'ubiquitine protéase Nonstop débubiquitine H2Bub au niveau des gènes et interagit avec Sgf11, E(y)2 et Atxn7, homologues respectifs de ScSgf11, ScSus1 et ScSgf73. De façon paradoxale, chez cet organisme la perte de fonction du gène codant Atxn7 conduit à une baisse du niveau de H2Bub. En effet, sans Atxn7 Nonstop reste capable de débubiquitiner H2Bub et n'est plus limité aux cibles du complexe SAGA. Cette suractivité conduit à des dégénérationes neurales et rétinales, une réduction des mouvements et une mortalité précoce chez la drosophile (Mohan et al., 2014).

Chez l'humain, les homologues d'Ubp8, Sgf11, Sgf73 et Sus1 ont été caractérisés et portent les noms respectifs de USP22, ATXN7L3, ATXN7 et ENY2 (Lan et al., 2015 ; Zhang et al., 2008b ; Zhao et al., 2008). Une étude récente montre qu'à l'inverse d'un mutant de levure $\Delta ubp8$, une mutation nulle *usp22* conduit également à une baisse du niveau global de H2Bub, ce résultat contre-intuitif est dû à la compétition entre diverses UBPs pour s'associer avec ATXN7L3 et ENY2 (Figure 9C). En effet, en plus de l'association avec USP22 au sein du DUBm, ATXN7 et ENY2 peuvent s'associer avec USP51 ou

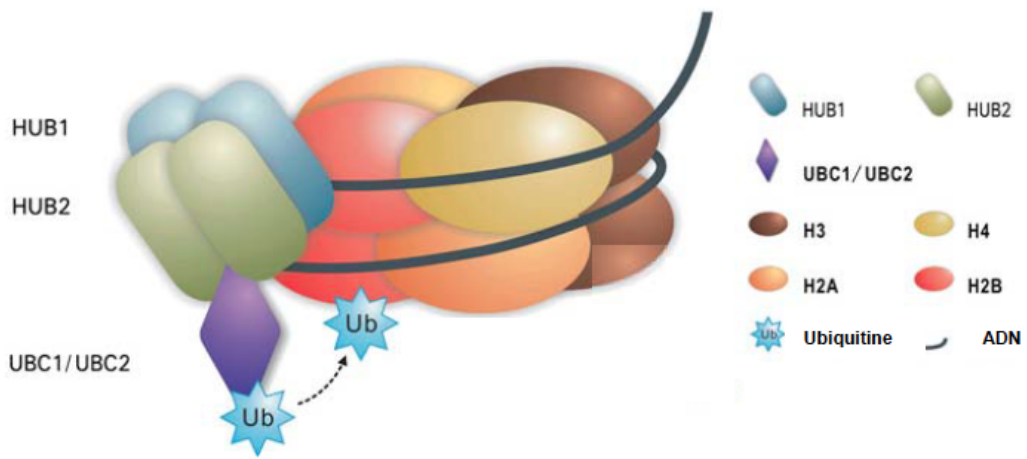


Figure 10. Mécanisme de déposition d'H2Bub chez *A. thaliana*

UBC1 et UBC2 sont deux ubiquitine ligase redondantes. HUB1 et HUB2 forment une E3 ubiquitine ligase, fonctionnant en hétérotétramère qui est responsable de la spécificité du substrat. Ces protéines permettent donc la déposition de la molécule d'ubiquitine sur la lysine 143 ou une position homologue des différentes isoformes de l'histone H2B chez Arabidopsis. D'après Cao et al., (2008).

USP27X indépendamment de SAGA pour déubiquitiner l'histone H2Bub et réguler l'expression de gènes. La perte de fonction du gène *USP22* empêche la formation du DUBm, augmentant la disponibilité de ATXN7L3/ENY2 pour USP51 et USP27X. Il est intéressant de noter que la surabondance des complexes ATXN7L3/ENY2/USP27X/USP51 augmente la déubiquitination de H2Bub et produit une baisse du niveau global de cette marque (Atanassov et al., 2016). Chez l'humain, le gène *USP22* est surexprimé dans plusieurs cancers très agressifs et le ciblage de cette protéine est envisagé pour permettre de ralentir le développement de nombreux cancers (Kim et al., 2017; Li et al., 2017; Zhang et al., 2017).

Pour finir, il est important de noter que malgré l'activité d'enlèvement de H2Bub du DUBm sur la majorité des gènes transcrits, des analyses transcriptomiques indiquent que l'expression de peu de gènes est altérée après perte de fonction de ces mécanismes chromatinien. Par exemple chez *S. cerevisiae*, une lignée $\Delta ubp8$ affecte l'expression de seulement 34 gènes (Gardner et al., 2005). De même, contrairement au rôle attendu sur la globalité des gènes transcrits, seulement 987 gènes sont dérégulés dans un mutant nul *nonstop* chez la larve de drosophile et chez l'humain 1323 gènes dans une lignée cellulaire mutante *usp22* (Atanassov et al., 2016; Weake et al., 2008). Il a été proposé que ces mécanismes soient davantage déterminants lors du changement du niveau d'expression des gènes, comme suggéré au cours du développement de la drosophile par des comparaisons tissu-spécifiques (Weake and Workman, 2011).

Dynamiques impliquant H2Bub et expression des gènes chez les plantes

Le mécanisme de dépôt de la marque H2Bub est présent chez les plantes et particulièrement bien caractérisé chez *A. thaliana* et plus récemment chez le riz (Cao et al., 2015). Le génome d'*Arabidopsis* code trois homologues de Rad6 qui sont les gènes *Ubiquitine Conjugase 1, 2 et 3* (*UBC1/2 et 3*) et la fonction d'ubiquitine ligase de Bre1 est portée par un hétéro-tétramère formé des protéines Histone Ubiquitination 1 et 2 (*HUB1/2*) (Figure 10). La perte de fonction de *UBC1* et *UBC2* ou d'un seul des deux gènes *HUB1* ou *HUB2* entraîne une perte totale de H2Bub (Cao et al., 2008; Liu et al., 2007). Ce système est donc le seul responsable du dépôt de H2Bub chez *Arabidopsis*. Chez *Arabidopsis*, *HUB1* est impliqué dans différentes réponses adaptatives telles que la résistance aux infections fongiques nécrotrophiques (Dhawan et al., 2009). D'autre part, grâce à un mutant nul pour *HUB1*, le laboratoire a montré que le dépôt de H2Bub est nécessaire pour la cinétique d'induction de centaines de gènes de réponse à la lumière (Bourbousse et al., 2012). Le dépôt de cette marque est également nécessaire à la modulation de l'expression des gènes centraux de l'horloge circadienne (Bourbousse et al., 2012;

Himanen et al., 2012). D'autre part la protéine Dot1 n'a pas d'orthologue chez Arabidopsis, ce qui est cohérent avec l'absence de détection la marque H3K79me3 chez les plantes.

Contrairement aux mécanismes de dépôt de H2Bub, la compréhension des voies d'enlèvement de H2Bub est encore fragmentaire chez Arabidopsis. A ce jour deux enzymes de dé-ubiquitination ont été identifiées, UBIQUITIN PROTEASE 26 (UBP26 ; Sridhar et al., 2007) et Otubain-Like Deubiquitinase 1 (OTLD1 ; Krichevsky et al., 2011) mais ces deux protéines ne semblent pas impliquées dans un mécanisme de type SAGA. UB26 et OTLD1 ont été impliquées dans la déubiquitination de H2Bub dans un contexte hétérochromatinien, mais alors que UB26 possède un domaine caractéristique UBP (Sridhar et al., 2007), OTLD1 peut déubiquitiner H2Bub *via* un domaine appelé OTU (Ovarian tumor like ; Krichevsky et al., 2011). Leur activité est principalement liée à une répression transcriptionnelle, et sera décrite ci-dessous dans la section 2.3 décrivant le contrôle des états hétérochromatiniens. De façon générale, les mécanismes de déubiquitination de H2Bub en lien avec l'activité de transcription des gènes sont peu compris. Comme indiqué précédemment, la sous-unité GCN5 de SAGA a été identifiée chez les plantes et son rôle dans l'acétylation des histones a été bien confirmé (Servet et al., 2010). Plusieurs sous-unités centrales d'un complexe de type SAGA telles que ADA2 et ADA3 sont également conservées chez Arabidopsis (Hark et al., 2009; Srivastava et al., 2015). En revanche, aucun homologue de Ubp8/USP22 n'a encore été caractérisé chez les plantes. Le génome d'Arabidopsis code au moins 27 protéines possédant un domaine UBP responsable de l'activité enzymatique (Yan et al., 2000). Des analyses phylogénétiques publiées au cours de ma thèse ont récemment permis d'identifier des orthologues d'Ubp8, Sgf11 et Sus1 chez Arabidopsis (Moraga and Aquea, 2015; Srivastava et al., 2015) et l'analyse de leur fonction ainsi que l'existence potentielle d'un DUBm de type SAGA sont décrites dans les chapitres de résultats de cette thèse.

2.2 Mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des états de type *Polycomb* : les activités PRC2 et PRC1

L'état CS2 est observé sur des gènes réprimés et est caractérisé par un fort enrichissement de la marque H3K27me3 au niveau de leur région promotrice et également le plus souvent de leur région transcrite (Roudier et al., 2011; Zhang et al., 2007). La triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 est effectuée par une activité de type Polycomb Repressive Complex-2 (PRC2). Les activités de type *Polycomb* (PcG) ont initialement été mises en évidence chez la Drosophile par leur rôle dans la régulation des gènes homéotiques au cours du développement (Lewis, 1978). Le complexe PRC2 de Drosophile est composé des protéines E(z) (Enhancer of zeste) qui catalyse la triméthylation, Su(z)12 (Suppressor of zeste 12) associée aux trois protéines Esc (Extra Sex Comb) et Nurf55 (ou P55

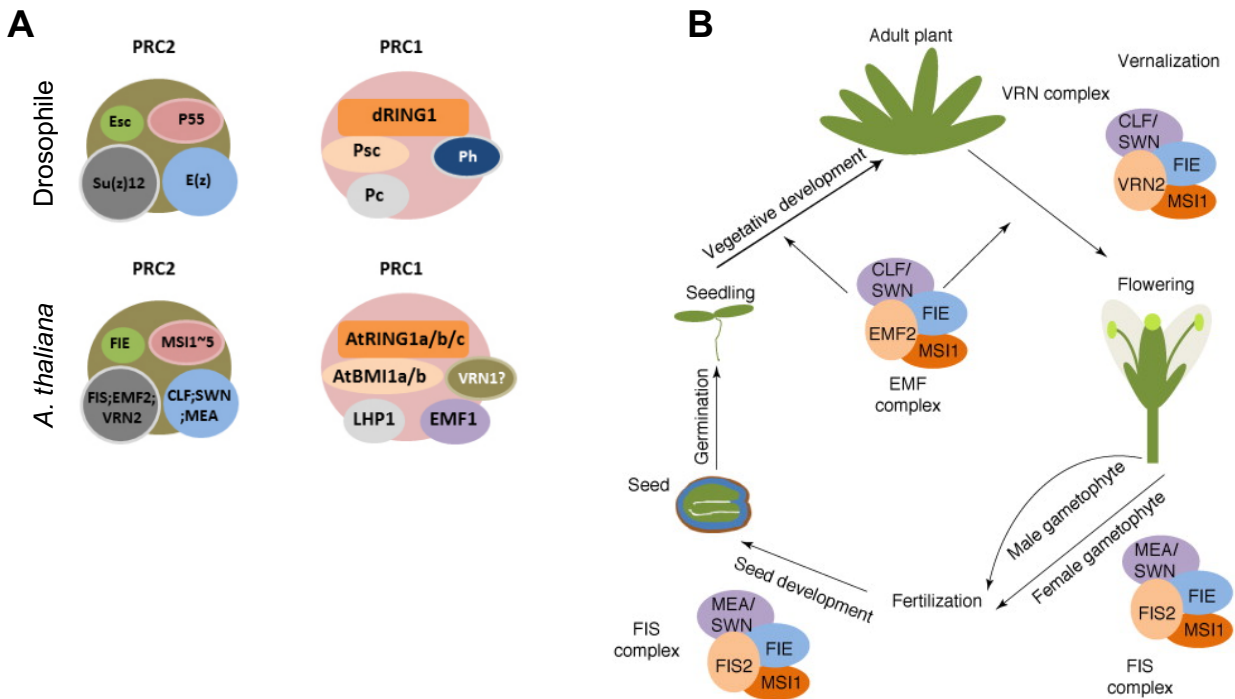


Figure 11. Diversité des complexes PRC2 chez *A. thaliana* et leur implication dans différentes étapes du développement.

(A) Représentation schématique des protéines composant les complexes PRC2 et PRC1 chez la drosophile et Arabidopsis. (B) Représentation schématique des trois complexes PRC2 présents chez Arabidopsis et différentes étapes du développement qu'ils participent à réguler. D'après Kim et Sung, (2014) ; Derkacheva et Hennig, (2014).

Nucleosome-remodeling factor) (Czermin et al., 2002). Les gènes codant ces protéines sont très conservés chez les plantes (Figure 11A) (Kim and Sung, 2014). Le génome d'*Arabidopsis* comprend trois gènes codant des protéines de type E(z) avec des profils d'expression très distincts : *CURLY LEAF (CLF)*, *SWINGER (SWN)*, et *MEDEA (MEA)*, ainsi que pour Su(z)₁₂ : *EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2)*, *VERNALIZATION 2 (VRN2)*, *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2 (FIS2)*. Enfin, un gène de la famille multigénique *MULTI-SUBUNIT SUPPRESSOR OF IRA 1–5 (MSI1-5)* est l'homologue de *Nurf55* et *FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)* est l'homologue d'*Esc* (Figure 11A) (Kim and Sung, 2014).

L'ensemble des protéines PRC2 d'*Arabidopsis* permet de former trois types de complexes qui diffèrent notamment par leur élément Su(z) (Figure 11B). Les protéines MSI1 et FIE sont présentes dans tous les complexes PRC2. FIS2 et MEA sont exprimées exclusivement dans le gamétophyte femelle et la graine et sont impliqués dans le développement des graines, notamment en inhibant le développement de l'endosperme avant la fertilisation (Kohler et al., 2003). Les complexes PRC2 contenant EMF2 ou VRN2 sont partiellement redondants et essentiels pour le développement des plantes en participant notamment à la différenciation cellulaire (Bouyer et al., 2011; Lafos et al., 2011; Schubert et al., 2005). On peut distinguer l'effet de EMF2 sur le développement du sporophyte et celui de VRN2 sur la transition florale en réponse à la vernalisation *via* la répression du gène *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (De Lucia et al., 2008). L'ensemble des complexes PRC2 permet un dépôt de H3K27me₃ variant en fonction du type cellulaire, au cours du développement et en réponse à des facteurs de l'environnement (Hennig and Derkacheva, 2009; Roudier et al., 2011; Weinhofer et al., 2010).

Chez la *Drosophile*, le dépôt de la marque H3K27me₃ par PRC2 précède généralement la mono-ubiquitination de l'histone H2A par le complexe PRC1 (Kim and Sung, 2014). Le complexe PRC1 est composé des protéines Posterior sex combs (Psc), *drosophila* RING (dRING), Polyhomeotic (Ph), et Polycomb (Pc). Les protéines Psc et dRING catalysent la mono-ubiquitination de l'histone H2A (H2Aub). Comme vu précédemment pour H2Bub, cette ubiquitination ne mène pas à la dégradation protéasomale de l'histone mais est en revanche associée à la compaction de la chromatine et une forte répression de la transcription (Wang et al., 2004; Weake and Workman, 2008).

Chez *Arabidopsis*, les homologues de Psc et dRING sont respectivement les trois membres a, b et c de la famille AtBMI1 et les membres a et b de la famille AtRING1 (Figure 11A). Ces différents complexes de type PRC1 permettent également la mono-ubiquitination d'histones H2A, bien que cette marque n'ait pas été détectée par spectrométrie de masse chez les plantes (Bratzel et al., 2010; Molitor and Shen, 2013). A ce jour, les liens séquentiels et fonctionnels entre le dépôt de H3K27me₃ et celui

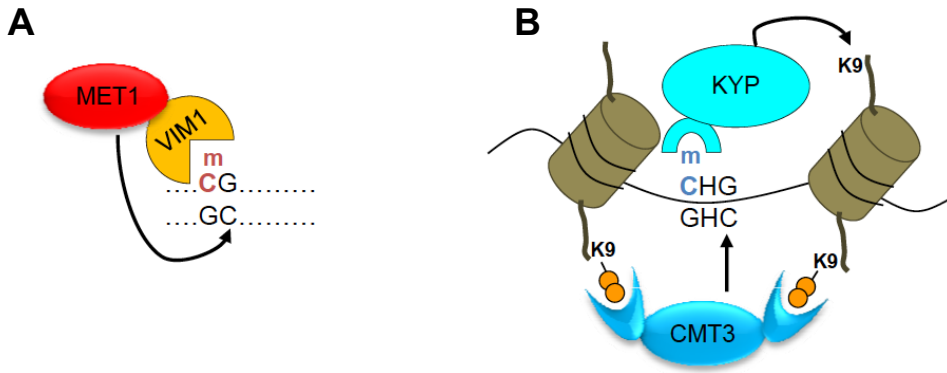


Figure 12. Représentation schématique de la maintenance de la méthylation CG et CHG chez Arabidopsis. D'après Woo et al., (2007).

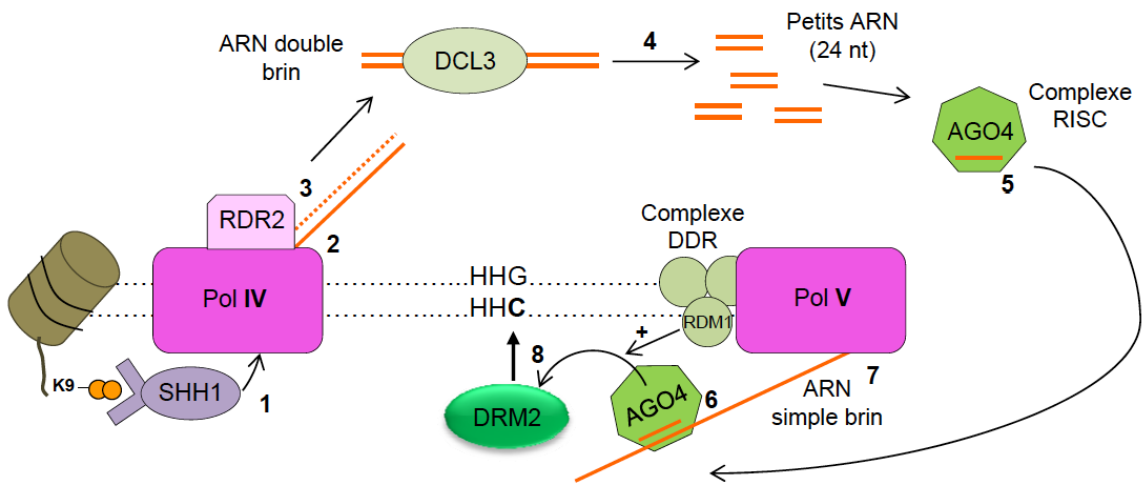


Figure 13. Représentation schématique du mécanisme moléculaire de la déposition de la méthylation CHH chez Arabidopsis. D'après Law et Jacobsen, (2010).

de H2Aub ne sont pas établis avec certitude chez les plantes et pourraient être peu conservés, ou varier selon les locus. En effet, des analyses d'un double mutant *clfswn*, dans lequel l'activité végétative de PRC2 est essentiellement abolie, ont montré une perte massive de H3K27me3 mais pas de changement de la quantité globale de H2Aub (Yang et al., 2013). Au vu d'analyses épigénomiques récentes, ces deux mécanismes pourraient être indépendants chez Arabidopsis et PRC1 pourrait éventuellement aussi agir antérieurement à PRC2 (Zhou et al., 2017).

2.3 Mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des états hétérochromatiniens

L'état CS3 est caractéristique de l'hétérochromatine et contient un fort niveau de méthylation de l'ADN dans tous les contextes de séquences CG, CHG et CHH, ainsi que plusieurs marques d'histones telles que H3K27me1/2, H4K20me1 et, H3K9me2.

L'hétérochromatine présente un fort enrichissement en méthylation de l'ADN

Contrairement aux mammifères dont la méthylation de l'ADN est principalement en contexte CG, la méthylation chez Arabidopsis est présente dans tous les contextes CG, CHG et CHH, avec H pouvant être A, T ou C (Law and Jacobsen, 2010). Concernant la méthylation symétrique en CG, la réplication de l'ADN conduit à un état hémi-méthylé de l'ADN dont la maintenance sur le brin néo-synthétisé est effectuée par l'ADN méthyltransférase Méthyltransférase 1 (MET1) associée à Variation in methylation 1 (VIM1), cette dernière ayant une forte affinité pour l'ADN hémi-méthylé (Figure 12A) (Kankel et al., 2003; Woo et al., 2007). L'essentiel de la méthylation en contexte symétrique CHG est maintenu par la méthyltransférase Chromomethyltransferase 3 (CMT3) (Lindroth et al., 2001) dont l'activité va de pair avec l'histone méthyltransférase Kryptonite (KYP). KYP catalyse le dépôt de H3K9me2 en se liant à la cytosine préalablement méthylée en contexte CHG par CMT3, qui elle-même est recrutée au niveau des marques H3K9me2, formant ainsi une boucle de renforcement de l'état hétérochromatinien (Figure 12B) (Du et al., 2012). La méthylation CHH est dite asymétrique, impliquant que la maintenance de cette marque après réplication doit se faire *de novo* (Figure 13). Ce mécanisme de reconnaissance distinct implique des petits ARN guides, définissant une voie dite de "RNA directed DNA methylation" ou RdDM. L'ARN Polymérase IV spécifique des plantes est recrutée sur les séquences cibles *via* la protéine SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1 (SHH1) qui, grâce à son domaine SAWADEE, reconnaît H3K9me2 (Law et al., 2011). L'ARN simple brin résultant de cette transcription est converti en double brin par une ARN polymérase ARN-dépendante (RDR2) avant d'être scindé en petits ARNs dit interférant (siARNs) de 24 nucléotides par la protéine Dicer-like 3 (DCL3). Ces siARNs peuvent migrer vers le cytoplasme où ils sont pris en charge sous leur forme simple

brin par une protéine Argonaute 4 (AGO4) formant un complexe RNA-induced silencing complex (RISC). Ce complexe est relocalisé dans le noyau où il va permettre de cibler des transcrits complémentaires aux siARNs le composant, synthétisés par l'ARN polymérase V associée au complexe DRR (DMS3, DRD1, RDM1). Ce mécanisme permet finalement le recrutement de DRM2 qui catalyse la méthylation de l'ADN en CHH (revu dans Law and Jacobsen, 2010).

Comme pour les modifications des histones, la méthylation de l'ADN est réversible et plusieurs protéines sont impliquées dans sa déméthylation. Chez *Arabidopsis* la déméthylase DEMETER (DME) est nécessaire pour soumettre certains gènes de l'endosperme à une empreinte parentale (Choi et al., 2002). De plus, REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) est une permet de limiter l'hyperméthylation de l'ADN de nombreux locus. Les mutants perte de fonction *ros1* possèdent donc une activité de silencing importante (Gong et al., 2002; Ikeda and Kinoshita, 2009).

Différentes significations fonctionnelles de l'enlèvement de H2Bub sur les gènes et les régions silencées

Comme indiqué précédemment, les ubiquitine protéases Ubp8, USP22 et Nonstop sont impliquées dans l'enlèvement de H2Bub au cours de la transcription en lien avec des activités de type SAGA respectivement chez *S. cerevisiae*, l'humain et la drosophile. Ces organismes possèdent d'autres activités d'enlèvement de la marque H2Bub avec des fonctions distinctes, voire opposées, sur la transcription. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, l'ubiquitine protéase Ubp10 fonctionne indépendamment du complexe SAGA et a un rôle important au niveau des séquences télomériques et des régions sub-télomériques afin de maintenir un faible niveau de H2Bub et de maintenir un état répressif à la transcription. L'activité d'Ubp10 est nécessaire aux protéines Sir2 pour silencer ces régions (Emre et al., 2005). Ainsi, une lignée $\Delta Ubp10$ entraîne une dérégulation du profil de l'expression des gènes plus importante que la lignée $\Delta Ubp8$. Cet effet semble directement lié au rôle d'Ubp10 au niveau des télomères car les gènes dérégulés sont principalement situés dans les régions sub-télomériques (Gardner et al., 2005). De plus, la lignée $\Delta Ubp8\Delta Ubp10$ présentant un gain de H2Bub supérieur à celui observé dans chacune des lignées $\Delta Ubp10$ et $\Delta Ubp8$. Cette additivité indique que ces deux protéines ont des cibles génétiques différentes (Gardner et al., 2005). Enfin, une étude plus récente de la distribution de H2Bub dans les lignées $\Delta Ubp10$ et $\Delta Ubp8$ a permis de proposer un modèle dans lequel les gènes sont déubiquitinés par Ubp8 dans leur région 5' où la marque H3K4me3 est présente. Pour les longs gènes, Ubp10 déubiquitinerait H2Bub sur la partie en 3' du corps du gène (Schulze et al., 2011). De façon relativement analogue, on note que chez la drosophile, de la même manière que Ubp10, la protéine Scrawny (SCNY) déubiquitine H2Bub pour permettre la répression de

certains gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. Ainsi, il semble ressortir de ces études au moins deux types de fonctions pour les activités de déubiquitination de H2Bub, selon qu'elle est cyclique et co-transcriptionnelle par une activité de type SAGA ou selon qu'elle aboutisse à une déplétion de marquage H2Bub pour prévenir la transcription. L'influence de l'action conjuguée de Ubp8 et Ubp10 sur les régions 5' et 3' d'un gène reste encore peu comprise.

Chez Arabidopsis, la perte de fonction d'*UBP26* s'accompagne de la réactivation de plusieurs éléments transposables tels que les éléments Gypsy *AtGP1* et *AtMULE*, un effet associé par un mécanisme encore mal compris au silencing de transgènes *via* méthylation de l'ADN (Sridhar et al., 2007). En effet, une mutation nulle dans le gène *UBP26* a été obtenue par un crible suppresseur de silencing impliquant ROS1 (Sridhar et al., 2007). Cette étude a montré qu'*UBP26*, *via* son activité de déubiquitination de l'histone H2B, est nécessaire pour le dépôt de H3K9me2 et la méthylation de l'ADN en CHG et CHH dans un contexte mutant *ros1* (Sridhar et al., 2007). De façon moins intuitive, *UBP26* est également impliquée dans la déubiquitination de H2Bub sur le gène *PHERES1*. Ce gène soumis à l'empreinte parentale est réprimé par un système de type PRC2 au cours du développement (Luo et al., 2008). La perte de fonction d'*UBP26* induit à la fois une expression de *PHERES1* dans les jeunes siliques et une baisse du niveau de H3K27me2 sur son promoteur, ainsi qu'un phénotype semblable au mutant *fis* (fertilization-independent) typiquement associé à un défaut d'activité *Polycomb* de type perte de fonction *MEDEA* durant l'embryogénèse. La perte de fonction du gène *OTLD1* peut également induire une réactivation de certains gènes, possiblement en association avec des activités de dé-méthylation H3K4me2/3 (Krichevsky et al., 2011) mais les mécanismes impliqués et son effet attendu sur les mécanismes d'hétérochromatinisation restent à explorer.

Ainsi, comme chez d'autres eucaryotes, chez Arabidopsis l'enlèvement d'un marquage H2Bub peut donc aussi être impliqué dans la répression transcriptionnelle. De manière similaire à ScUbp10, la protéine *UBP26* est impliquée dans l'enlèvement de domaines H2Bub sur des séquences répétées. Son action sur le gène *PHERES1* suggère par ailleurs une capacité à favoriser l'établissement d'un mécanisme répressif de type PRC2 (Luo et al., 2008). L'existence d'un homologue de ScUbp8 et de Nonstop associé à une activité de type SAGA reste à explorer chez les plantes.

3. Dynamiques chromatinienne en réponse aux signaux lumineux chez les plantes

L'ensemble des régulations des états chromatinien, tels que le dépôt et l'enlèvement des histones ou de leurs modifications contribue au contrôle dynamique de l'expression de nombreux gènes. Ces possibilités de changements sont fortement mises à contribution lors des transitions développementales dont l'étude a gagné un intérêt très important ces dernières années (Grimanelli and Roudier, 2013). Notamment, la façon dont les voies de signalisation peuvent converger vers des mécanismes de changements chromatinien et leurs conséquences fonctionnelles à court ou long terme sont sujettes à d'intenses efforts de recherche. Dans le cadre de ma thèse je me suis plus particulièrement intéressé aux facteurs interconnectant perception des signaux lumineux et états chromatinien (revu dans Barneche et al., 2014; Perrella and Kaiserli, 2016). En raison de leur caractère à la fois photosynthétique et immobile, la lumière est cruciale pour les plantes comme source d'énergie mais elle est aussi vitale en tant que source d'information sur leur environnement. Les voies de perception de la lumière et leur signalisation sont intimement coordonnées avec les processus physiologiques et développementaux par de multiples mécanismes nucléaires et plastidiaux permettant d'optimiser la captation de la lumière. Les voies de signalisation lumineuses agissent à l'échelle de la seconde sur la capacité photosynthétique, de la journée avec le contrôle de l'horloge circadienne et des saisons avec la longueur du jour (Jiao et al., 2007). La signalisation lumineuse est nécessaire plus largement à l'échelle de la vie de la plante pour le contrôle de transitions développementales majeures telles que la germination, le dé-étiolement ou la floraison (Kendrick and Kronenberg, 1994). Les études de photobiologie des plantes visant à la compréhension des mécanismes et conséquences des voies de signalisation de la lumière se sont particulièrement focalisées depuis plus de trente ans sur la photomorphogenèse, l'adaptation rapide du développement et du métabolisme de la jeune plantule à la première exposition à la lumière qui induit la biogénèse des chloroplastes et l'acquisition de l'autotrophie (Chory et al., 1989).

3.1 Les voies des signaux lumineux convergent vers des mécanismes chromatinien

De nombreuses voies de perception de la lumière convergent vers des mécanismes de régulation de l'expression du génome

Les plantes ont la capacité de détecter des changements de qualité, d'intensité, de longueur d'onde, de direction et de durée de la lumière grâce à des récepteurs photosensibles qui sont divisés en cinq classes :

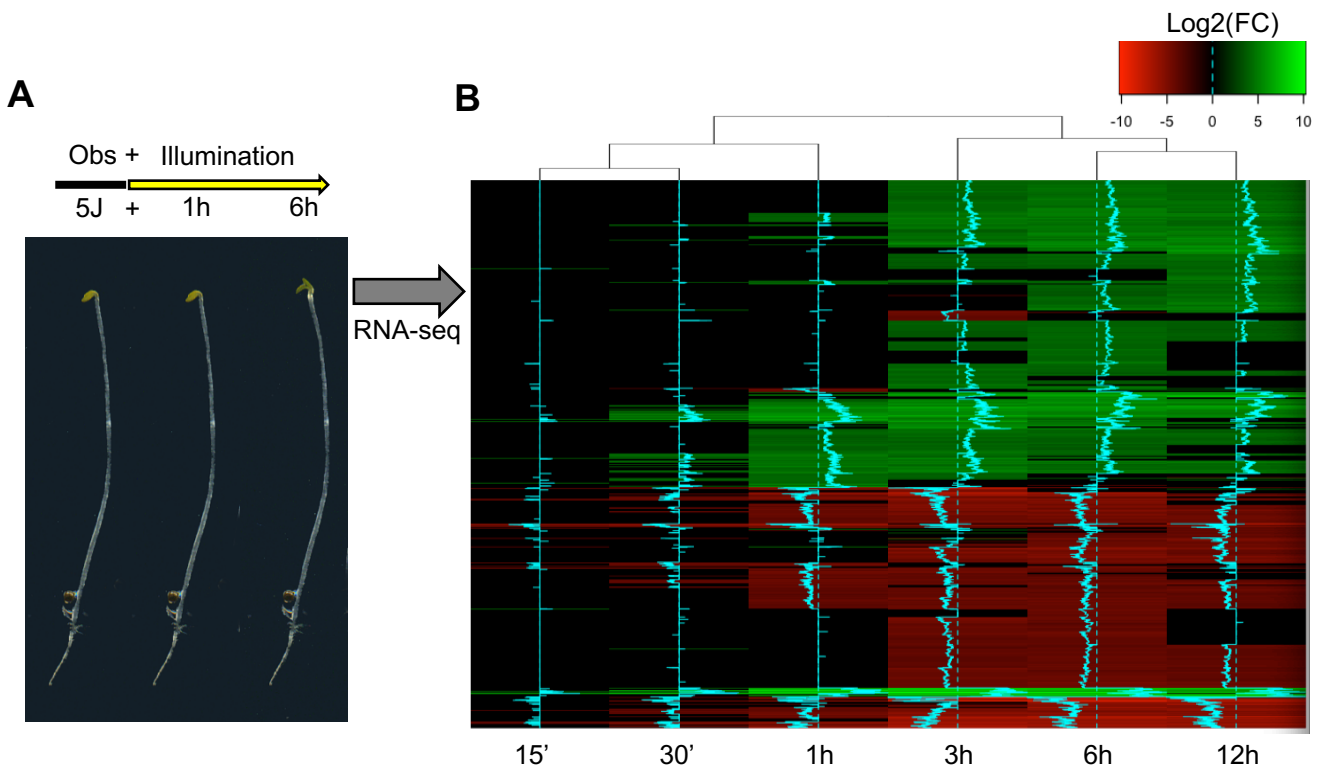


Figure 14. Le dé-étiolement et son impact sur le transcriptome

(A) Photos d'une plantule étiolée après 5 jours de germination à l'obscurité puis exposée à 1h et 6h de lumière blanche. (B) Représentation par heatmap de 8 expériences de RNA-seq de cotylédons effectuées à différents temps d'illumination (Données de Yogev Burko et Johanne Chory, Salk institute). Le heatmap représente les changements d'expression significatifs (en log₂) pour 7869 gènes au cours des 12 heures de dé-étiolement par rapport au temps 0 à l'obscurité.

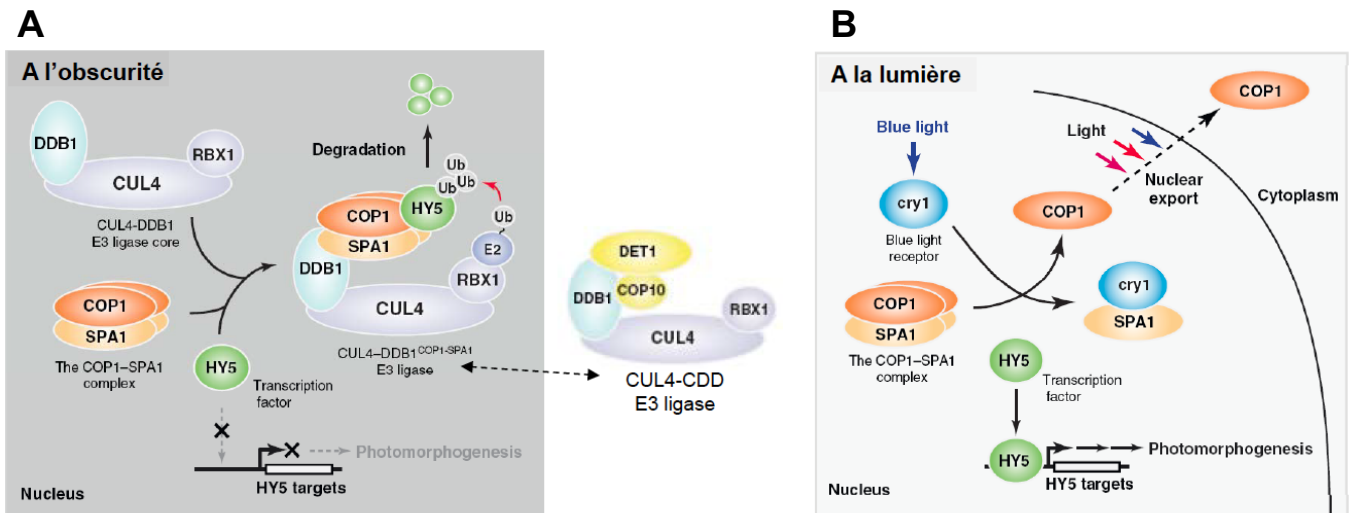


Figure 15. Implication des complexes CUL4-DDB1-COP1-SPA1 et CUL4-CDD au cours de la régulation de la photomorphogénèse chez Arabidopsis.

(A) A l'obscurité, de nombreuses protéines qui induisent la photomorphogénèse comme le facteur de transcription HY5 sont ubiquitinés par les complexes COP1-CUL4-DDB1-SPA1 et CUL4-DDB1-DET1 les adressant au protéasome pour dégradation protéolytique. (B) A la lumière, COP1 est exporté du noyau et DET1 est théoriquement inactivé, permettant la stabilisation de HY5 et d'autres facteurs photomorphogéniques et la photomorphogénèse. D'après Lau et Deng, (2012).

- Les cinq types de phytochromes (PhyA à PhyE) perçoivent le rouge et le rouge lointain (Franklin and Quail, 2010; Rockwell et al., 2006). PhyA est instable et détecte le rouge lointain, les autres phytochromes, de PhyB à PhyE, sont impliqués dans la détection du rouge et sont relativement stables (Sharrock and Clack, 2002).

- Les deux types de cryptochromes Cry1 et Cry2, ainsi que les deux phototropines Phot1 et Phot2 et les membres de la famille Zeitlupe (ZTL, FKF1 et LKP2) sont trois classes de photorécepteurs impliqués dans la détection du bleu et de l'UV-A (Ahmad and Cashmore, 1993; Kagawa et al., 2001; Schultz et al., 2001).

- Ultraviolet-B Receptor (UVR8) est un photorécepteur atypique sans chromophore sensible aux UV-B (Rizzini et al., 2011).

L'ensemble de ces photorécepteurs permet aux plantes d'intégrer de nombreux paramètres de l'environnement lumineux et ainsi de contrôler des voies de transduction régulant l'activité de facteurs de transcription et ainsi modifier l'expression des gènes. En particulier, lors d'une germination à l'obscurité, la skotomorphogenèse correspond au développement d'une plantule en utilisant les réserves accumulées dans la graine avec une élongation rapide de son hypocotyle permettant d'atteindre une zone exposée à la lumière. Le dé-étiolement se produit après la première perception de la lumière et correspond à une transition photomorphogénique en stoppant l'arrêt de l'élongation de l'hypocotyle, déclenchant l'ouverture et l'expansion des cotylédons, ainsi que la biogénèse de chloroplastes (Figure 14A). Cette transition développementale est très rapide et s'accompagne d'une reprogrammation d'environ un tiers des gènes d'*Arabidopsis* (Ma et al., 2001; Tepperman et al., 2004 et données non publiées). Une représentation par heatmap de données de changements d'expression des gènes dans les cotylédons de plantules après différents temps d'illumination obtenues en collaboration avec l'équipe de Johanne Chory (Salk institute) montre l'ampleur et la rapidité de cette reprogrammation du génome avec plus de 7869 gènes significativement régulés en 12h (Figure 14B).

La photomorphogenèse est activement réprimée en absence de lumière

Les différences phénotypiques entre la skotomorphogénèse et la photomorphogénèse ont permis de développer des cribles génétiques afin de déterminer les composants des voies de signalisation impliquées. Ainsi, des mutants appelés *cop* (constitutive photomorphogenic) (Deng et al., 1991) et *det* (de-etiolated) (Chory et al., 1989) montrant un phénotype photomorphogénique constitutif à l'obscurité ont été isolés et cela a permis d'identifier plusieurs complexes répresseurs de la photomorphogénèse agissant au sein de voies de dégradation de protéines (Figure 15).

A l'obscurité, la protéine CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1), qui possède une activité E3 ubiquitine ligase *via* son domaine REALLY INTERESTING NEW GENE (RING) s'accumule dans le noyau où elle s'associe avec des protéines SUPPRESSOR of PHYTOCHROME A (SPA) pour poly-ubiquitiner des facteurs de transcription tels que HYPOCOTYL ELONGATED-5 (HY5) et HY5 HOMOLOGUE (HYH), induisant leur dégradation par le protéasome. La dégradation constante de ce type de facteurs de transcription à l'obscurité aboutit à une inhibition de la photomorphogenèse (Figure 15A). Les protéines DE-ETIOLATED-1 (DET1), DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1 (DDB1) et COP10 forment aussi un complexe de dégradation des protéines appelé CDD qui réprime fortement la photomorphogenèse en agissant conjointement avec l'E3 ubiquitine ligase CULLIN4-DDB1 (Bernhardt et al., 2006; Chen et al., 2006; Yanagawa et al., 2004) (FIGURE 15B). Récemment, l'équipe de Vicente Rubio a également identifié une petite protéine associée au complexe CDD : DET1 DDB1 ASSOCIATED 1 (DDA1) formant un complexe que nous appellerons C3D (Irigoyen et al., 2014). Les deux complexes COP1-SPA et CDD ou C3D semblent s'influencer mutuellement afin de réprimer la photomorphogenèse (Chen et al., 2010).

En plus de ces mécanismes de répression de la photomorphogenèse à l'obscurité, des mécanismes sont à l'œuvre pour activer la skotomorphogenèse. En particulier, la famille des facteurs de transcription à domaine basic Helix Loop Helix (bHLH) Phytochrome Interacting Factors (PIFs) comprend sept membres appelés PIF1/3/4/5/6/7/8 qui s'accumulent à l'obscurité (Leivar and Quail, 2010). Les PIFs sont hautement redondants, agissent sous forme d'hétéro-tétramères, et seule une quadruple mutation *pif1/3/4/5* induit un phénotype de photomorphogenèse constitutive à l'obscurité (Leivar and Monte, 2014). PIF1 interagit avec SPA1 pour faciliter la dégradation d'HY5 en augmentant son affinité avec COP1 (Xu et al., 2014). De façon intéressante, les facteurs de transcription PIF et HY5/HYH reconnaissent des motifs spécifiques de l'ADN : les G-box (CACGTG Leivar et al., 2008), où ils peuvent avoir *in fine* un effet répresseur ou activateur de la transcription suivant les cibles et les conditions (Leivar and Quail, 2010). Certains des PIFs tels que PIF1/3/4 et 5 sont directement stabilisés par DET1 à l'obscurité (Dong et al., 2014) alors que, réciproquement, DET1 est requis pour la dégradation de HY5 à la lumière (Osterlund et al., 2000). Ces observations suggèrent ainsi un système potentiel de recrutement de DET1 vers des séquences spécifiques par ces facteurs de transcription. L'ensemble de ces mécanismes permet la maintenance de la skotomorphogenèse à l'obscurité *via* d'une part une activité des facteurs de transcription PIFs et la dégradation concomitante d'autres facteurs de transcription tels que HY5 et HYH par les complexes CUL4-DDB1-COP1-SPA1 et CUL4-DDB1-CDD. Enfin, une étude récente a démontré que DET1 induit la dégradation des protéines DELLA permettant à la voie des gibbérellines de stimuler l'accumulation des PIF à l'obscurité (Li et al., 2015).

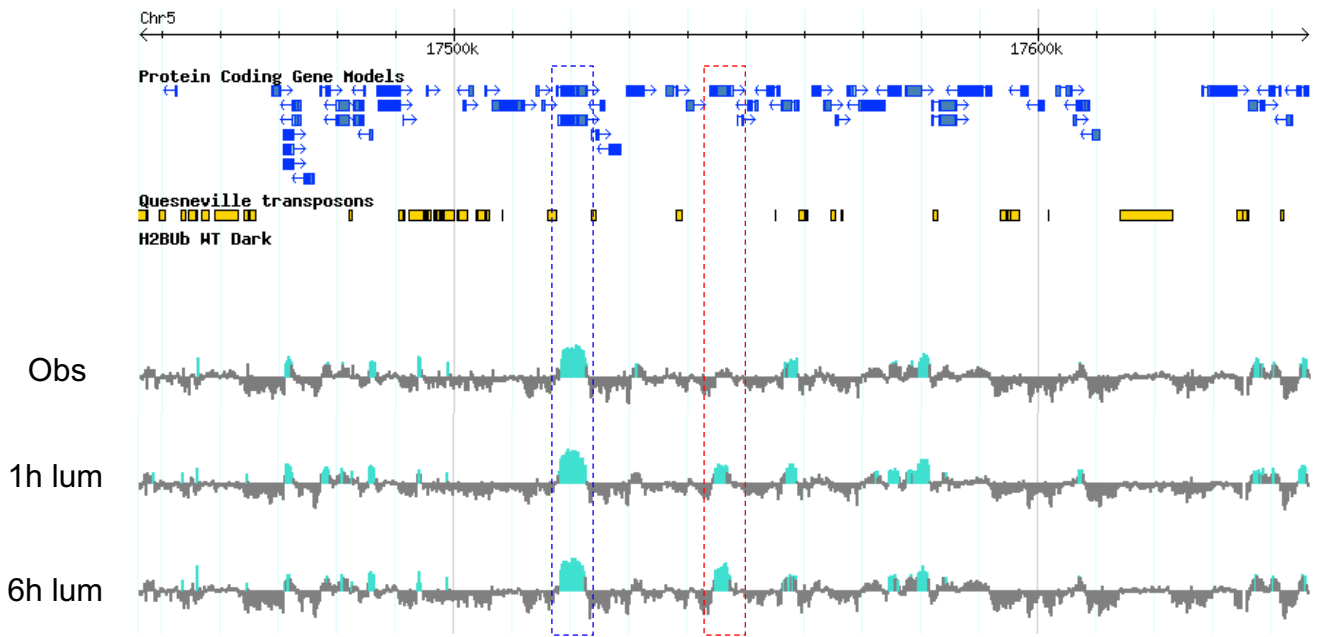
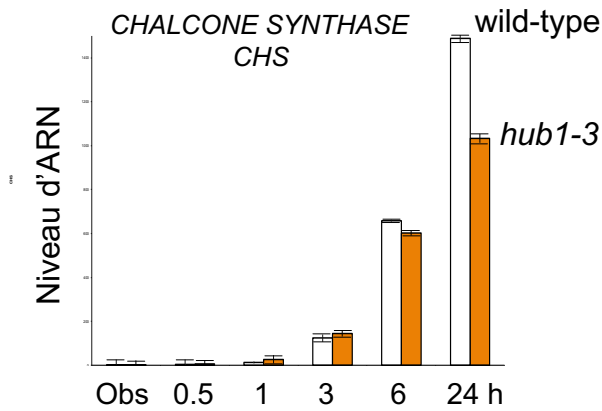
A**B**

Figure 16. Mise en évidence de la dynamique d'H2Bub lors du dé-étiolement et de son rôle dans l'induction des gènes

(A) Visualisation de la distribution de la marque H2Bub sur d'une portion du génome après une expérience de ChIP-ChIP sur des plantules ayant poussé à l'obscurité (obs) et après 1h et 6h de lumière (lum). L'encadré bleu met en avant un gène marqué dans les trois conditions et l'encadré rouge un gène dont le marquage apparaît après une heure d'illumination. (B) Analyse du niveau d'induction du gène de la chalcone synthase (*CHS*) lors du dé-étiolement chez des plantules sauvages (wild-type) et des plantules mutantes *hub1-3*. D'après Bourbousse et al., (2012)

La perte de fonction de DET1 ou de DDA1 chez *Arabidopsis* est létale, montrant que les sous-unités du complexe C3D ont une fonction lorsque la plante se développe à la lumière qui va bien au-delà de la répression de la photomorphogénèse à l'obscurité (Irigoyen et al., 2014; Lau and Deng, 2012). DET1 régule ainsi la floraison à deux niveaux, tout d'abord en perturbant l'interaction entre GIGANTEA (GI) et le promoteur du gène de floraison *FLOWERING LOCUS T (FT)*. Par ailleurs, DET1 interagirait et déstabiliserait MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 4 (MSI4), une protéine du complexe CUL4-DDB1-MSI4 qui favorise le dépôt de H3K27me3 sur *FLC* au cours de sa répression transcriptionnelle (Pazhouhandeh et al., 2011). DET1 contribuerait donc au maintien de l'expression de *FLC* en perturbant sa répression de type *Polycomb via* MSI4, ce qui réprime la floraison (Kang et al., 2015). De plus, DET1 est impliqué dans l'horloge circadienne, il est recruté sur le promoteur du gène *TOC1* à certaines heures de la journée par les régulateurs centraux de l'horloge CCA1 et LHY, induisant sa répression par un mécanisme encore indéterminé mettant en avant le rôle de répresseur transcriptionnel de DET1 (Lau et al., 2011).

La transition skoto/photomorphogénique

Lors de la première exposition à la lumière, l'activation de photorécepteurs PhyA, PhyB, Cry1, Cry2 et UVR8 induit une inhibition très rapide de la répression de la photomorphogénèse. En particulier, l'interaction entre les photorécepteurs phyA/PhyB et les protéines SPA inactive l'association COP1-SPA1. COP1 est également exportée du noyau vers le cytoplasme, stoppant ainsi la poly-ubiquitination et la dégradation de plusieurs facteurs de la photomorphogénèse (Sheerin et al., 2015). Les photorécepteurs actifs de type phytochrome et cryptochromes interagissent aussi directement avec les facteurs de transcription PIFs, induisant leur phosphorylation puis leur poly-ubiquitination et enfin leur dégradation par le protéasome. Cette courte voie de signalisation modifie ainsi le niveau de transcription des gènes cibles des PIFs initiant rapidement l'adaptation des plantes à la lumière (Leivar and Quail, 2010; Pedmale et al., 2016).

3.2 Dynamiques chromatinienne associées à la photomorphogénèse chez *Arabidopsis*

Les changements à grande échelle d'expression du génome lors de la transition photomorphogénique s'accompagnent de changements de l'état chromatinien de centaines de gènes (Bourbousse et al., 2012; Charron et al., 2009) et également d'un changement global du niveau d'activité transcriptionnelle et de l'organisation du noyau entre obscurité et lumière dans les cellules des cotylédons (Bourbousse et al., 2015).

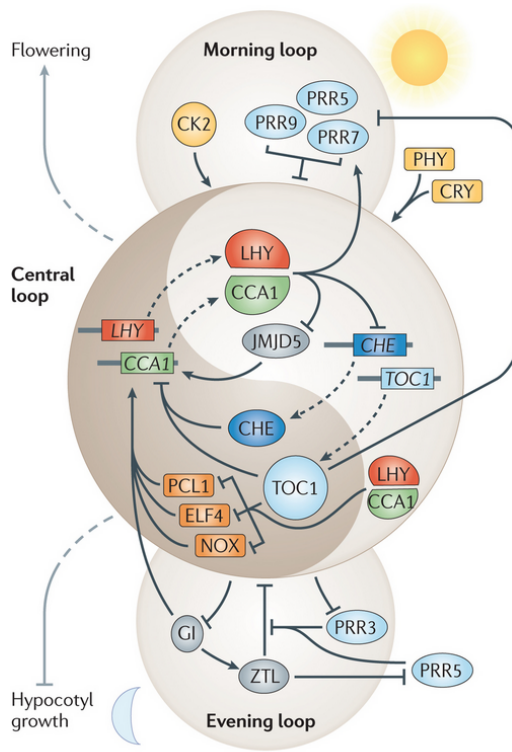


Figure 17. Représentation schématique du réseau constituant l'horloge circadienne chez *A. thaliana*
 Mise en avant des trois boucles : centrale, matinale et du soir, permettant la mise en place de l'horloge circadienne chez Arabidopsis. La boucle centrale est basée sur un cycle de répression dans lequel TOC1 réprime CCA1 et LHY le soir et vice versa. Cette boucle négative influence et est influencée en retour par les deux autres boucles du soir et du matin selon le moment de la journée. D'après Chen et al., (2013).

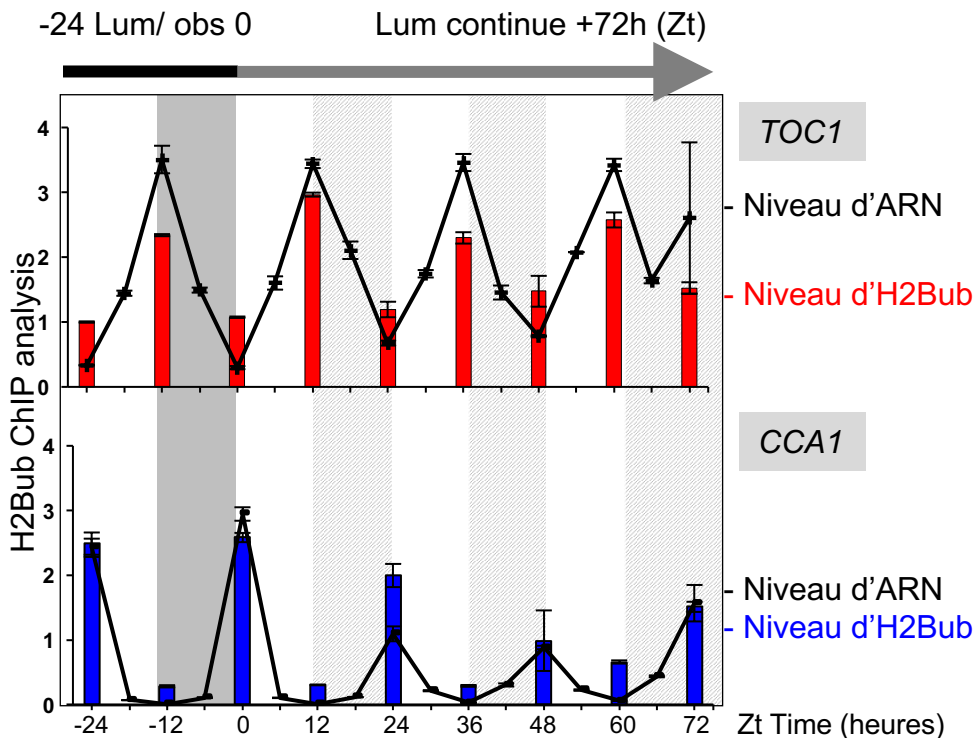


Figure 18. Oscillation de la marque H2Bub sur deux gènes centraux de l'horloge circadienne
 Analyse par RT-qPCR et ChIP-qPCR du niveau d'expression et du marquage H2Bub sur la partie centrale de deux gènes de l'horloge circadienne après entrainement de l'horloge pendant dix jours (obs/lum) puis passage en jour continu (Lum continue). Rainieri et al., *in prep.*

Dynamiques chromatinienne au niveau des gènes de réponse à la lumière

Les études des changements chromatinien lors du dé-étiolement, ont d'abord montré l'importance de l'acétylation des histones dans l'induction de gènes répondant à la lumière (Benhamed et al., 2006; Chua et al., 2001; Perrella and Kaiserli, 2016). La marque chromatinienne H3K27me3 est aussi dynamiquement régulée sur des milliers de locus lors du dé-étiolement (Charron et al., 2009). Le laboratoire a également montré que le profil de la marque H2Bub est dynamique lors du dé-étiolement (Figure 16A). Le dé-étiolement étant très rapide, les changements de marques de la chromatine observés dans ces analyses sont le résultat de variations des états chromatinien indépendants des divisions cellulaires nécessitant un mécanisme d'enlèvement ou de dépôt actif. Bénéficiant d'un mutant nul pour le gène *HUB1*, le laboratoire a isolé un set de 90 gènes dont l'induction en réponse à la lumière nécessite l'établissement d'un domaine H2Bub en moins de 6 heures (Figure 16B) (Bourbousse et al., 2012). Il est intéressant de noter que parmi ces 90 gènes, plusieurs sont impliqués dans la régulation de l'horloge circadienne (*TOC*, *PRR7*, *GI* et *TZP*) (Bourbousse et al., 2012).

Chez les plantes, l'horloge circadienne est basée sur les changements prévisibles de l'environnement et coordonne de nombreuses fonctions biologiques au cours de la journée (McClung, 2011). Chez *Arabidopsis*, l'horloge circadienne régule de nombreux mécanismes comme l'ouverture des stomates, les mouvements foliaires, la floraison et le métabolisme en général *via* la régulation de l'expression de nombreux gènes (Doherty and Kay, 2010; Harmer et al., 2001). L'horloge circadienne implique un réseau de régulation génique complexe composé de 3 boucles de répression et d'activation de gènes : une boucle centrale, une boucle matinale et une boucle du soir (Figure 17). La boucle centrale est composée de trois acteurs majeurs : *CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* et *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*. Les protéines CCA1 et LHY sont exprimées le matin en anticipation de l'aube et répriment *TOC1* qui est exprimé le soir en anticipation de la nuit et réprime *CCA1* et *LHY*. Ce système est dynamique, synchronisé dans toutes les cellules à partir de la région apicale des plantes, et impacte des milliers de gènes, ce qui en fait, un outil de choix pour l'étude de la dynamique des marques de la chromatine. Suite à ces observations, le laboratoire a exploré un potentiel rôle de la dynamique de H2Bub dans la régulation de l'horloge circadienne chez *Arabidopsis* et mis en évidence que l'oscillation de l'expression des gènes circadiens au cours de la journée s'accompagne d'une oscillation du niveau de la marque H2Bub (Figure 18). Par ailleurs, l'analyse phénotypique du mutant nul *hub1-3* a montré une altération de la phase de l'horloge (Rainieri et al., *in prep*).

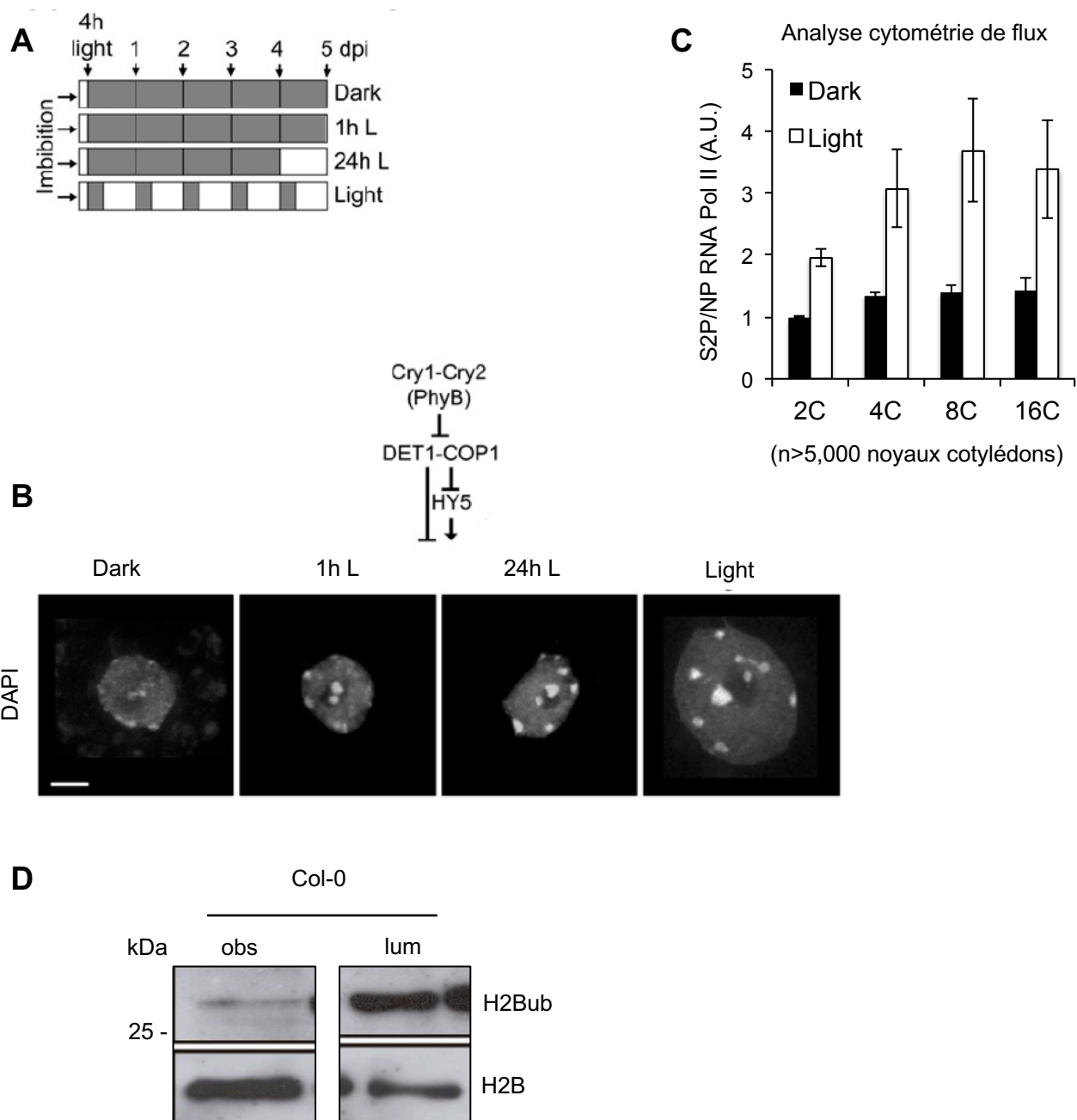


Figure 19. Régulation de l'architecture nucléaire et la transcription au cours de la photomorphogénèse (A) Schéma expérimental utilisé pour l'étude de la photomorphogénèse. (B) Résumé de la réorganisation nucléaire via les cryptochromes mis en évidence dans Bourbousse et al., (2015). Des noyaux de cellules de cotylédons isolés dans les conditions indiquées représentent les différentes étapes. L'accroissement de la taille du noyau est lente alors que la formation des chromocentres est quasiment achevée après 24h d'illumination. (C) L'analyse des différentes formes phosphorylées de l'ARN pol II par cytométrie de flux a montré un niveau global d'activité de transcription des gènes 2,5 fois plus élevé à la lumière (light) qu'à l'obscurité (dark) pour l'ensemble des niveaux de ploïdie. (D) Immuno-détection d'H2Bub dans la lignée sauvage Col-0 sur des extraits de protéines totales de plantules de 5 jours ayant poussé soit à l'obscurité (obs) soit à la lumière (lum), H2B sert de témoin de charge (Données de V. Rubio).

Dynamiques chromatinienne en réponse à la lumière à l'échelle du noyau

Il a été montré au laboratoire que lors du dé-étiolement, en plus de la reprogrammation massive et rapide du profil transcriptomique de la plantule, des réarrangements massifs de l'organisation nucléaire des noyaux de cotylédons ont lieu (Bourbousse et al., 2015).

D'une part, la formation de chromocentres dans les cotylédons au cours de la germination concentrant l'essentiel de l'hétérochromatine comme présenté Figure 1 nécessite la perception de la lumière par des photorécepteurs et est inhibé par l'action de régulateurs de la photomorphogénèse tels que DET1 et COP1. En effet, les noyaux de cotylédons d'Arabidopsis ayant poussé à l'obscurité sont petits, possèdent des ébauches de chromocentres avec des régions péricentromériques et hétérochromatiniennes relâchées dans le nucléoplasme (Figure 19B). Lors du dé-étiolement, les noyaux des cotylédons grossissent progressivement pendant plusieurs jours et les régions hétérochromatiniennes se rassemblent en moins de 24 heures pour former les chromocentres. Cette réorganisation de l'hétérochromatine aboutit au profil nucléaire typiquement observé dans des noyaux de cellules de cotylédons "matures" ou de mésophyle foliaire avec 8 à 10 chromocentres. Elle intervient comme dernière étape de structuration du noyau après des étapes préalables de condensation et décondensation de l'hétérochromatine dans les cellules de cotylédons au cours de la formation de la graine puis de la germination (van Zanten et al., 2011), qui sont initialement indépendantes de la lumière au cours des trois premiers jours de germination (Bourbousse et al., 2015).

D'autre part, l'estimation du niveau global d'activité transcriptionnelle de l'ARN Polymérase II (ARN Pol II) basé sur l'état de phosphorylation de ses sérines 2 et 5 indique 2 à 3 fois plus d'activité dans des noyaux de cotylédons d'Arabidopsis exposés à la lumière qu'à l'obscurité. Chacun des mécanismes de réorganisation de l'hétérochromatine et de variation de l'activité ARN Pol II globale est indépendant des changements de niveaux de ploïdie (Bourbousse et al., 2015). Ces différences d'organisation et d'activité nucléaire suggèrent que la première perception de la lumière par le cotylédon induit une transition entre un stade où les noyaux sont dans un état quiescent à l'obscurité vers un stade plus actif dans les cotylédons photomorphogéniques. De façon peut-être fonctionnellement corrélée à ces observations, des expériences en cours au laboratoire montrent que la quantité de H2Bub est plus importante chez des plantules ayant poussé à la lumière par rapport à celles ayant poussé à l'obscurité (Figure 19D). Ce gain global du contenu chromatinien en marque associée à l'élongation de la transcription est en accord avec l'observation que les noyaux de cotylédons sont davantage transcriptionnellement actifs à la lumière que durant la skotomorphogénèse.

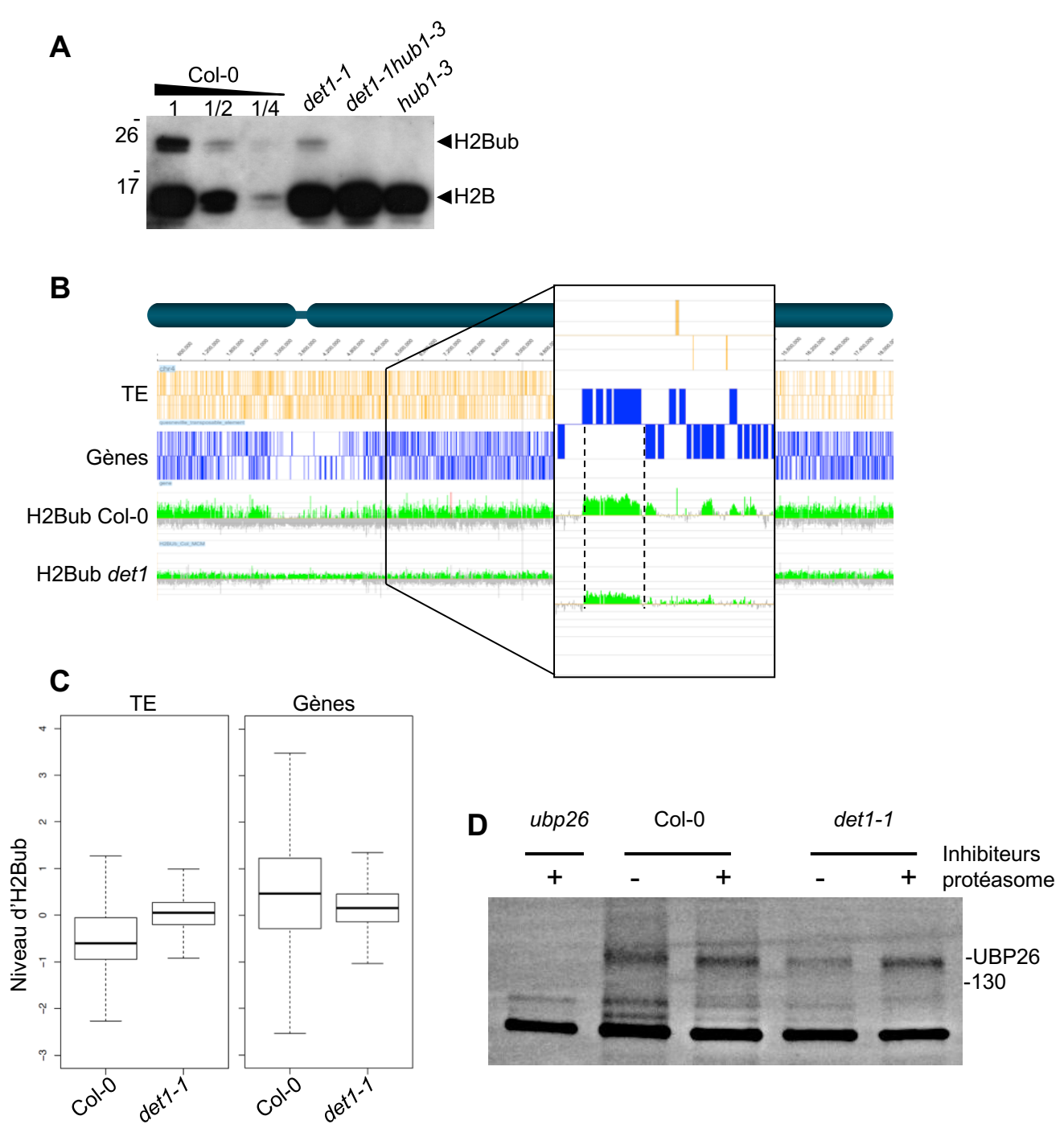


Figure 20. Impact de DET1 sur H2Bub et UBP26

(A) Immuno-détection d'H2Bub et H2B dans des extraits chromatiniens de plantules de 7 jours chez les mutants indiqués. (B) Visualisation du profil de la marque H2Bub chez le mutant *det1-1* par rapport à la lignée de type sauvage analysée par ChIP-ChIP. (C) Boxplots représentant le niveau d'H2Bub sur les gènes et les TEs dans la lignée mutante *det1-1* par rapport à la lignée de type sauvage Col-0. (D) Test d'abondance de la protéine UBP26 par immuno-détection de la protéine endogène dans des plantules *det1-1* avec ou sans pré-traitement des plantules par des inhibiteurs du protéasome. Données du laboratoire non publiées.

3.3 Dynamiques chromatinienne impliquant DET1 et H2Bub chez Arabidopsis

Une fonction chromatinienne de DET1

Comme indiqué précédemment, des mutations nulles de *DET1* sont létales, et des pertes de fonction partielles induisent de nombreux problèmes développementaux, ainsi que le développement ectopique des plastes à l'obscurité et dans la racine (Chory et al., 1989). D'après les données transcriptomiques du laboratoire, plus de 2200 gènes sont dérégulés dans le mutant perte de fonction partielle *det1-1*. Plus tard dans la vie de la plante, la perte de fonction partielle de *DET1* mène au développement de plantes naines, peu fertiles, avec une floraison anticipée. A l'inverse des facteurs COP, DET1 ne possède pas de domaine fonctionnel identifiable et ne semble pas être capable de lier l'ADN malgré le fait qu'elle agisse en répresseur transcriptionnel direct (Lau et al., 2011; Maxwell et al., 2003). La fonction de DET1 restait donc inconnue jusqu'à la mise en évidence par le laboratoire de l'interaction entre DET1 et la queue N-terminale de l'histone H2B non-acétylé *in vivo* et *in vitro*, suggérant que DET1 peut se lier aux gènes non transcrits (Benvenuto et al., 2002).

Comme DET1 peut lier H2B et est associé avec une activité d'ubiquitine ligase, le laboratoire a étudié un potentiel effet de DET1 sur l'ubiquitination de H2B d'abord par immunoblot et observé une forte baisse du niveau global de H2Bub dans le mutant *det1-1* par rapport à la lignée sauvage (Figure 20A). Ce résultat a été confirmé par spectrométrie de masse d'histones purifiées dans des plantules sauvages et *det1-1* en collaboration avec la plateforme protéomique de l'institut Curie (Paris).

Pour comprendre le mécanisme de la baisse de H2Bub en absence de DET1, une expérience de CHIP-chip avec un anticorps contre H2Bub a été effectuée sur des plantules sauvages et *det1-1*. Cette expérience a mis en évidence d'une part une perte quasiment totale de la marque H2Bub sur la moitié des gènes dans *det1-1* (Figure 20B) et un gain de la marque H2Bub sur certaines familles de TEs, silencés et non marqués par H2Bub chez un sauvage (Figure 20C). L'analyse par RT-qPCR de l'expression de ces TEs dans le mutant *det1-1* a montré une dé-répression légère mais significative de certains d'entre eux. DET1 a donc des effets antagonistes sur H2Bub selon les locus.

Des études menées au laboratoire ont montré qu'un double mutant *det1-1hub1-3* montre une suppression partielle du phénotype *det1-1*, suggérant que *det1-1* affecte la biologie de la plante en partie *via* H2Bub. De plus, aucune interaction n'a été détectée entre DET1 et les protéines HUB ou UBC en charge du dépôt de H2Bub, en revanche une interaction entre DET1 et UBP26 a pu être mise en évidence. De plus la protéine UBP26 est moins abondante dans *det1-1* suggérant que DET1 protège UBP26 de la dégradation protéasomale (Figure 20D). Le manque d'UBP26 observable dans le mutant

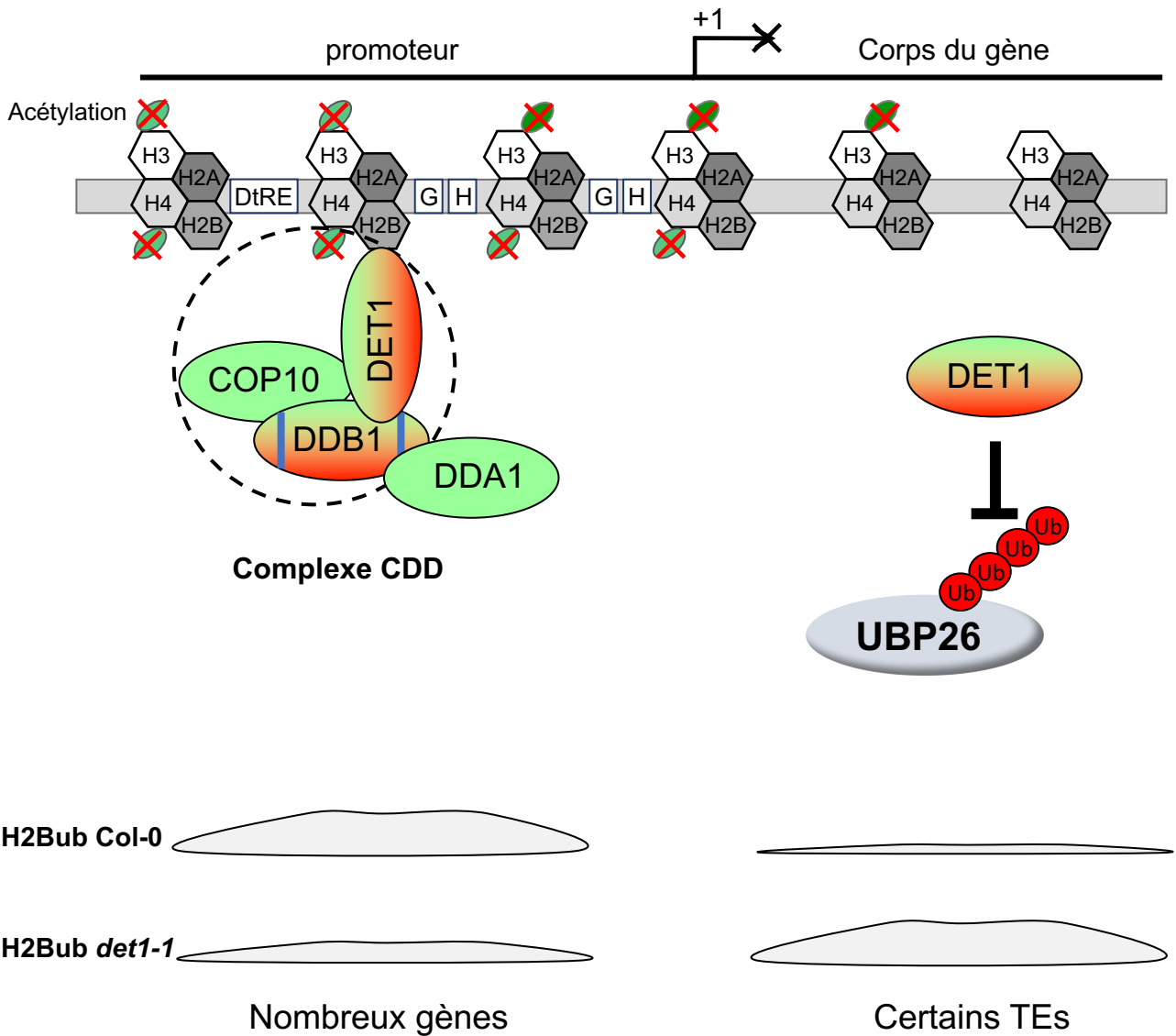


Figure 21. DET1 affecte le niveau d'H2Bub de façon antagoniste selon les loci

Le répresseur transcriptionnel DET1 est capable de lier l'histone H2B et affecte le niveau d'H2Bub sur de nombreux gènes via un mécanisme inconnu. D'autre part, DET1 stabilise UBP26 ce qui permettrait de maintenir un bas niveau d'H2Bub, et un silencing efficace sur certains TEs via l'activité ubiquitine protéase d'UBP26. Données non publiées du laboratoire.

det1-1, pourrait expliquer le gain de H2Bub et la réactivation de certains éléments transposables. Un schéma récapitulant les changements de H2Bub observés dans le mutant *det1-1* par rapport au sauvage permet de visualiser les résultats obtenus par le laboratoire (Figure 21)

4. Objectifs de la thèse

Cette thèse porte principalement sur l'étude des voies de déubiquitination de l'histone H2B mono-ubiquitiné chez la plante *Arabidopsis thaliana*. Ce mécanisme n'est que partiellement caractérisé chez les plantes alors qu'il est primordial dans de nombreux mécanismes fondamentaux liés à la transcription et la régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes. Dans le contexte des mécanismes adaptatifs des plantes aux variations des conditions de lumière, les dynamiques d'ubiquitination et déubiquitination de cette histone influencent la photomorphogenèse et le fonctionnement de l'horloge circadienne mais aussi de façon plus générale la transcription, la répression des gènes et la répression transcriptionnelle d'éléments répétés. Dans le cas de la photomorphogenèse, les données obtenues dans ce travail et au cours des dernières années indiquent que le niveau de H2Bub est fortement variable et contrôlé en fonction des conditions de lumière, possiblement en lien avec l'état transcriptionnel de la cellule.

Dans une première partie, j'ai caractérisé une nouvelle UBP d'*A. thaliana* UBP22 et montré qu'elle est l'homologue de ScUbp8 ayant un rôle clé dans la déubiquitination de H2Bub au sein d'un module de déubiquitination de type SAGA sur les gènes transcrits. Le complexe formé par UBP22 avec les protéines orthologues de ScSgf11 et ScSus1 a été caractérisé, ainsi que son impact sur H2Bub grâce à une lignée perte de fonction du gène *UBP22*. En collaboration avec l'équipe du Dr Rubio (CNB, Madrid, Espagne), l'étude de l'effet direct de ce complexe sur la régulation à grande échelle des états chromatinien au cours de la photomorphogenèse a révélé la régulation de la stabilité de ce module en réponse aux conditions de lumière et par DET1 *via* un mécanisme de dégradation protéasomale.

Malgré leur activité enzymatique de déubiquitination commune de H2Bub, les deux protéines ScUbp8 et ScUbp10 de *S. cerevisiae* ont des cibles génétiques et un impact différent sur la chromatine. Dans la deuxième partie de cette thèse, j'ai étudié les possibles connections et spécificités de fonction entre UBP22 et UBP26, l'homologue potentiel de ScUbp10, chez *Arabidopsis*. Pour ce faire, j'ai utilisé des plantes mutantes *ubp22*, *ubp26* et généré un double mutant *ubp22ubp26* afin de comparer l'impact de ces pertes de fonction sur l'enlèvement de H2Bub, le développement de la plante, sur l'expression des gènes et l'horloge circadienne.

La baisse globale de H3K27me3 observée dans la deuxième partie, ainsi que son influence sur la régulation par empreinte parentale du gène *PHERES1* (Luo et al., 2008) laissaient supposer un lien entre UBP26 et la répression de type *Polycomb* de certains gènes. J'ai donc initié une étude de l'impact d'UBP26 et UBP22 sur ce mécanisme dans la troisième partie de ma thèse. Pour finir, l'impact d'un mutant *ubp26* sur la répression des éléments répétés et l'organisation de l'hétérochromatine a été caractérisé à la fois à l'échelle génomique et cytogénétique.

RESULTATS PARTIE 1

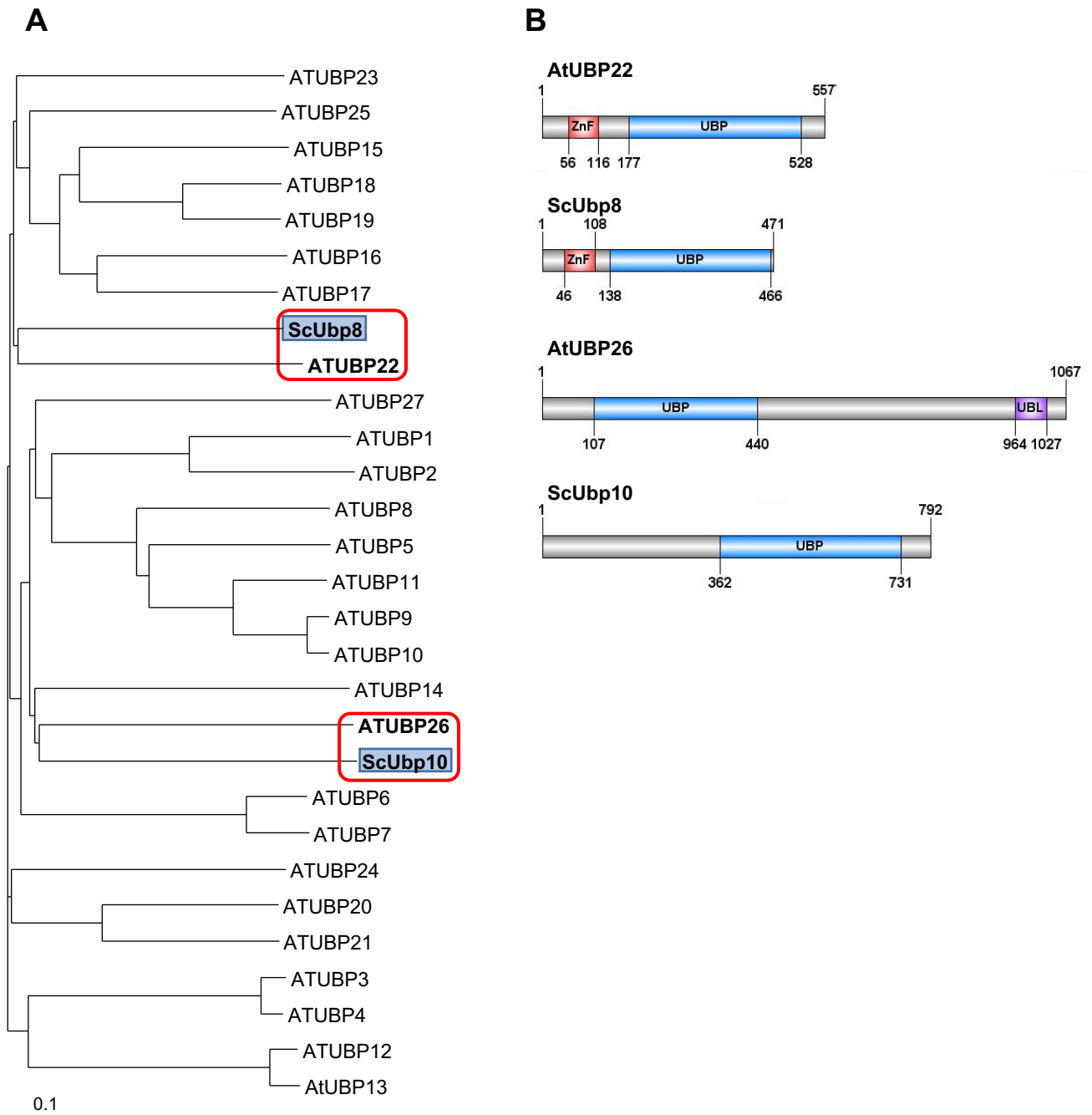


Figure 22. Recherche et organisation des domaines des orthologues d'UBP8 et UBP10 de *S. cerevisiae* chez *Arabidopsis*

(A) Analyse phylogénétique des séquences protéiques des 27 UBPs d'*Arabidopsis* incluant ScUBP8 et ScUBP10. (B) Représentation schématique des différents domaines identifiés dans le génome d'*A. thaliana* par BLAST contre la base de données CDD (Conserved domain database) du NCBI (National center for biotechnology information) avec leurs orthologues de *S. cerevisiae*. UBP : ubiquitin protease ; ZnF : doigt de zinc ; UBL : ubiquitin-like.

1. Caractérisation d'un module de déubiquitination de la marque H2Bub chez *Arabidopsis thaliana*, régulé par la signalisation lumière

Contexte

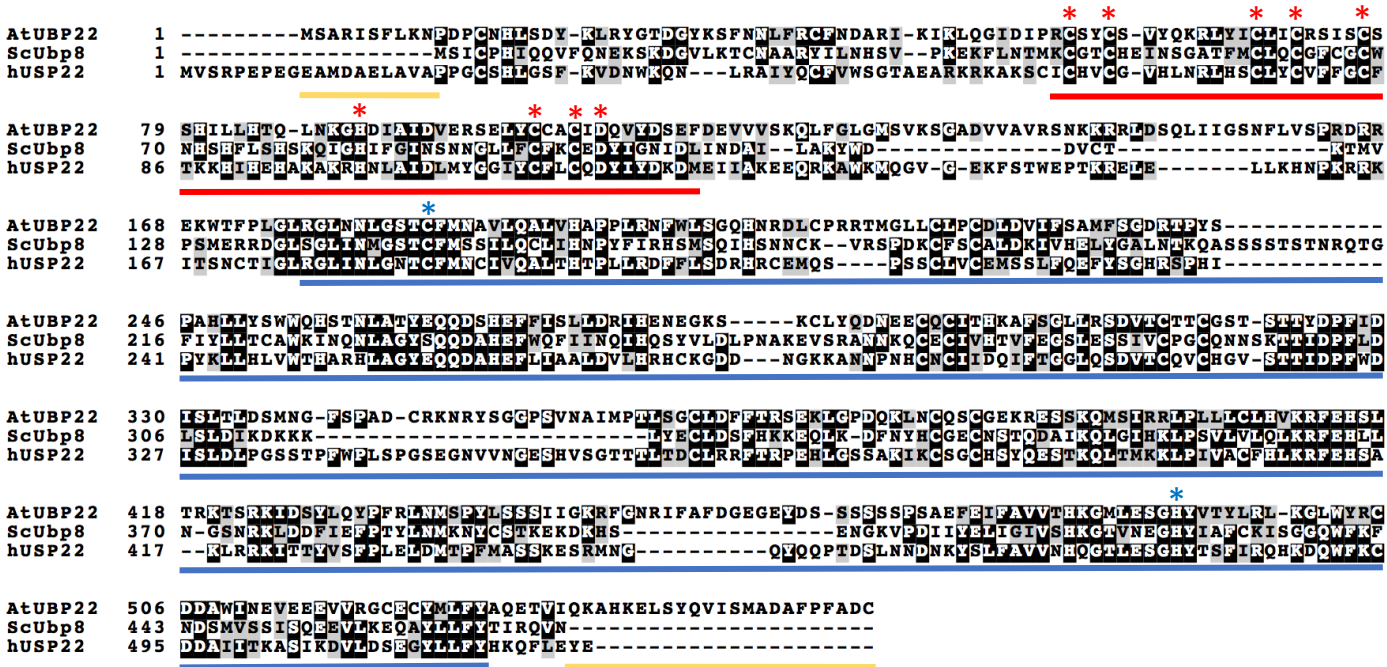
Le mécanisme de contrôle ainsi que le rôle de la déubiquitination de l'histone H2Bub sont peu caractérisés chez les plantes. Comme indiqué précédemment, seules les ubiquitine protéases UBP26 et OTLD1 sont partiellement décrites (Sridhar et al., 2007 ; Krichevsky et al., 2011), UBP26 ayant un rôle dans le silencing de certains éléments transposables ainsi que dans la répression du gène *PHERES1* (dans l'accession Col-0) et l'induction de *FLC* (dans l'accession C24). Dans cette première partie, je décris l'identification d'une nouvelle activité de déubiquitination de la marque H2Bub, UBP22, ainsi qu'une recherche de ses partenaires et de son impact sur la chromatine. Je m'intéresse également à sa régulation par la lumière afin d'initier l'étude des contextes fonctionnels dans lesquels cette machinerie moléculaire est impliquée, *via* les variations dynamiques de l'enrichissement en H2Bub chez *Arabidopsis*.

1.1 Mise en évidence et caractérisation du module UBP22-AtSGF11-AtSUS1 d'Arabidopsis

Identification et description des composants d'un DUBm chez Arabidopsis

Une analyse phylogénétique a été effectuée au laboratoire afin d'identifier, parmi les protéines à domaine UBP d'Arabidopsis, quelles sont les orthologues d'Ubp8 et Ubp10. L'analyse est basée sur la comparaison des séquences protéiques des 27 protéines d'Arabidopsis contenant un domaine UBP prédit (Yan et al., 2000), incluant les séquences protéiques d'Ubp8 et Ubp10 impliquées respectivement dans l'enlèvement de H2Bub en lien avec la transcription et le silencing chez *S. cerevisiae* (Henry et al., 2003 ; Emre et al., 2005) (Figure 22). L'arbre phylogénétique résultant de cette comparaison met en évidence une forte proximité entre les protéines ScUbp8 et ScUbp10 avec respectivement AtUBP22 et AtUBP26. Un WU-BLAST de la séquence protéique d'UBP22 contre le protéome de *S. cerevisiae* identifie Ubp8 en première position ce qui confirme l'orthologie de ces deux gènes. Le WU-BLAST d'UBP26 identifie Ubp10 en cinquième position, néanmoins la proximité entre UBP10 et UBP26 est en accord avec leur rôle respectif dans la répression transcriptionnelle. L'orthologie entre *UBP22* et *Ubp8* a été confirmée par d'autres études *in silico* récentes (Morea et Aquea, 2015 ; Srivastava et al., 2015). Le gène *UBP22* et sa fonction n'étant pas encore caractérisés, c'est donc un

A



B

Matrice de similarité (%)	AtUBP22	ScUbp8	hUSP22
AtUBP22	100	29	36
ScUbp8	29	100	31
hUSP22	36	31	100

Figure 23. Alignement des séquences protéiques des orthologues d'UBP22 chez l'Humain et *S.cerevisiae*

(A) Alignement des protéines sur Clustal Omega et coloration de l'alignement sur BOXSHADE. Le trait rouge représente le domaine doigt de zinc d'UBP22, le trait bleu son domaine UBP et les traits jaunes les régions supplémentaires d'Arabidopsis par rapport à *S. cerevisiae*. Les résidus conservés du doigt de zinc sont marqués par les étoiles rouges et les sites catalytiques du domaine UBP sont marqués par les deux étoiles bleues. (B) Matrice de similarité en pourcentage entre chaque protéine obtenue avec l'alignement sur Clustal.

candidate très intéressant pour l'étude de la déubiquitination en rapport avec la transcription chez *Arabidopsis*.

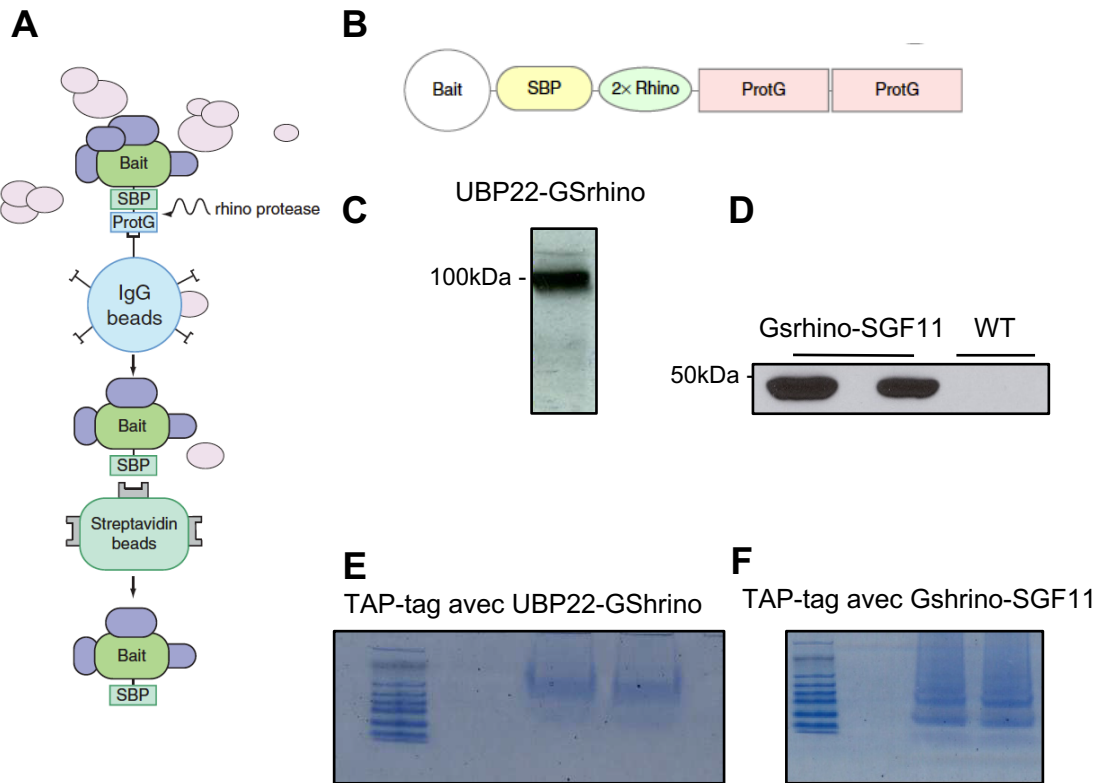
L'analyse par BLAST de la séquence protéique d'UBP22 contre le protéome de l'humain révèle la protéine USP22 en premier candidat suivi de près par les protéines USP51 et USP27X. La protéine USP22 fait partie du DUBm lié au complexe SAGA de l'humain et est requise pour l'enlèvement de H2Bub et la transcription comme Ubp8 chez *S. cerevisiae* (Zhang et al., 2008). Les protéines USP51 et USP27X forment aussi des DUBm qui sont indépendants de SAGA et enlèvent H2Bub pour réguler l'expression de certains gènes (Atanassov et al., 2016). L'alignement des séquences protéiques d'UBP22, Ubp8 et USP22 met en évidence la conservation des acides aminés importants pour le doigt de zinc et l'activité du domaine UBP (Figure 23A). La similarité des séquences protéiques d'UBP22 et UBP8 est de 29%, 36% entre UBP22 et USP22, et 31% entre Ubp8 et USP22 (Figure 23.B). Ces trois protéines sont donc relativement similaires entre elles, la similarité étant inférieure à 40% il est à ce stade difficile de conclure sur une potentielle homologie de fonction entre *UBP22* et *Ubp8* ou *USP22*.

Afin d'initier l'étude de la conservation potentielle de la fonction biologique entre les différents orthologues *ScUbp8/UBP22* et *ScUbp10/UBP26*, les domaines des protéines d'intérêt ont été annotés (Figure 1.B et 2.A). Les deux protéines sont de taille similaire, avec une conservation d'un domaine en doigt de zinc connu chez *ScUbp8*. Ce domaine est primordial pour l'organisation du lobe d'assemblage du DUBm chez *S. cerevisiae* (Köhler et al. 2010). En effet, le doigt de zinc d'*Ubp8* interagit avec l'hélice N-terminale de *Sgf11* et le tout est encapsulé par *Sus1*, ces interactions permettant d'organiser l'assemblage du module de déubiquitination du complexe SAGA (DUBm) chez cette espèce (Köhler et al. 2010).

En plus de son domaine UBP, *UBP26* possède un domaine ubiquitin-like (UBL). Ce domaine est associé avec la régulation de la stabilité de la protéine elle-même. En effet, le domaine UBL interagit avec le protéasome et la dégradation est enclenchée si des régions désorganisées de la protéine sont présentes (Yu et al., 2016). Les protéines contenant un domaine UBL et une région désorganisée peuvent échapper à la dégradation si cette région est masquée par une interaction avec une autre protéine, ce mécanisme permettrait à une protéine d'être dégradée rapidement si elle excède son interactant (Yu et al., 2016).

UBP22 interagit avec *AtSGF11* et *AtSUS1* *in vitro* et *in vivo*.

Pour explorer la fonction d'UBP22 chez *Arabidopsis*, nous avons tout d'abord recherché ses interactants potentiels par une approche TAP-tag (Van Leene et al., 2015). La technique est utilisée par le Department of Plant Systems Biology (VIB, Gent, Belgique) dans le cadre d'une collaboration avec



F

AtSUS1

1 MKHSVNRPPT PDEDDVADGF EKDKVTLREI INVKLVESGE KENLMELVRD
 51 RLVCEGWKDE MRIACREHVK KGRKDVTV D ELIRVITPKG RGKIYNEQSV
 101 SVSVNSLLVT LTLFLWMFV VVCSFSTRFC EGRAVEQNSK LHCISCSLMV
 151 F

AtSGF11

1 MSGAEDNKSS HAQLSSQIFL DLVDSVIADV ASECHRVARL GLDRDL DIVE
 51 EELRLSVEAR AKLADPSNNL ETNTKYVVDI FGQTHPPVAS EVFNCMNCGR
 101 QIVAGR FAPH LEKCMGKGRK ARAKTRRSTT AAQNRNARRS PNPRYSYPYN
 151 SASENQLASG SPGVAGEDCS NFTVRENVKG D

G

		Bait : UB22	Bait : SGF11
AtSUS1	AT3G27100	2	6
AtSGF11	AT5G58575	2	
UB22	AT5G10790		6
TON1A	AT3G55000	X	6
TON1B	AT3G5505	X	6

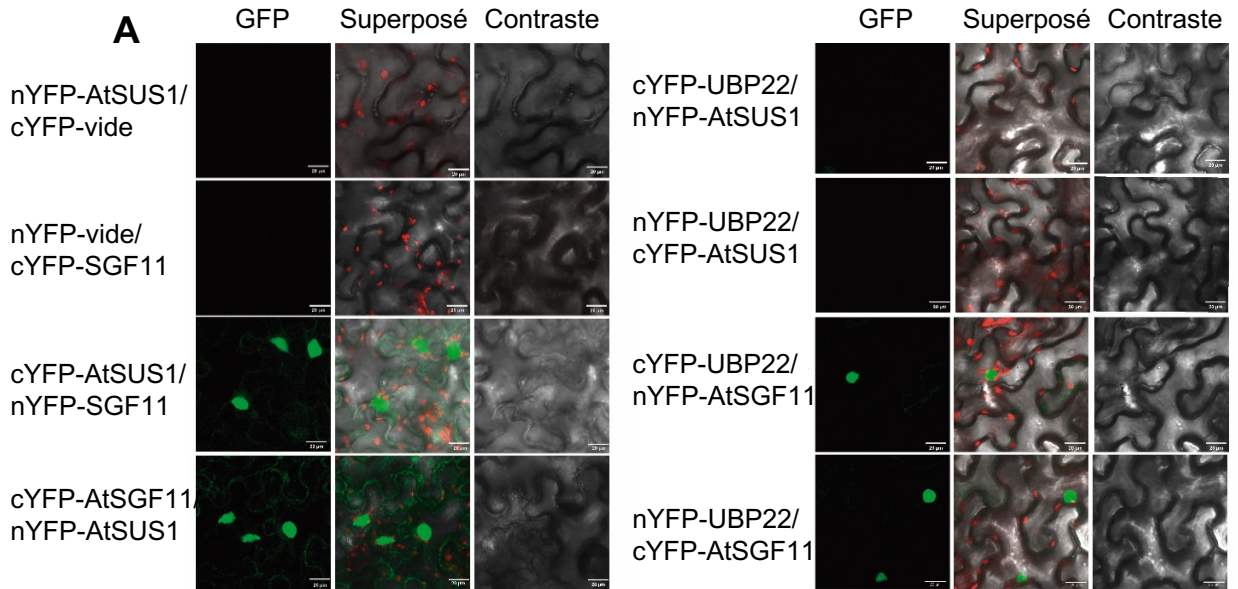
Figure 24. Identification des Protéines interagissant avec UB22 et SGF11

Schéma récapitulatif de la technique de TAP-tag (A) et de la construction utilisée (B) (Van Leene et al., 2015). Immunodétection de UB22 (C) et SGF11 (D) fusionnées à la GSRhino et exprimées dans des lignées cellulaires d'Arabidopsis et détectées par un anticorps anti-SRB. SDS-PAGE et coloration par bleu de Coomassie des protéines interagissant avec UB22 (E) et SGF11 (F) avant digestion in-gel et analyse des protéines par spectrométrie de masse. (F) Séquences protéiques d'AtSUS1 et AtSGF11, les peptides identifiés par MS sont surlignés en jaune. (G) Tableau récapitulatif des interactants d'UB22 et SGF11 ainsi que leurs identifiants et le nombre de répliquas pour chaque expérience.

Geert De Jaeger. Cette méthode nécessite la fusion entre une protéine d'intérêt (appât) avec une étiquette de double affinité : la protéine G et un peptide liant la streptavidine. Ces deux étiquettes sont séparées par un site de clivage par protéase rhinovirus 3C (Figure 24B). Cette construction est amplifiée dans des cultures cellulaires d'*A. thaliana* puis purifiée et fixée à des billes IgG pour la première étape de purification. La protéase rhino permet de détacher la construction et les protéines interagissant avec la protéine appât et le tout sera lié à des billes couvertes de streptavidine pour la deuxième purification (Figure 24A). Pour finir, le complexe purifié est détaché des billes par lavage, séparé par un gel SDS-PAGE et coloré au bleu de Coomassie avant digestion par la trypsine pour analyse par spectrométrie de masse. J'ai cloné la séquence codante de la protéine UBP22 sans le codon stop dans un vecteur Gateway en fusion C terminale à la double étiquette décrite précédemment (Figure 24C). Il est notable que la protéine UBP22-GFP est apparue partiellement soluble dans les conditions d'extraction utilisées, nous conduisant à utiliser une extraction en présence de 1% de digitonine.

Les peptides enrichis de manière significative avec UBP22 comme appât dans les deux répliques biologiques effectués correspondent sans ambiguïté à deux protéines : AtSGF11 et AtSUS1 (Figure 24F). IL est important de noter à ce stade qu'une analyse similaire, effectuée de façon concomitante par l'équipe de Vicente Rubio (CNB, CSIC, Madrid), utilisant AtSGF11 comme appât a également mis en évidence quatre interactants sur un total de six répliques biologiques : UBP22, AtSUS1, TON1A et TON1B (Figure 24E). Ces analyses indépendantes utilisant des appâts distincts valident donc l'association en TAP-tag des trois protéines UBP22, AtSGF11 et AtSUS1. Une expérience de fluorescence bi-moléculaire (BiFC) effectuée par cette équipe a permis de confirmer plusieurs de ces interactions *in vivo* comme présenté Figure 25. En effet, après co-expression de différentes combinaisons de protéines fusionnées à des fragments complémentaires de la Yellow Fluorescent Protein (YFP) dans l'épiderme de feuilles de tabac, la fluorescence visible indique une interaction *in vivo* entre UBP22 et AtSGF11 ainsi qu'entre AtSGF11 et AtSUS1. Néanmoins dans cette expérience, aucun signal n'est détecté entre UBP22 et AtSUS1. Ce résultat négatif peut suggérer que la surexpression d'AtSGF11 est probablement nécessaire pour que les trois protéines forment un complexe et ainsi générer un signal détectable. Afin de compléter ces analyses, des expériences de co-immunoprécipitation sur des extraits de plantes d'*Arabidopsis* sont en cours.

Au vu de ces résultats, je me suis intéressé aux protéines AtSGF11 et AtSUS1. L'analyse par BLAST contre les génomes de *S. cerevisiae* et de l'humain de la séquence protéique d'AtSUS1 identifie respectivement en première position les protéines SUS1 et ENY2, ces deux protéines sont homologues et font partie des complexes SAGA respectivement chez la levure et l'humain comme indiqué précédemment. La protéine d'*Arabidopsis* AtSUS1 a conservé le domaine EnY2 présent chez la levure et l'humain (Figure 26A). De plus l'alignement des séquences montre une bonne conservation de cette



B

		c-YFP			
		vide	AtSUS1	AtSGF11	UBP22
n-YFP	vide				
	AtSUS1				
	AtSGF11				
	UBP22				

Pas d'interaction
 Interaction

Figure 25. Interaction *in vivo* entre les différentes protéines du DUBm

(A) Expérience de complémentation par fluorescence Bi-moléculaire (BiFC). Le signal YFP est analysé dans des cellules de feuilles de tabac infiltrées avec différentes protéines fusionnées avec un fragment de la molécule YFP. L'interaction entre les deux protéines permet de restaurer la fluorescence la YFP. (B) Tableau récapitulatif des constructions testées et des interactions observées en incluant les contrôles effectués. Données du laboratoire Rubio CNB Madrid

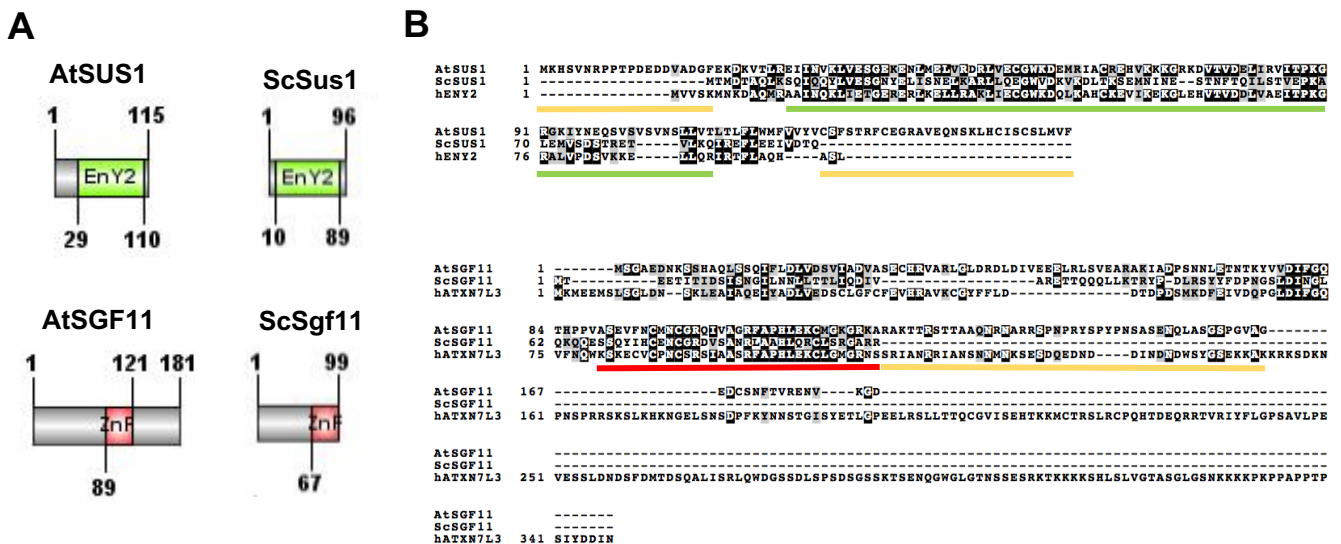


Figure 26. Recherche et organisation des domaines des orthologues chez Arabidopsis d'UBP8 et UB10 de *S. cerevisiae*

(A) Représentation schématique des différents domaines identifiés par BLAST contre la base de données CDD (Conserved domain database) de NCBI (National center for biotechnology information) chez AtSUS1, ScSus1, AtSGF11 et ScSgf11. (B) Alignement des protéines sur Clustal Omega et coloration de l'alignement sur BOXSHADE. Le trait vert représente le EnY2 de AtSUS1, le trait rouge le doigt de zinc d'AtSGF11 et les traits jaunes les régions supplémentaires d'Arabidopsis par rapport à *S. cerevisiae*.

protéine, on note néanmoins que la protéine de plante est plus longue que celle de levure, et celle de l'humain est bien plus longue encore (Figure 26B).

De la même manière, l'analyse par BLAST de la séquence protéique d'AtSGF11 identifie les protéines SGF11 et ATXN7L3 qui sont aussi deux homologues respectivement impliquées dans le DUBm du complexe SAGA chez la levure et l'humain. Le domaine en doigt de zinc est conservé chez *Arabidopsis*. Chez *S. cerevisiae*, ce domaine est localisé près du site actif d'Ubp8, capable de lier l'ADN nucléosomal et est nécessaire pour maintenir la conformation active du domaine UBP, permettant la déubiquitination de H2Bub (Köhler et al., 2010 ; Samara et al., 2012 ; Koehler et al., 2013). Ces observations confirment la conservation structurale de certaines unités du DUBm Ubp8 chez *Arabidopsis*.

Les interactions réciproques en TAP-tag entre UBP22 et les orthologues de ScSus1 et ScSgf11 (AtSGF11/AtSUS1) d'une part (nos résultats) ainsi qu'entre AtSGF11 et UBP22/AtSUS1 d'autre part (données de V. Rubio) permettent de proposer qu'UBP22 soit associée avec ces deux protéines au sein d'un module de déubiquitination similaire à celui qui comprend Ubp8, Sgf11, Sus1 et Sgf73 chez *S. cerevisiae*, encore non identifié chez *Arabidopsis* à ce jour, et potentiellement impliqué dans la déubiquitination de H2Bub. Chez *S. cerevisiae*, l'humain et la drosophile, la protéine Sgf73/ATXN7 est nécessaire pour former le DUBm et le lier au complexe SAGA (lee et al., 2009 ; Mohan et al., 2013), il est intéressant de noter que lors des 9 expériences de TAP-tag réalisées avec UBP22 ou SGF11 comme appât, cette protéine n'a pas été détectée. De façon aussi intéressante, aucune autre protéine du cœur ou des différents modules du grand complexe SAGA n'a été identifiée dans ces analyses d'association. Ceci pourrait suggérer que UBP22, AtSGF11 et/ou le module ne seraient pas associés au complexe SAGA d'*Arabidopsis*, ou interagiraient transitoirement avec celui-ci et l'interaction aurait été perdue lors des étapes d'extraction ou de purification des protéines. Des analyses BLAST des séquences protéiques de Sgf73 de levure et ATXN7 humaine contre le génome d'*Arabidopsis* et d'autres bases de données de plantes n'ont détecté aucun orthologue potentiel (données non montrées). Des études phylogénétiques récentes confirment ces observations chez *A. thaliana*, *O. sativa* et la vigne *V. vinifera* (Moraga and Aquea, 2015; Srivastava et al., 2015). La protéine Sgf73 est donc potentiellement absente chez *Arabidopsis*, le complexe formé par UBP22, AtSGF11 et AtSUS1 pourrait donc fonctionner de manière indépendante du complexe SAGA chez les plantes. D'autre part, on peut noter que les protéines composant le DUBm d'*Arabidopsis* sont globalement plus grandes que celles de levure (Figure 23, Figure 26), ce qui pourrait potentiellement compenser l'absence de Sgf73.

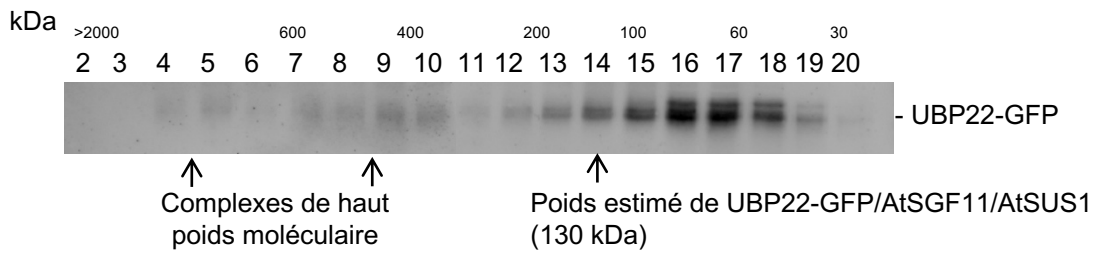


Figure 27. Analyse de la taille du DUB d'Arabidopsis

Immuno-détection d'UBP22-GFP dans différentes fractions séparées selon leur poids moléculaire par chromatographie d'exclusion de taille d'extraits solubles de la lignée *UBP22::UBP22-GFP*.

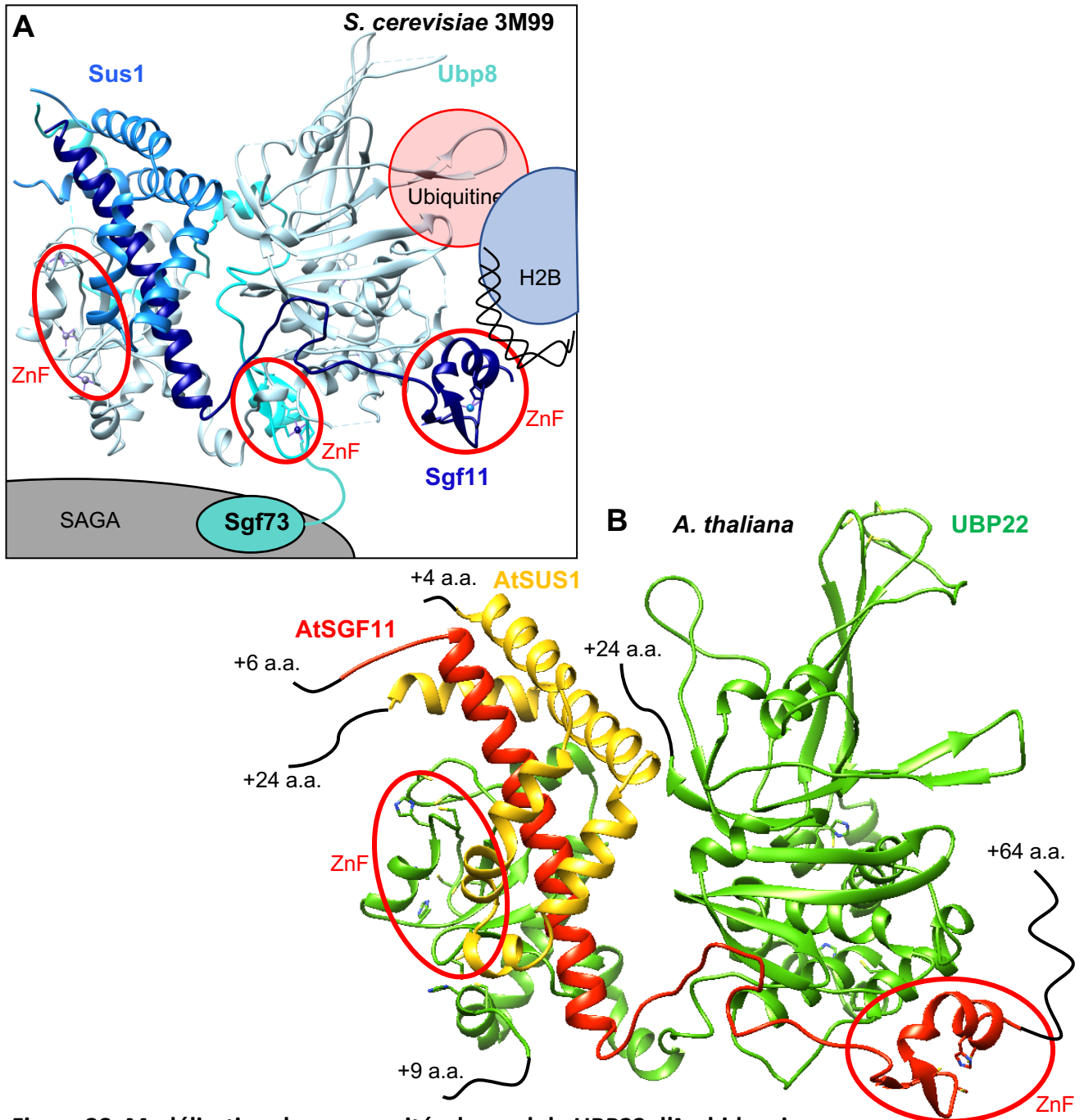


Figure 28. Modélisation des sous-unités du module UBP22 d'Arabidopsis

(A) Visualisation de la structure du DUBm de *S. cerevisiae* 3M99, obtenue par diffraction des rayons X (Köhler et al., 2010 ; Koehler et al., 2014). (B) Structure prédite du module d'*A. thaliana* basée sur l'identification et la recherche d'homologues de structure par PSI-Blast de la structure secondaire de chaque protéine contre la base de données du programme Phyre2. Les doigts de zinc sont marqués en rouges et les acides aminés non modélisés sont représentés par des traits noir

Par ailleurs, les analyses de TAP-tag de l'équipe de V. Rubio ont identifié une association de AtSGF11 avec les protéines TON1A et TON1B (TONNEAU1-A/B) (Figure 24G). Ces protéines sont impliquées dans le réarrangement des microtubules et des chromosomes précédant la division cellulaire et elles n'ont pas été trouvées dans nos analyses utilisant UBP22 comme appât. L'interaction entre TON1A/B et AtSGF11 est peut-être transitoire, ou bien AtSGF11 est capable d'interagir individuellement avec ces deux protéines indépendamment d'UBP22, ou enfin cette interaction pourrait avoir été créée de façon artefactuelle lors de la lyse des cellules et noyaux de plantes.

UBP22 est présente dans des complexes de plus haut poids moléculaire

Afin de rechercher si UBP22 est présente au sein d'un complexe protéique, j'ai effectué une chromatographie d'exclusion de taille de la protéine UBP22 étiquetée par la GFP exprimée *in planta*. Pour ceci, j'ai d'abord utilisé la lignée mutante *ubp22* (décrite page 35) complétée par le gène *UBP22* fusionné à la GFP en C-terminal sous contrôle de son promoteur endogène (*ubp22/UBP22::UBP22-GFP* ; voir les méthodes) (Figure 27). Après immuno-détection de la GFP dans les différentes fractions, la protéine UBP22-GFP est détectée dans les fractions correspondant à sa propre taille (aux alentours de 90 kDa) et également autour de 130 kDa, une taille correspondant à celle prédite après assemblage d'UBP22 avec AtSGF11 et AtSUS1. On remarque un signal de plus faible intensité dans des fractions de très haut poids moléculaire : les fractions 4 et 5 d'une part et 7 et 10 d'autre part.

D'après ces observations, UBP22-GFP pourrait s'associer avec AtSGF11 et AtSUS1 au sein d'un module composé de ces trois protéines et, dans une moindre mesure, à des complexes de plus grande taille. Pour compléter cette analyse, la construction *UBP22::UBP22-GFP* est en cours d'introduction dans un fonds génétique mutant pour le gène *AtSGF11* (décrite page 35) afin de déterminer si la taille des complexes impliquant UBP22-GFP est impactée en l'absence de AtSGF11, testant ainsi si AtSGF11 fait bien partie du complexe d'environ 130 kDa. La composition des complexes de taille très supérieure à ce DUBm potentiel reste à étudier.

Analyse de la structure du DUBm potentiel d'Arabidopsis

L'hypothèse de la conservation d'une structure de type DUBm SAGA entre Arabidopsis et *S. cerevisiae* a été étudiée grâce à Phyre2, un programme qui permet la recherche de protéines possédant une séquence protéique similaire par PSI-BLAST puis modélise les protéines en se basant sur des structures connues. L'étude réalisée en collaboration avec Dr Cécile Breyton (IBS Grenoble), a révélé par recherche PSI-BLAST que les trois protéines d'intérêt UBP22, AtSUS1 et AtSGF11 forment

une structure secondaire prédite très similaire à la structure du DUBm de *S. cerevisiae* 3MHS caractérisée par diffraction des rayons X (Samara et al., 2010). Les trois protéines d'Arabidopsis ont donc été modélisées en se basant sur cette structure (Figure 28). Le module d'Arabidopsis ainsi modélisé est similaire en tous points au DUBm de *S. cerevisiae*. De la même manière que chez *S. cerevisiae* on observe deux lobes, un premier « d'assemblage » organisé autour du domaine en doigt de zinc d'UBP22 qui interagit avec la longue hélice de AtSGF11 et AtSUS1 stabiliserait cette interaction en l'encapsulant. Le deuxième lobe « catalytique » est composé du domaine UBP d'UBP22 et du doigt de zinc d'AtSGF11, pourrait potentiellement correspondre au site de déubiquitination de l'histone H2Bub chez *A. thaliana*.

Il est important de noter que le DUBm de levure possède la protéine Sgf73 au centre de sa structure (Lee et al., 2009 ; Kölher et al., 2010). En effet, chez *S. cerevisiae*, les 104 premiers résidus de Sgf73 sont situés entre les deux lobes du DUBm et la partie C terminale de ce fragment forme un doigt de zinc participant à la formation du lobe catalytique, nécessaire à l'activité de déubiquitination d'Ubp8. Les 553 résidus composant le reste de Sgf73 forment un domaine SCA7, qui permet la liaison avec le complexe SAGA, juste à côtés du module d'acétylation HAT (Durand et al., 2014). L'absence d'orthologue de Sgf73 chez Arabidopsis pourrait peut-être être compensée par les acides aminés supplémentaires présents en N- et C-terminal des protéines UB22, AtSGF11 et AtSUS1. La taille et la localisation de ces fragments excédentaires sont représentés par les traits noirs sur la figure 28, et ne sont pas modélisés par le programme en absence de structure de référence. Une analyse de l'évolution des protéines d'Arabidopsis sera lancée pour déterminer si une autre protéine, ou le module, a évolué pour compenser l'absence de cette protéine. La recherche d'orthologues par BLAST chez les plantes n'ayant donné aucun résultat, une approche différente basée sur la recherche d'une structure secondaire similaire à Sgf73 chez les plantes a été effectuée sans résultat concluant.

Conclusion

La protéine UB22 a été identifiée comme un orthologue des protéines Ubp8 de *S. cerevisiae* et USP22 humaine, et interagit comme elles avec les orthologues de ScSus1 et ScSgf11. Ces trois protéines ont la capacité de former un module similaire à celui décrit chez ces espèces. La structure prédite de ce DUBm est très similaire à celui identifié après cristallisation chez la levure. On note néanmoins l'absence d'orthologue de la protéine Sgf73 chez Arabidopsis, qui pourrait représenter une divergence structurale importante au regard de son rôle clé pour l'intégrité du DUB module chez *S. cerevisiae* (Köhler et al., 2010 ; Durand et al., 2015). En accord avec ces interactions, UB22 est intégrée dans des complexes de poids moléculaire correspondant à l'assemblage prédit de ces trois protéines,

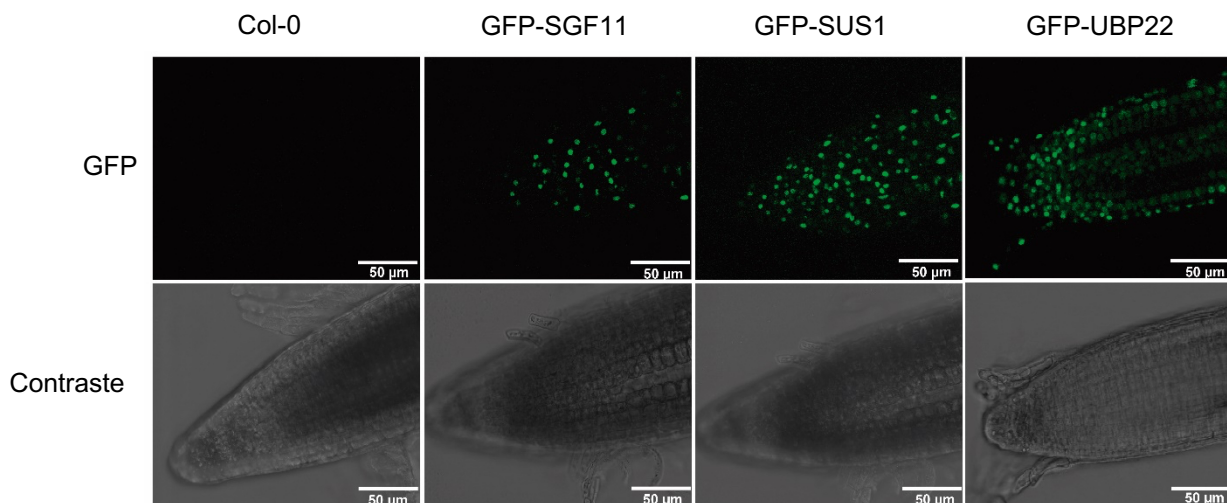


Figure 29. Localisation sub-cellulaire des composants du DUBm d'Arabidopsis.

Visualisation des protéines surexprimées AtSGF11, AtSUS1 et UB22 fusionnées à la GFP par microscopie confocale sur des racines de 5 jours.

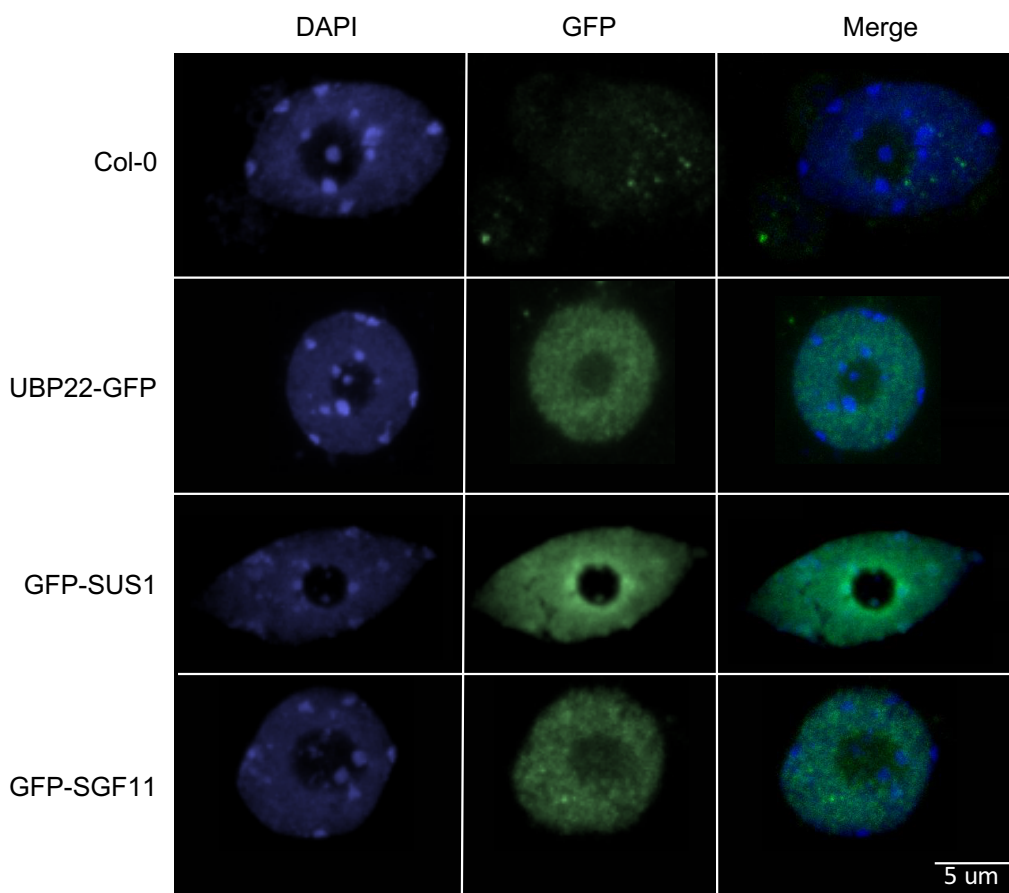


Figure 30. Localisation subnucléaire des composants du DUBm d'Arabidopsis.

Immuno-détection de la GFP après extraction de noyaux de cotylédons de 5 jours sur des lignées surexprimant GFP-SGF11, GFP-SUS1 et la lignée complétement UB22-GFP par microscopie confocale.

et également dans des complexes de plus grande taille, qui pourraient correspondre à des agrégations des protéines UBP22-GFP recombinantes, ou à l'association du module UBP22-AtSGF11-AtSUS1 avec d'autres protéines, ou à un complexe de type SAGA.

1.2 Etude de la fonction d'UBP22 et du module de type SAGA chez Arabidopsis

Les protéines du module UBP22-AtSGF11-AtSUS1 sont nucléaires

Les expériences d'interaction ont montré la localisation nucléaire des protéines du DUBm qui interagissent dans l'épithélium de feuilles de tabac. Afin de déterminer si ces protéines sont présentes dans d'autres compartiments, l'équipe de Vicente Rubio et moi-même avons visualisé, par microscopie confocale de pointes racinaires de 5 jours, la fluorescence cellulaire de lignées surexprimant les différentes protéines UBP22, AtSGF11 et AtSUS1 fusionnées à la GFP (Figure 29). Ces trois protéines sont préférentiellement localisées dans les noyaux des cellules de la pointe racinaire. Ce résultat est en accord avec un rôle potentiel au niveau chromatinien.

Pour étudier la localisation sub-nucléaire de ces protéines, j'ai effectué une immuno-détection de la GFP sur noyaux isolés de cotylédons de plantules de 5 jours (Figure 30). Le marquage est faible pour UBP22-GFP qui est exprimée sous son promoteur endogène, et fort pour les deux autres protéines exprimées sous un promoteur 35S. Après acquisition des images par microscopie confocale, les noyaux de la lignée *ubp22/UBP22::UBP22-GFP* ainsi que les lignées surexprimant GFP-AtSUS1 et GFP-AtSGF11, ont tous un marquage typiquement euchromatinien excluant les chromocentres hétérochromatiniens. En revanche, des analyses reproductibles montrent que la protéine GFP-AtSUS1 présente un signal recouvrant partiellement les chromocentres. Chez *S. cerevisiae*, la protéine Sus1 fait non seulement partie du DUBm SAGA mais aussi du complexe TREX-2 impliqué dans l'exportation des ARN messagers. Ce complexe est enrichi vers la périphérie nucléaire, en étroite relation avec les pores nucléaires (Navarro et al., 2004). Le complexe TREX-2 est partiellement décrit chez les plantes, il est aussi localisé en périphérie nucléaire (Lu et al., 2010), néanmoins l'interaction avec AtSUS1 n'a pas été rapportée. Ce marquage hétérochromatinien pourrait s'expliquer par la présence de GFP-AtSUS1 dans un autre complexe que le DUBm de type SAGA, tel que TREX-2 par exemple.

Les protéines UBP22 et AtSGF11 impactent le niveau global de la marque H2Bub

Afin d'étudier l'impact du DUBm potentiel sur la déubiquitination de l'histone H2Bub chez Arabidopsis, nous avons identifié une lignée mutante par insertion de T-DNA dans le gène *UBP22*

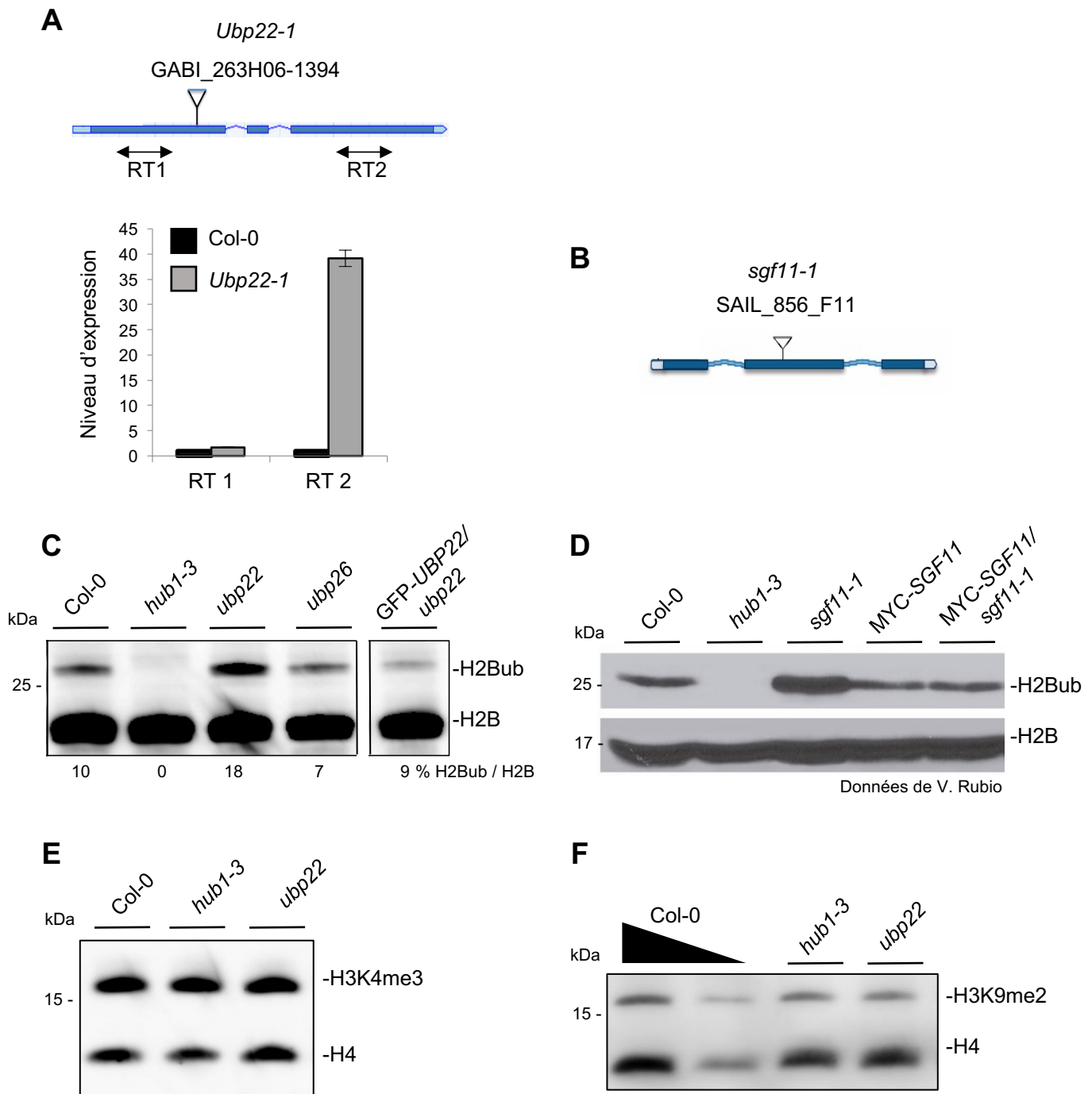


Figure 31. Etude de l'influence d'UBP22 sur certaines marques de la chromatine

(A) Représentation schématique de la lignée mutante par insertion de T-DNA GABI_263H06-1394 impactant *UBP22* avec la position des couples de primers RT1 et RT2 utilisés pour analyser par RT-qPCR l'expression d'UBP22 en amont et en aval du transgène (B) Représentation schématique de la lignée mutante par insertion de T-DNA impactant *SGF11*. (C) Immuno-détection de l'histone H2B et H2Bub sur extraits chromatiniens de plantules de 10 jours grâce à un anticorps reconnaissant H2B. Pour chaque génotype la quantité d'H2Bub relative à la quantité totale d'H2B a été quantifiée après acquisition digitale du signal lumineux (D) Immuno-détection des histones H2Bub et H2B grâce à deux anticorps spécifiques sur des extraits de protéines totales de plantules de 6 jours. Immuno-détection des marques H3K4me3 (E) et H3K9me2 (F) respectivement, sur extraits chromatiniens de plantules de 7 jours utilisant H4 comme témoin de charge.

(Figure 31A). Cette lignée *ubp22-1* dont le nom est simplifié en *ubp22* dans cette thèse, ainsi que la lignée mutante publiée *ubp26-2*, dont le nom est simplifié en *ubp26* (Sridhar et al., 2007) ont été utilisées pour effectuer une immuno-détection de l'histone H2Bub sur des extraits chromatiniens de plantules afin d'étudier la présence globale de cette marque en absence de ces facteurs. La quantité de H2Bub relative à H2B est très supérieure dans le mutant *ubp22* par rapport aux lignées Col-0 et *ubp26* (Figure 31C). Plusieurs répliques indépendants ont montré un doublement de la forme ubiquitinée de H2B dans le mutant *ubp22*, passant d'environ 9-10% chez les plantules col-0 à environ 18% chez le mutant. Ceci indique que UBP22 est un facteur majeur impliqué dans le maintien d'un bas niveau de H2Bub, en accord avec son association au sein d'un module de type SAGA enlevant H2Bub sur de nombreux gènes.

Comme indiqué précédemment, le gène *UBP22* fusionné à une séquence GFP C-terminale sous contrôle de son promoteur endogène a également été introduit dans la lignée *ubp22*. Une analyse par immunoblot des histones H2B et H2Bub dans cette lignée comparée avec des plantules de type sauvage a montré que *ubp22* est complétement de manière efficace de l'effet de la mutation sur le niveau de H2Bub (Figure 31C), démontrant que l'inactivation du gène *UBP22* est responsable du gain observé. En parallèle, l'équipe de Vicente Rubio et moi-même avons identifié une lignée d'insertion de T-DNA pour le gène *SGF11* (Figure 31B). L'analyse par immuno-détection de l'histone H2Bub par rapport à H2B dans ces lignées met en évidence un gain de H2Bub important dans le mutant *sgf11-1* (Figure 31D). Cette équipe a également généré des lignées surexprimant AtSGF11 étiqueté par MYC sous un promoteur 35S dans un fonds sauvage ou *sgf11-1*. Le niveau de H2Bub est similaire à celui des plantules de type sauvage dans la lignée *sgf11-1* possédant une copie viable de *AtSGF11*, la mutation étant donc également complétement par surexpression de AtSGF11-MYC. Néanmoins, contrairement à UBP22 (Figure 31C), la surexpression de AtSGF11 n'entraîne pas de baisse globale du niveau de H2Bub (Figure 31D), suggérant qu'il ne serait peut-être pas un facteur limitant de l'enlèvement de H2Bub.

Finalement, j'ai étudié l'impact d'UBP22 sur les marques H3K4me3 et H3K9me2 par immuno-détection sur les mêmes extraits de chromatine (Figure 31E.F). Au niveau de résolution de cette expérience, les lignées *hub1-3* et *ubp22* ont des niveaux globaux de H3K4me3 et H3K9me2 similaires à ceux des plantules de type sauvage. Par conséquent, le dépôt ou l'enlèvement de H2Bub impliquant HUB1/HUB2 ou UBP22 n'affectent pas ou peu le niveau global de H3K4me3 chez *Arabidopsis*, contrairement à *S. cerevisiae* où le dépôt de H2Bub par Bre1 est un prérequis au dépôt de H3K4me3 (Sun et Allis, 2002).

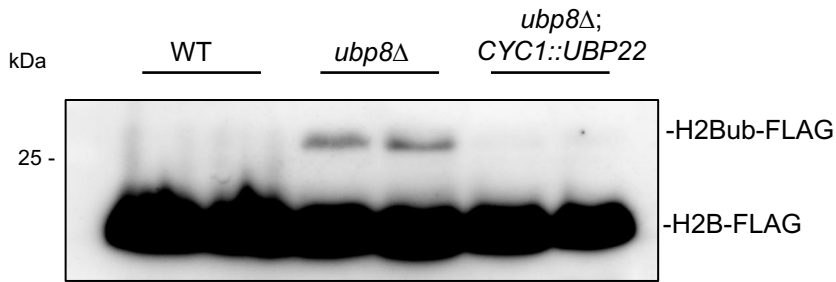


Figure 32. Complémentation d'un mutant de levure *ubp8Δ*

Immuno-détection de l'histone H2Bub et H2B dans des extraits de protéines totales de levures sauvages (WT), mutantes pour le gène *ubp8* (*ubp8Δ*) et deux souches mutantes transformées indépendamment et possédant la séquence codante d'*UBP22* sous contrôle d'un promoteur *CYC1*.

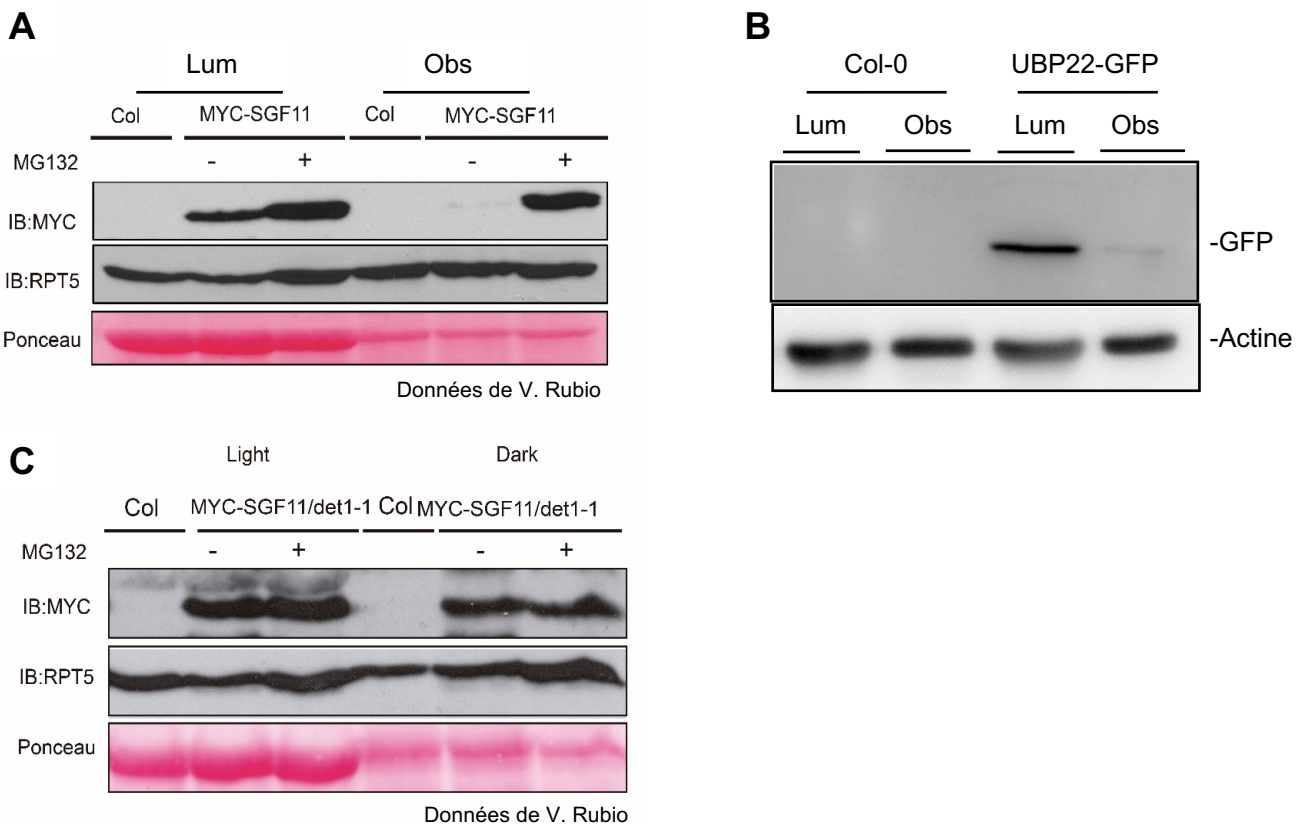


Figure 33. Etude de l'abondance d'UBP22-GFP et MYC-SGF11 dans différentes conditions

(A) Immuno-détection des protéines MYC-SGF11 dans des extraits de protéines totales de plantules ayant poussé à l'obscurité (obs) ou à la lumière (lum), RPT5 sert de témoin de charge. (B) Immuno-détection d'UBP22-GFP dans des extraits de protéines totales de plantules ayant poussé à l'obscurité (obs) ou à la lumière (lum), l'actine sert de témoin de charge. (C) Immuno-détection de MYC-SGF11 dans des extraits de protéines totales de plantules mutantes *det1-1* ayant poussé à l'obscurité (obs) ou à la lumière (lum). RPT5 sert de témoin de charge.

UBP22 est l'homologue d'Ubp8

Pour tester si UBP22 a elle-même une activité de déubiquitination de l'histone H2Bub et ainsi déterminer l'homologie potentielle entre *Ubp8* et *UBP22*, j'ai testé la complémentation d'une lignée de *S. cerevisiae* mutante *ubp8Δ* en la transformant avec une copie viable du gène *UBP22* (Figure 32). Cette lignée mutante *ubp8Δ* présente un important excédent de H2Bub comparé à une lignée de levure de type sauvage (Henry et al. 2003). Une immuno-détection des histones H2Bub et H2B après extraction des protéines à l'urée confirme la présence de cet excès (Figure 32). De façon significative, on observe que l'introduction du gène *UBP22* dans le mutant *ubp8Δ* permet d'abolir cet excès de H2Bub dans deux colonies indépendantes prises au hasard. Cette complémentation fonctionnelle permet de démontrer l'activité de déubiquitinase d'UBP22 sur H2Bub, qui est conservée quand la protéine UBP22 est introduite de façon exogène chez *S. cerevisiae*. Combinés aux conclusions de la section 1.1, l'ensemble de ces résultats révèle que *UBP22* est l'homologue fonctionnel d'*Ubp8* chez *Arabidopsis*.

Conclusion

Les protéines formant le DUBm d'*Arabidopsis* sont toutes nucléaires et enrichies dans l'euchromatine, ce qui est en accord avec leur association au sein d'un module de type DUBm SAGA. De plus, la complémentation d'un mutant de levure *ubp8Δ* a permis de montrer l'activité de déubiquitination d'UBP22 sur H2Bub ainsi que son homologie avec *Ubp8*. Enfin, UBP22 et AtSGF11 sont impliquées dans le maintien d'un niveau globalement bas de l'histone H2Bub.

1.3 DET1 impacte le module UBP22-AtSGF11-AtSUS1 d'Arabidopsis

La stabilité des protéines AtSGF11 et UBP22 est régulée au cours de la photomorphogénèse

Comme indiqué dans l'introduction, le niveau global de la marque H2Bub est nettement plus élevé dans la chromatine de plantules photomorphogéniques que dans des plantules étiolées (Figure 19D). Ces différences globales pourraient s'expliquer par une régulation massive de la machinerie contrôlant les dynamiques de H2Bub, une marque impliquée dans l'élongation de la transcription.

L'analyse de l'expression des gènes connus pour influencer l'homéostasie de H2Bub tels que *HUB1*, *HUB2*, *UBP26* et *UBP22* dans des transcriptomes de plantules étiolées ou photomorphogéniques, n'a pas permis de mettre en évidence de régulation de ces facteurs à ce niveau. Cependant, l'équipe du Dr Rubio a analysé le niveau de la protéine MYC-AtSGF11 exprimée

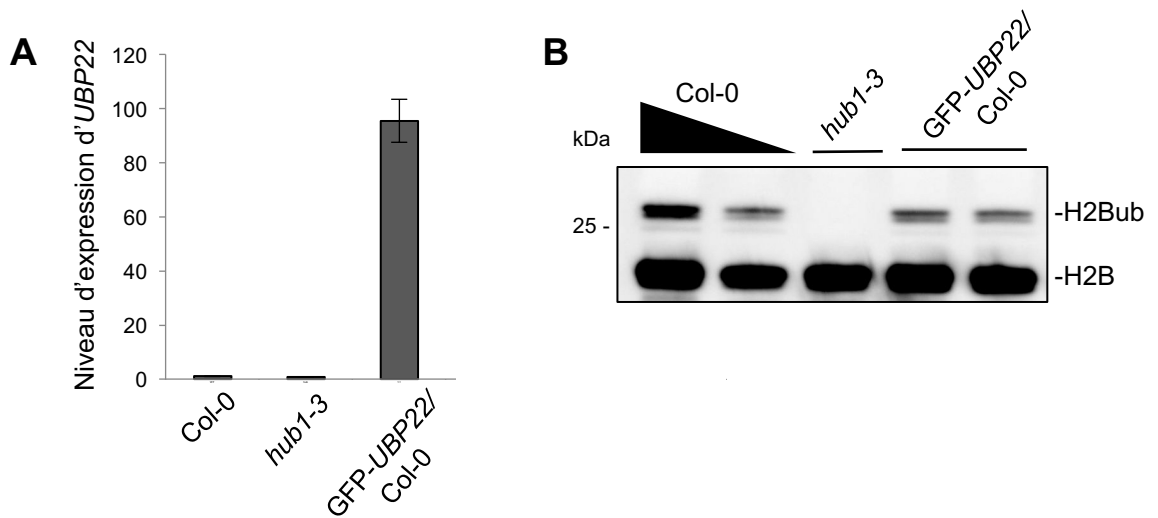


Figure 34. Analyse de la surexpression d'UBPP22-GFP

(A) Analyse par RT-qPCR sur des ARN de plantules de 10 jours, du niveau d'expression d'UBPP22 dans les différentes lignées indiquées (B) Immuno-détection de l'histone H2B et H2Bub sur extraits chromatiniens de plantules de 10 jours grâce à un anticorps reconnaissant H2B.

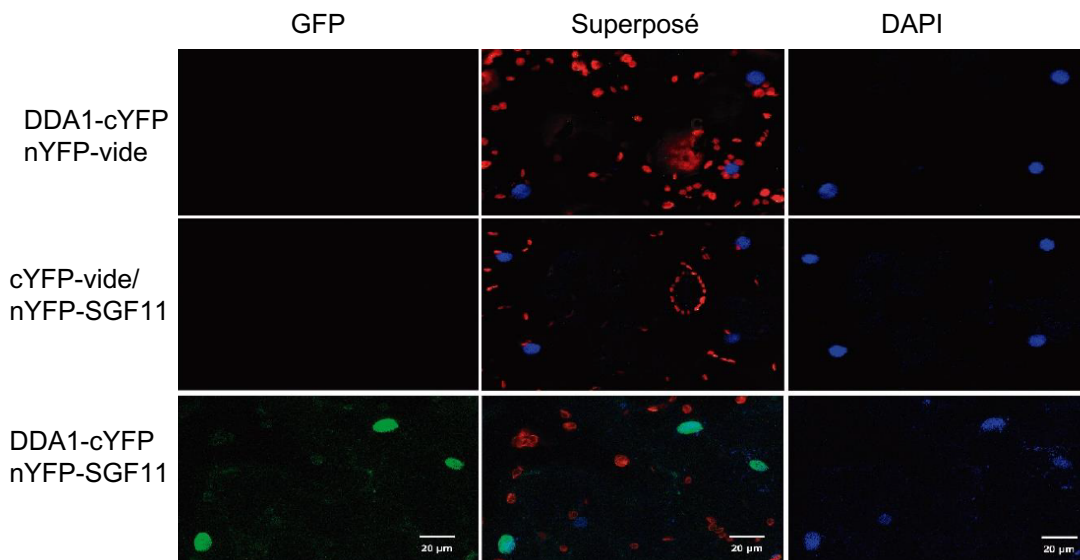


Figure 35. Interaction *in vivo* entre DDA1 et SGF11

Expérience de complémentation par fluorescence Bi-moléculaire (BiFC). Le signal YFP est analysé dans des cellules de feuilles de tabac infiltrées avec différentes protéines fusionnées avec un fragment de la molécule YFP. L'interaction entre les deux protéines permet de restaurer la fluorescence la YFP. Données du laboratoire Rubio CNB Madrid

sous un promoteur 35S dans des plantules cultivées à l'obscurité ou à la lumière et traitées avec l'inhibiteur du protéasome MG132 (Figure 33A). Ceci a montré que MYC-AtSGF11 est plus abondante à la lumière, par rapport à l'obscurité ou cette protéine est peu visible. L'incubation *in vivo* avec le MG132 induit une augmentation de la quantité de MYC-AtSGF11 à la lumière et à l'obscurité ou elle devient fortement présente. Ceci indique que le pool de protéines AtSGF11 est partiellement dégradé par le protéasome durant la skotomorphogenèse.

Au vu de ces résultats, j'ai effectué une première expérience similaire sur des plantules exprimant UBP22-GFP afin de déterminer si l'abondance de la protéine UBP22 est également contrôlée au cours de la photomorphogenèse. De la même manière que pour AtSGF11, UBP22 est beaucoup plus abondante à la lumière qu'à l'obscurité (Figure 33B). Des expériences encore préliminaires réalisées par l'équipe du Dr Rubio confirment cette tendance et montrent également que UBP22 est une protéine poly-ubiquitinée. Ces analyses seront complétées afin de tester la sensibilité d'UBP22 aux inhibiteurs du protéasome et ainsi déterminer si le pool de protéines UBP22 est activement dégradé à l'obscurité, mais aussi à la lumière. L'évolution du niveau de H2Bub et des protéines AtSGF11 et UBP22 peut à première vue sembler contre-intuitif, car si les protéines constituant le module de déubiquitination sont plus abondantes à la lumière, le niveau de H2Bub devrait théoriquement baisser. Néanmoins, comme indiqué précédemment, le passage de l'obscurité à la lumière s'accompagne d'une augmentation d'environ 3 fois du niveau de global de transcription par l'ANR Pol II pour chaque niveau de ploïdie des noyaux (Bourbousse et al 2015) ainsi que de la marque H2Bub (Figure 19D). L'hypothèse retenue à ce stade est qu'il y a un besoin accru de complexes SAGA et de DUBm afin de répondre à un besoin accru d'élongation de la transcription sur de nombreux gènes après passage à la lumière. Ces nouvelles observations concordent ainsi avec un modèle déjà proposé (Bourbousse et al., 2015), dans lequel les noyaux à l'obscurité seraient dans un état de faible transcription potentiellement régulé à grande échelle par la signalisation lumière au cours de cette phase développementale.

La dégradation de AtSGF11 est influencée par DET1

Afin d'étudier un mécanisme potentiel permettant de cibler la dégradation de MYC-AtSGF11, l'équipe de Vicente Rubio s'est focalisée sur un rôle potentiel de DET1. En effet, DET1 et les complexes CDD ou C3D auxquels il est associé sont impliqués dans la dégradation ciblée de protéines en réponse aux signaux de lumière (Yanagawa et al., 2004 ; Bernhardt et al., 2006 ; Chen et al., 2010). Cette possibilité est intéressante au vu de nos observations décrites précédemment que DET1 a à une forte influence sur le niveau global de H2Bub. L'équipe de V. Rubio a donc intégré la construction

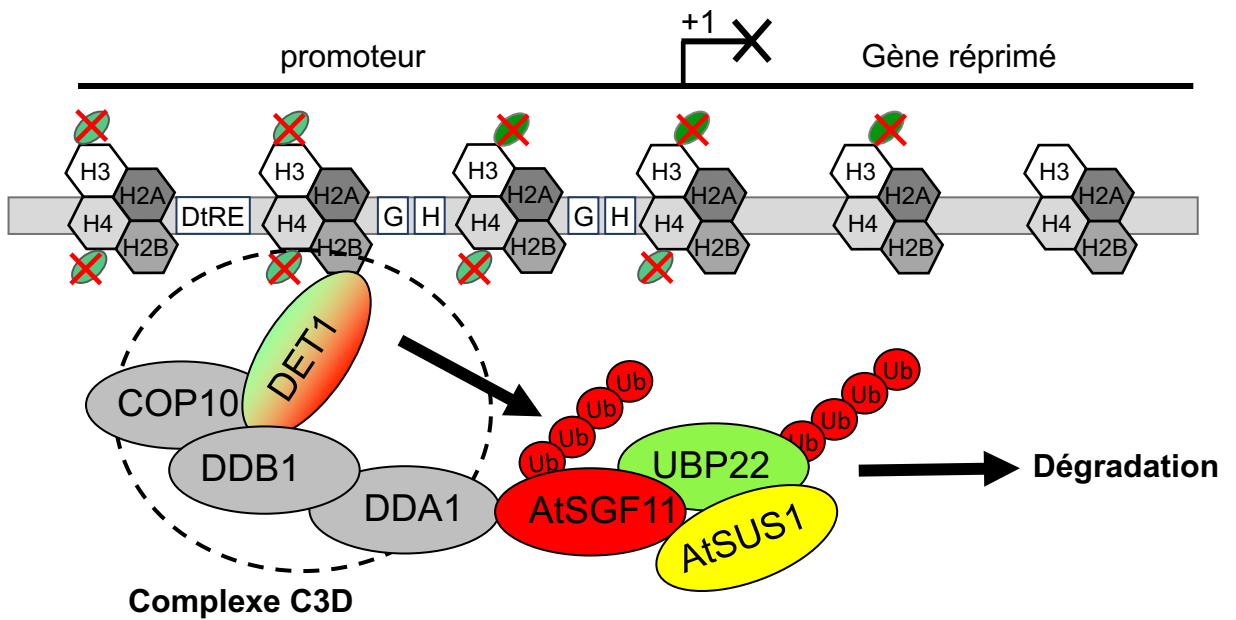


Figure 36. Modèle de régulation du module UBP22 par DET1 et le complexe C3D

D'après nos résultats et ceux du Dr Rubio, le module d'Arabidopsis composé des protéines UBP22, AtSUS1 et AtSGF11 interagirait avec le complexe C3D via les interactions entre DDB1, DDA1 et AtSGF11. Cette interaction permettrait au complexe C3D de poly-ubiquitiner UBP22 et AtSGF11 afin de catalyser leur dégradation par le protéasome, en particulier à l'obscurité.

35S::AtSGF11-MYC dans la lignée mutante *det1-1* par croisement afin de poursuivre l'analyse de la stabilité de la protéine MYC-AtSGF11. Dans cette expérience, son abondance est élevée quelles que soient les conditions, en particulier à l'obscurité et ceci même en absence de MG132 (Figure 33C). La protéine DET1 est donc nécessaire pour maintenir un bas niveau de MYC-AtSGF11 en amont de l'effet du protéasome. Il reste nécessaire de tester si, de la même manière que pour AtSGF11, la dégradation d'UBP22 est également dépendante de DET1. Afin de tester cette hypothèse, j'ai récemment intégré le transgène UB22-GFP dans un fonds mutant *det1-1*. Les premières analyses effectuées montrent que, comme pour SGF11, le niveau d'UBP22-GFP est plus élevé dans le fonds *det1-1* (données non montrées). Cette analyse préliminaire sera répétée.

Dans leur ensemble, les observations faites à ce stade permettent de proposer un modèle pour l'action large de DET1 sur H2Bub. D'une part, nous avons montré que l'abondance des protéines UB22 et AtSGF11 ainsi que H2Bub est finement régulée par la lumière. D'autre part, DET1 participerait à la régulation de l'abondance du module de déubiquitination de H2Bub par dégradation protéasomale de la protéine AtSGF11 et potentiellement aussi d'UB22. Ainsi, la perte de fonction de DET1 induirait une abondance et une activité exagérée d'UB22 induisant un faible niveau de H2Bub dans ce mutant. L'hypothèse de l'effet dominant d'une surexpression d'UB22 sur la marque H2Bub a été testée. Pour ceci, j'ai introduit le transgène *UB22::UB22-GFP* dans un fonds de type sauvage, menant à une surexpression d'UB22 (Figure 34A). Dans cette lignée, le niveau de H2Bub est environ 2 fois plus faible dans ces plantes par rapport aux plantules de type sauvage indiquant que UB22 est un facteur limitant de l'enlèvement de H2Bub chez *Arabidopsis* (Figure 34B). En plus de ces résultats, l'équipe de V. Rubio a identifié une interaction entre AtSGF11 et DDA1 dans un crible double hybride (Irigoyen et al., 2014) et a confirmé cette interaction *in vivo* plus récemment par BiFC (Figure 35). Ces observations suggèrent un lien direct entre le contrôle de l'abondance de la protéine UB22 par la signalisation de la lumière impliquant DET1 avec un contrôle du niveau global de H2Bub (Figure 36).

AtSGF11 et UB22 sont des régulateurs positifs de la fonction de DET1 à l'obscurité

Au vu du modèle ci-dessus, il reste nécessaire de tester l'influence fonctionnelle d'UB22 et du module UB22-AtSGF11-AtSUS1 sur les réponses des plantes à la lumière, et en particulier sur la photomorphogénèse. Dans une première approche, l'équipe de Vicente Rubio a étudié l'effet des mutations *det1-1*, *sgf11-1* et *ubp22* sur le phénotype photomorphogénique. Pour ceci, j'ai également croisé les lignées *ubp22* et *det-1* et l'équipe de V. Rubio a fait de même pour *sgf11-1* et *det1-1*. Pour tester leur phénotype photomorphogénique, des graines ont été cultivées 3 jours à l'obscurité avant de mesurer la longueur des hypocotyles, un marqueur quantitatif de la photomorphogénèse

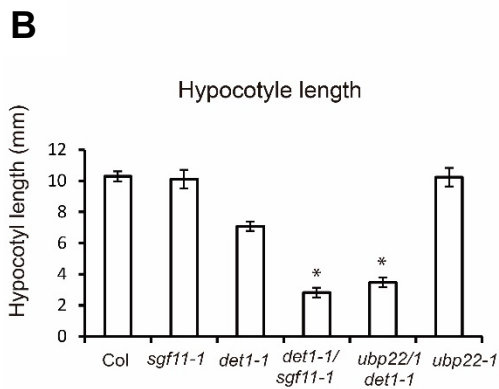


Figure 37. Analyse de la longueur d'hypocotyle chez différents mutants et double mutants
(A) Photo représentative de plantules Col-0, *sgf11-1*, *det1-1*, *det1-1/sgf11-1*, *ubp22/det1-1* et *ubp22* ayant poussé 3 jours à l'obscurité totale. **(B)** Graphique représentant la taille d'hypocotyle de 30 plantules, 3 jours après germination dans l'obscurité totale pour chaque génotype étudié.

(Fankhauser and Casal, 2004). Ceci a montré que les mutants *ubp22* et *sgf11-1* ont un phénotype étiolé et une élévation de l'hypocotyle similaire aux plantules Col-0. Comme attendu, le mutant *det1-1* est marqué par un phénotype dé-étiolé à l'obscurité avec un hypocotyle très court, des cotylédons développés et ouverts (Figure 37). De manière très intéressante, les plantules *det1-1sgf11-1* et *det1-1ubp22* sont encore plus affectées que le mutant *det1-1*, leur hypocotyle est d'environ 3mm contre 6-7 pour *det1-1* et 10 pour les autres génotypes. Ces résultats suggèrent un effet synergique des mutations *ubp22* et *sgf11-1* sur le phénotype de *det1-1*. Ainsi, ces deux gènes agiraient à différentes étapes du même processus ou participeraient à des processus convergents pour contrôler l'élévation de l'hypocotyle.

Conclusion

Nous avons donc montré que dans des plantules ayant germé à l'obscurité et étiolées, les sous-unités AtSGF11 et UBP22 du module de déubiquitination de type SAGA d'Arabidopsis sont moins abondantes et le niveau de H2Bub est plus bas qu'à la lumière. Ces observations corrélerent avec la faible activité transcriptionnelle de l'ARN Pol II dans les noyaux de cotylédons étiolés. De plus, DET1 est impliqué dans la dégradation de AtSGF11 et potentiellement aussi d'UBP22, influençant probablement l'activité chromatinienne de ce module à l'obscurité, en accord à la fois avec la faible abondance de H2Bub à l'obscurité d'une part et dans les plantules mutantes *det1-1*, et d'autre part avec l'observation que UBP22 est un facteur limitant de la déubiquitination de H2Bub. Une hypothèse raisonnable est que la dégradation contrôlée de ce module serait adaptée au programme transcriptionnel skotomorphogénique à l'obscurité, hypothèse appuyée par le phénotype aggravé des doubles mutants *det1-1/sgf11-1* et *det1-1/ubp22* par rapport au simple mutant *det1-1*.

RESULTATS PARTIE 2

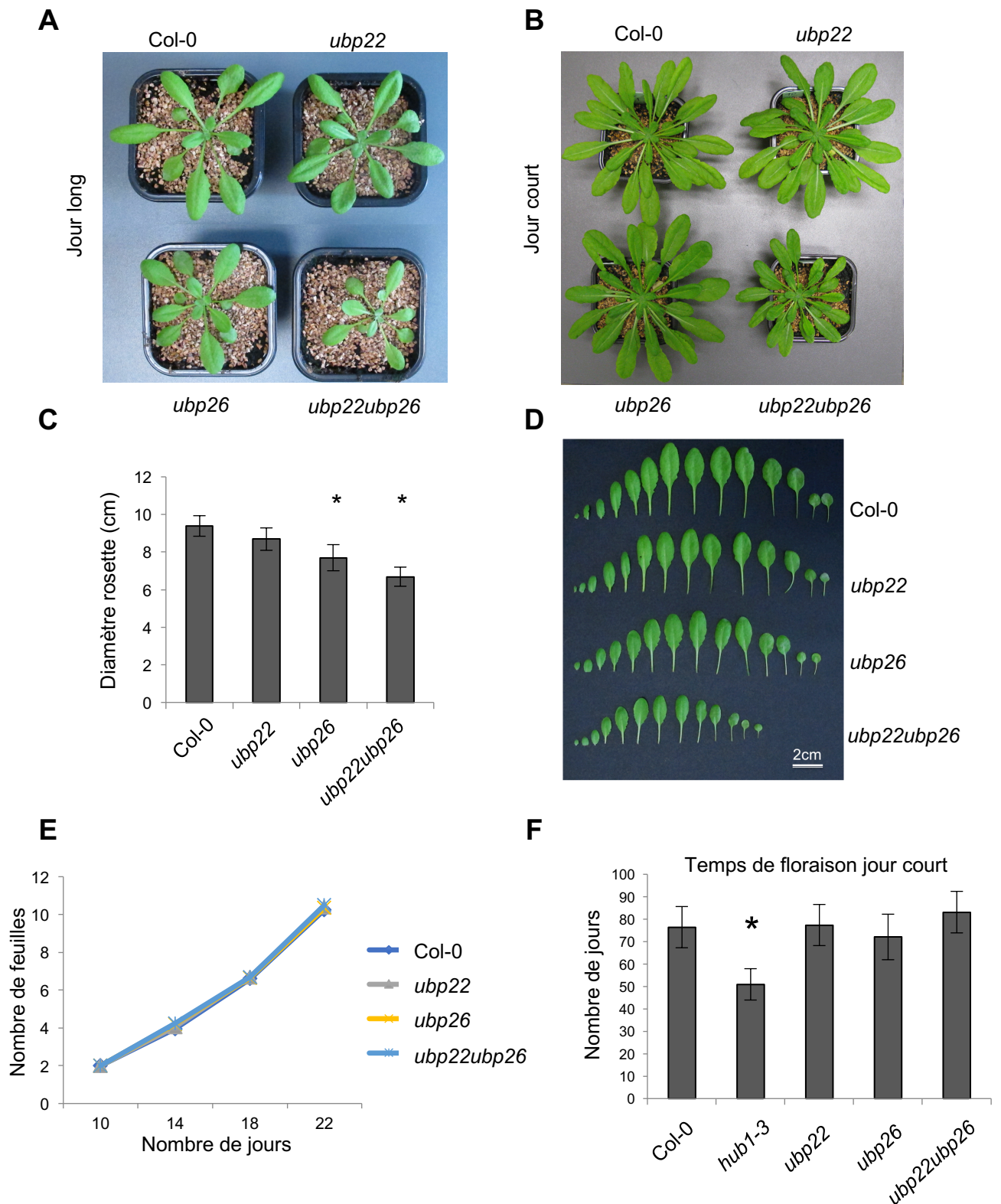


Figure 38. Etude du développement végétatif chez les mutants *ubp22*, *ubp26*, *ubp22ubp26* comparés à la lignée sauvage

Photo représentative d'une plante de chaque mutant, comparée à une plante de type sauvage de quatre semaines après la germination dans des conditions de jour long (A) et jour court (B). (C) Mesure du diamètre de 20 plantes pour chaque génotype sauvage 4 semaines après la germination dans des conditions de jour long. (D) Dissection des feuilles d'une plante représentative pour chaque mutant comparée à une plante sauvage 4 semaines après la germination. (E) Etude de l'évolution du nombre de feuilles sur 20 plantes pour chaque génotype. (F) Analyse du temps de floraison sur 16 plantes de chaque génotype. (*) test de student significativement différent du Col-0 avec $P_{val} < 0,01$

2. Analyse fonctionnelle des gènes *UBP22* et *UBP26*

Contexte

Après avoir montré l'association d'*UBP22* à un module de déubiquitination et identifié son implication sur le contrôle de H2Bub dans la première partie de ma thèse, je me suis intéressé à rechercher son influence sur la biologie de la plante et des possibles connections ou spécificités de fonction par rapport à *UBP26*, une autre déubiquitinase de H2Bub encore partiellement caractérisée. La présence d'*UBP22* au sein d'un module de type SAGA et l'implication d'*UBP26* dans le silencing d'éléments transposables ne signifie pas pour autant que les fonctions de ces protéines soient complètement distinctes. Elles pourraient par exemple cibler des gènes communs comme observé pour *Ubp8* et *Ubp10* chez *S. cerevisiae*. En effet, une étude a montré qu'*UBP26* dans l'écotype C24 est impliquée dans l'induction du gène *FLC* (Schmitz et al., 2009) suggérant qu'*UBP26* pourrait aussi agir en tant que facilitateur de la transcription. Dans cette deuxième partie j'ai recherché l'effet d'une perte de fonction d'*UBP22* et/ou d'*UBP26* sur le développement, l'expression des gènes et le dépôt de H2Bub au niveau génomique afin de préciser leur impact moléculaire sur la chromatine. L'analyse d'une possible redondance fonctionnelle entre *UBP22* et *UBP26* a également été entreprise après génération d'un double mutant *ubp22-1ubp26-2*.

2.1 Effet synergique d'*ubp22* et *ubp26* sur la physiologie, la chromatine et l'expression des gènes

Le double mutant *ubp22ubp26* est affecté dans son développement végétatif

Afin d'étudier les liens génétiques entre *UBP22* et *UBP26*, j'ai croisé les lignées mutantes *ubp22-1* et *ubp26-2* (*sup32-2* ; Sridhar et al. 2007) et obtenu une lignée double mutante *ubp22-1ubp26-2* (annotée *ubp22ubp26* dans la suite de cette thèse). J'ai comparé le développement végétatif des mutants *ubp22*, *ubp26* et *ubp22ubp26* avec la lignée Col-0 en condition de jour long (Figure 38A) ou jour court (Figure 38B). D'après mes analyses, la mutation *ubp22* n'a pas d'impact significatif sur le développement végétatif au stade rosette, alors que le mutant *ubp26* montre un développement plus hétérogène avec certaines plantes possédant un diamètre légèrement plus faible 4 semaines après germination. Le développement des plantes *ubp22ubp26* est nettement plus affecté, avec un diamètre de la rosette visiblement plus petit en conditions de jour court ou long. La mesure du diamètre de 20 plantes de chaque génotype confirme que ces différences sont significatives (Figure 38C), la rosette du simple mutant *ubp26* est légèrement plus petite et celle du double mutant *ubp22ubp26* qui est environ 20% plus petite que celle sauvage. La dissection de plantes de chaque génotype (Figure 38D) montre

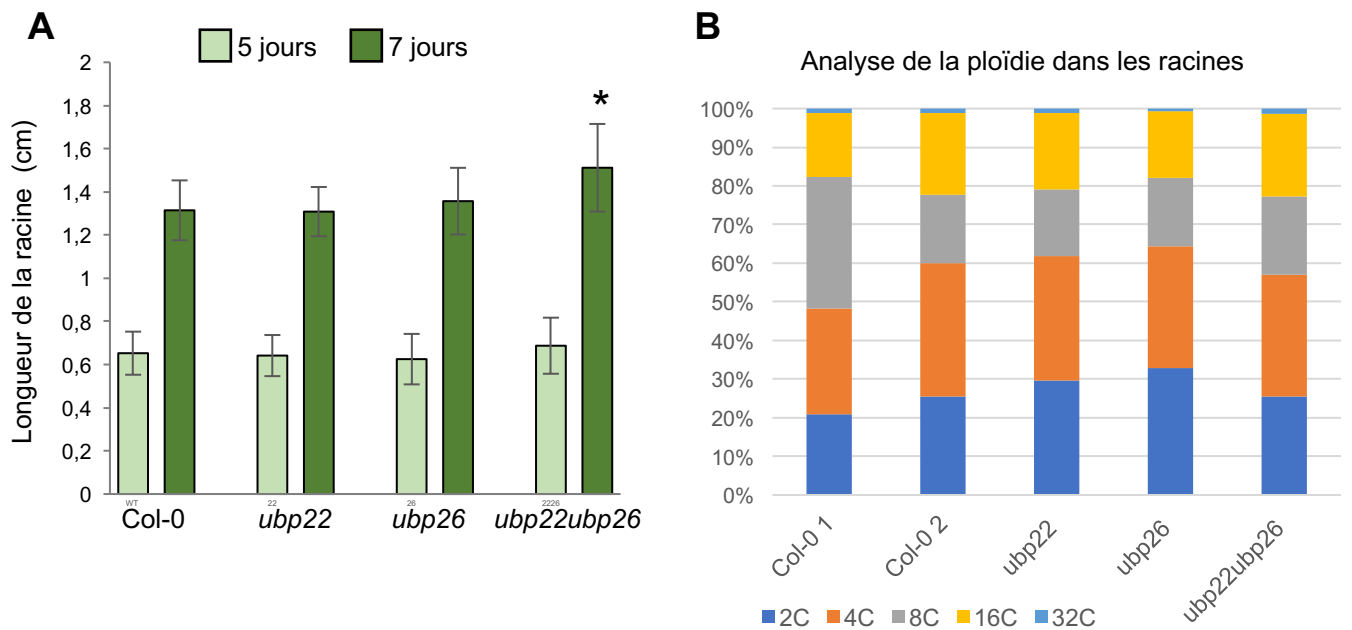


Figure 39. Etude du développement racinaire

(A) Mesures de la taille de la racine sur des plantules 5 et 7 jours après germination (* = T-test p-value <0,05) (B) Quantification de la ploïdie des noyaux de racines 7 jours après germination par cytométrie de flux sur un minimum de 11000 noyaux.

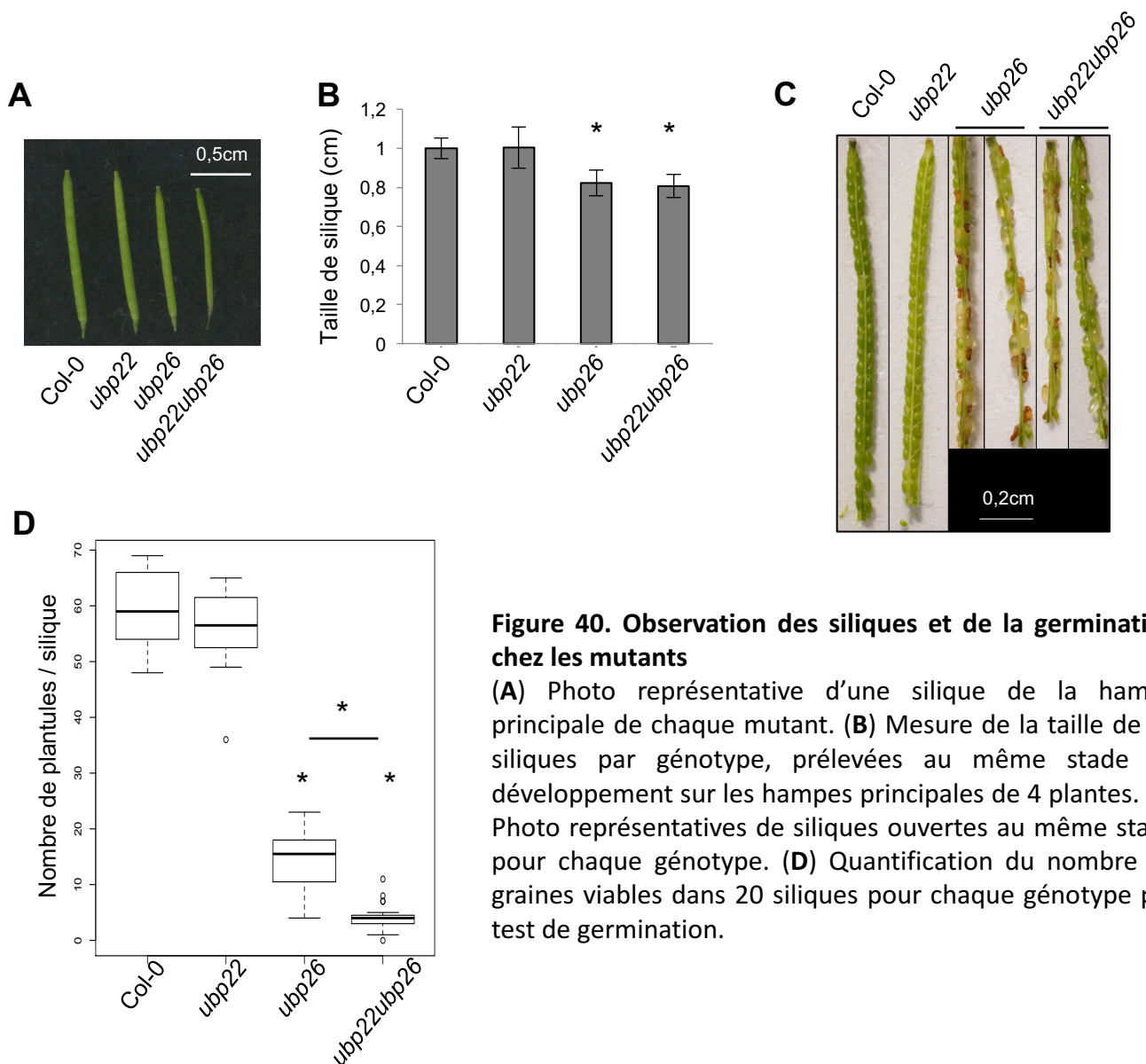


Figure 40. Observation des siliques et de la germination chez les mutants

(A) Photo représentative d'une silique de la hampe principale de chaque mutant. (B) Mesure de la taille de 20 siliques par génotype, prélevées au même stade de développement sur les hampes principales de 4 plantes. (C) Photo représentatives de siliques ouvertes au même stade pour chaque génotype. (D) Quantification du nombre de graines viables dans 20 siliques pour chaque génotype par test de germination.

que les feuilles du double mutant sont plus petites que celles des autres génotypes. Un retard de croissance pouvant potentiellement expliquer la petite taille des plantes, j'ai suivi l'évolution du nombre de feuilles pour chaque génotype sans remarquer de différence par rapport à la lignée de type sauvage (Figure 38E). De plus, aucune altération du temps de floraison n'est observée chez les mutants par rapport à la lignée Col-0 en condition de jour court, le mutant *hub1-3* affecté dans la mono-ubiquitination de H2B servant de contrôle de floraison précoce. L'aggravation significative du phénotype très léger des plantes *ubp26* observée dans le double mutant indique un certain niveau de redondance fonctionnelle entre *UBP22* et *UBP26*, la fonction d'un gène pouvant apparemment compenser l'absence de l'autre pour la croissance des feuilles de rosette. La petite taille des feuilles du double mutant pourrait être la conséquence d'une dérégulation du cycle cellulaire ou du mécanisme d'endoréplication.

Le double mutant *ubp22ubp26* est affecté dans son développement racinaire

Le développement racinaire étant très sensible aux variations du cycle cellulaire, l'évolution de la taille de la racine principale sur des plantules de chaque génotype a été mesurée. A partir de 7 jours après germination, les plantules *ubp22ubp26* possèdent une racine principale significativement plus longue que les plantules de type sauvage Col-0 (Figure 39). Afin de déterminer si cette différence de taille est due à une différence de ploïdie, les noyaux de racines de 7 jours ont été extraits pour chaque génotype et leur quantité d'ADN déterminée par cytométrie de flux (Figure 39C). Après analyse des populations de noyaux obtenues (plus de 11000 noyaux par génotype), on observe que tous les génotypes présentent une ploïdie jusqu'à 32C et que les proportions pour chaque niveau de ploïdie dans les racines des plantes *ubp22ubp26* ne présentent pas de différences majeures. Ces résultats préliminaires sont à reproduire afin de pouvoir effectuer une analyse statistique sur la ploïdie des noyaux et mieux caractériser ce phénotype de longueur racinaire. Une caractérisation du méristème racinaire sera également entreprise afin d'étudier un potentiel problème de division ou de différenciation cellulaire impactant la longueur de la racine principale dans le double mutant.

L'effet de la mutation *ubp26* sur le développement de la graine est aggravé dans *ubp22ubp26*

Le gène *UBP26* a été caractérisé pour son effet sur le développement des graines. Comme montré précédemment (Luo et al., 2008), environ 20% des ovules sont avortés, impactant la taille de la silique. De plus, environ 60% des graines formées contiennent des embryons dont le développement

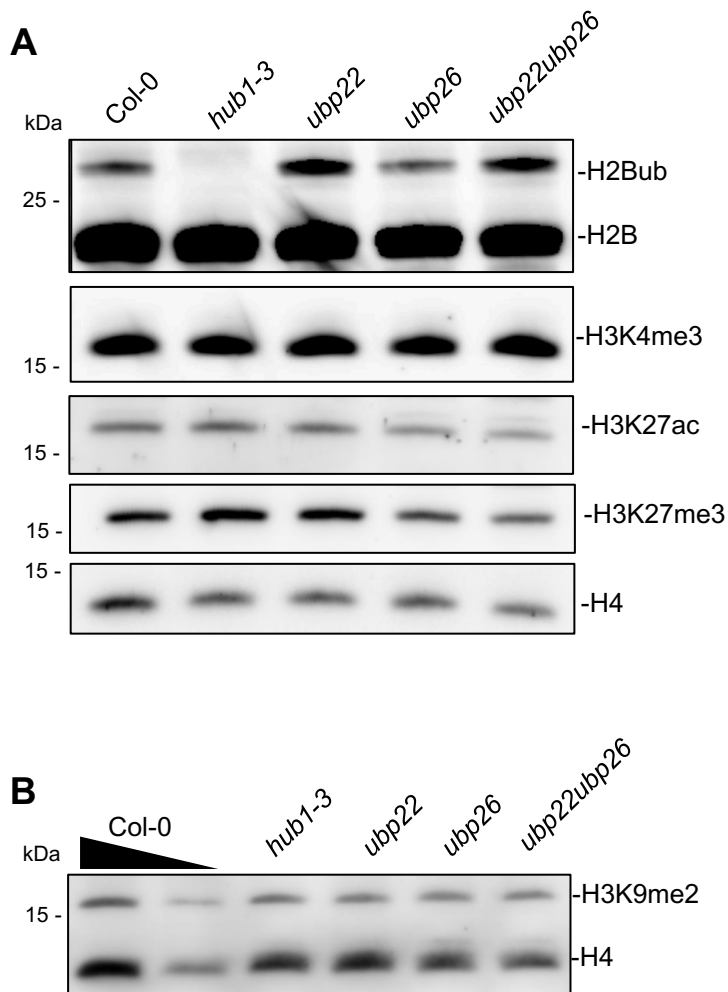


Figure 41. Etude de l'impact de la double mutation *ubp22ubp26* sur différentes marques de la chromatine

(A) Immuno-détection des marques H2B, H2Bub, H3K4me3, H3K27ac et H3K27me3 sur extraits chromatiniens de plantules de 7 jours utilisant H2B et H4 comme témoins de charge. (B) Immuno-détection de l'histone méthylé H3K9me2 sur extraits chromatiniens de plantules de 7 jours.

s'arrête prématurément à différents stades. Cet effet n'est pas dû à la qualité du pollen qui est totalement viable, et n'est pas maternel sporophytique (Luo et al. 2008).

Contrairement aux plantes *ubp26*, les siliques du mutant *ubp22* ont une apparence parfaitement normale sans embryon avorté ni graines dont le développement est arrêté (Figure 40). Par ailleurs, les plantes *ubp22ubp26* ont des siliques environ 20% plus petites que les plantes de type sauvage (Figure 40A.B), un phénotype probablement également dû à l'avortement d'embryons lors de leur développement dans le double mutant comme pour *ubp26*. Après ouverture des siliques, on remarque la présence de graines "froissées ou shriveled" dans les siliques des plantes *ubp22ubp26* comme décrit précédemment pour *ubp26*, avec une certaine hétérogénéité entre chaque silique (Figure 40C). Afin d'évaluer la production de graines viables, 20 siliques ont été collectées puis semées sur des boîtes de pétri individuelles avant de compter le nombre de plantules capables de germer par boîte (Figure 40D). Alors que les plantes *ubp22* produisent en moyenne environ 60 graines par silique comme le type sauvage Col-0, le mutant *ubp26* n'en produit que 16 et le double mutant *ubp22ubp26* uniquement 4. Cette aggravation du phénotype d'*ubp26* est une autre indication supplémentaire d'une redondance fonctionnelle partielle entre *UBP22* et *UBP26*.

Impact de la double mutation sur les marques de la chromatine

Après la mise en évidence d'une redondance fonctionnelle partielle entre les gènes *UBP22* et *UBP26*, je me suis intéressé à l'effet de l'inactivation conjointe d'*UBP22* et *UBP26* sur le niveau de plusieurs marques chromatinienne par immuno-détection sur extraits chromatiniens. Concernant H2Bub, on observe un fort gain dans le double mutant *ubp22ubp26*, similaire à celui observé préalablement dans *ubp22* (Figure 41A). Aucun changement majeur n'est observé pour le niveau de H3K4me3, le dépôt et l'enlèvement de cette marque semble donc s'effectuer largement indépendamment de l'enlèvement de H2Bub dans les mutants étudiés, alors qu'une légère baisse de la marque H3K27ac est visible dans les mutants *ubp26* et *ubp22ubp26*. De façon assez inattendue, les plantules *ubp26* montrent une diminution forte de la marque H3K27me3 qui semble légèrement aggravée dans le double mutant *ubp22ubp26*. L'effet de la mutation *ubp26*, et potentiellement aussi de la double mutation *ubp22ubp26*, sur H3K9me2 est probablement trop subtil pour être détectable dans ce type d'analyse. Ces premières analyses seront à développer afin d'avoir une estimation plus précise de l'impact des UBP sur l'acétylation de l'histone H3, potentiellement en interconnexion avec l'activité d'acétylation du complexe SAGA. Également, l'influence d'*UBP26* sur l'acquisition ou le maintien d'un haut niveau de H3K27me3 met en avant un possible effet sur la répression polycomb des gènes. La protéine *UBP26* est à ce jour connue pour son effet sur le silencing et le dépôt de la marque H3K9me2 au niveau de certains éléments transposables tels que *AtMULE*, *AtGP1* et *AtLINE1*-

A

	Gènes surexprimés	Gènes sous-exprimés	Total
<i>ubp22</i>	44 (21%)	163 (79%)	207
<i>ubp26</i>	271 (40%)	413 (60%)	684
<i>ubp22ubp26</i>	355 (37%)	596 (63%)	951

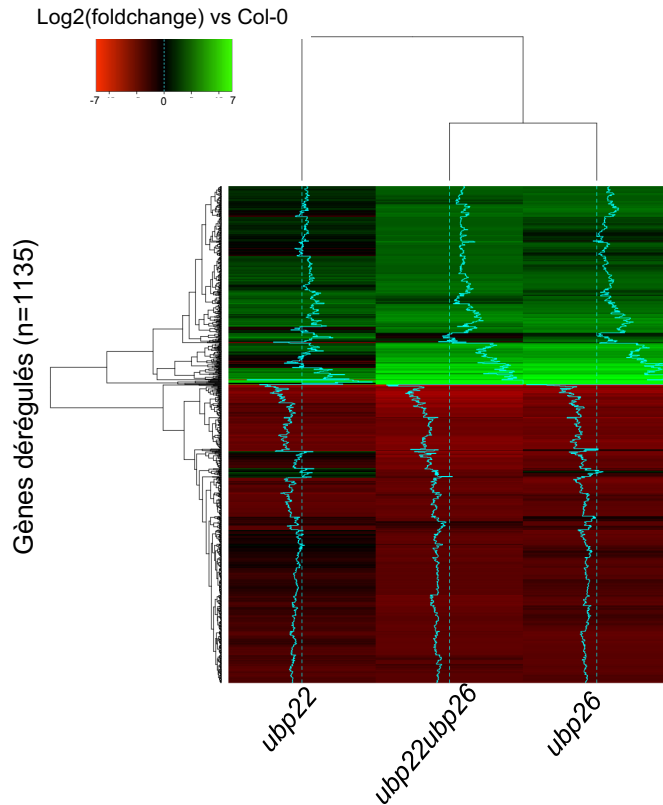
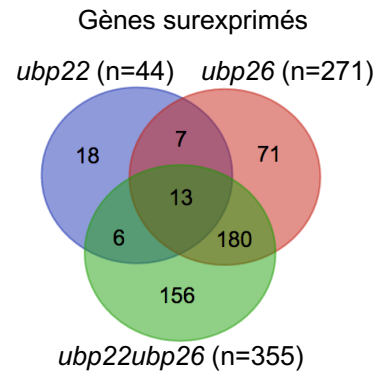
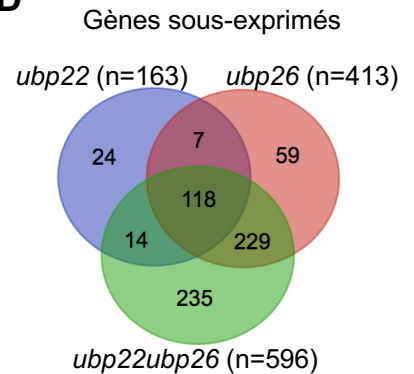
B**C****D**

Figure 42. Etude de l'expression des gènes chez les différents mutants par séquençage d'ARN

(A) Tableau récapitulatif du nombre de gènes dérégulés dans leur expression pour chaque mutant (BH_pval<0,05 ; -1>Log₂(FC)>1). (B) Représentation par heatmap des changements d'expression de l'ensemble des gènes impactés chez au moins un mutant. Diagramme de Venn de montrant le recouvrement entre les gènes surexprimés (C) ou les gènes sous-exprimés (D) chez les différents mutants (BH_pval<0,05 ; 1>Log₂(FC)<-1).

4 (Sridhar et al. 2007). A ce niveau de résolution, aucun changement majeur n'est observé pour H3K9me2 dans les mutants étudiés (Figure 41B).

Etude de l'expression des gènes dans les lignées mutantes pour *UBP22* et *UBP26*

Afin d'obtenir une première vision de l'impact général des pertes de fonction d'*UBP22* et *UBP26* sur le profil d'expression des gènes à un stade de développement donné, j'ai effectué un séquençage des ARN des parties aériennes de plantules de 7 jours. Le nombre de gènes significativement dérégulés dans chaque génotype par rapport à la lignée de type sauvage Col-0 est résumé dans un tableau Figure 42A. La première observation est que la perte de fonction d'*UBP22* impacte l'expression d'environ 207 gènes, un faible nombre comparé aux 684 et 951 gènes dérégulés respectivement dans les lignées *ubp26* et *ubp22ubp26*.

En accord avec une activité d'*UBP22* de type SAGA qui favoriserait la transcription, une forte distorsion dans la proportion des gènes dérégulés est observée dans *ubp22* : environ 80% des gènes dérégulés sont sous-exprimés (163 vs 44 gènes). En considérant l'excès important de H2Bub dans les plantes *ubp22* et le rôle potentiel d'*UBP22* dans la transcription des gènes, le nombre de 207 gènes dérégulés dans *ubp22* paraît cependant faible. Une analyse de catégorie de fonction indique que les gènes sous-exprimés dans *ubp22* sont majoritairement impliqués dans des réponses à différents stimuli comme l'auxine, les substances organiques et les signaux endogènes. A ce stade, on peut émettre les hypothèses que 1) la perte de fonction d'*UBP22* a un impact faible sur l'expression de gènes développementaux et que 2) dans des conditions de culture stables et optimales, l'absence d'*UBP22* n'est pas critique pour que la plupart des gènes soient correctement exprimés. Au niveau moléculaire, les plantes *ubp22* seraient largement capables de s'adapter à l'absence d'enlèvement de H2Bub par *UBP22*, soit parce que cette protéine participerait à un mécanisme facultatif, par exemple d'optimisation des changements d'expression, comme montré pour le dépôt de H2Bub (Bourbousse et al, 2012), soit parce que d'autres ubiquitine protéases telles que *UBP26* compensent au moins partiellement son absence.

En revanche, de façon contre-intuitive, cette expérience montre que la majorité des gènes dérégulés dans *ubp26* sont également majoritairement sous-exprimés (60%). De plus, malgré un effet assez faible sur le niveau global de H2Bub, la perte de fonction d'*UBP26* impacte un grand nombre de gènes. La protéine *UBP26* semble donc impliquée dans différents processus chromatinien avec un impact plus fort sur la régulation des gènes qu'*UBP22*.

Ces analyses comparatives des transcriptomes ont été affinées par croisement des listes de gènes dérégulés dans ces trois lignées. La représentation des résultats en diagramme de Venn permet

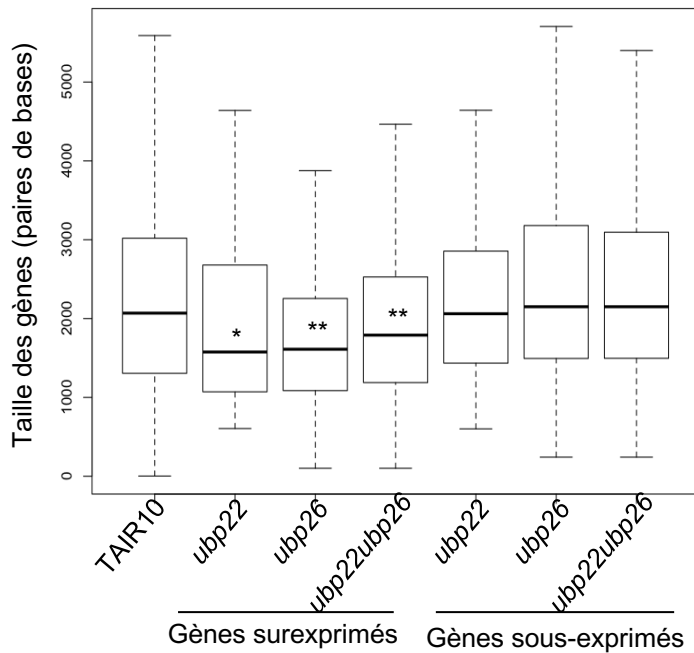
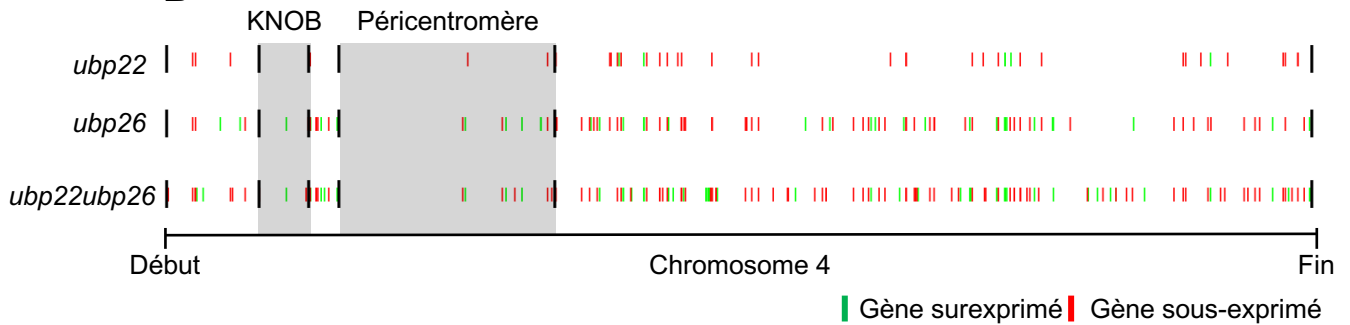
A**B**

Figure 43. Etude de la taille des gènes dérégulés et de leur position sur le chromosome 4

(A) Représentation par boxplot de la taille des gènes surexprimés (BH_pval<0,05 ; Log₂(FC)>1) et sous exprimés (BH_pval<0,05 ; Log₂(FC)<-1) dans chaque mutant (* = T test pval < 0,05 ; ** = T test pval < 0,01). (B) Représentation schématique du chromosome 4 et de la position des gènes dérégulés dans chaque mutant.

	<i>ubp22</i>	<i>ubp26</i>	<i>ubp22ubp26</i>
LHY	-1,0	-1,6	-2,5
CCA1	-1,3	-1,9	-2,5
CCR2	0,0	0,8	0,9
PRR9	-1,1	-1,1	-0,9
GI	0,0	-0,4	0,0
RVE8	-1,1	-1,6	-2,3
NOX	0,0	-0,6	-0,7
LUX	0,0	0,5	0,9
PRR7	0,0	0,0	0,4
ELF3	0,0	0,0	0,4
PHYB	0,0	-0,5	-0,6

Figure 44. Changements d'expression de gènes de l'horloge

Tableau récapitulatif des changements d'expression de gènes impliqués dans le fonctionnement de l'horloge circadienne obtenus par RNA-seq (log₂(FC)).

tout d'abord d'observer un fort recoupement entre les différentes listes de gènes dérégulés dans les simples et le double mutant, en particulier entre *ubp26* et *ubp22ubp26* (Figure 42C.D). Ceci illustre un certain niveau de spécificité de l'analyse, et potentiellement un ciblage commun de nombreux gènes par UBP22 et UBP26.

Le double mutant *ubp22ubp26* est impacté de manière plus importante que *ubp26* en termes de nombre de gènes dérégulés que les mutants simples, indiquant des effets additifs et potentiellement une certaine redondance fonctionnelle entre *UBP22* et *UBP26*. Notamment, une partie importante des gènes surexprimés est commune à *ubp26* et *ubp22ubp26* (Figure 42C). Une représentation par heatmap de l'amplitude du changement d'expression par rapport à la lignée Col-0 met en évidence la similarité des changements d'expression observés entre *ubp26* et *ubp22ubp26*, le mutant *ubp22* étant visuellement relativement similaire mais avec une amplitude des changements observés bien plus faible (Figure 42B).

De façon intéressante, l'analyse de catégorie de fonction des 271 gènes surexprimés dans *ubp26* et des 355 surexprimés dans *ubp22ubp26* monte une implication dans plusieurs processus communs à ces deux mutants mais pas à *ubp22*, comme la localisation et le transport des lipides et des macromolécules. Parmi ces gènes, on trouve notamment *SESA1*, *SESA2*, *SESA3*, *SESA4* (SEed Storage Albumine) et *OLEO4* qui sont impliqués dans la mise en réserve des lipides dans la graine et sont surexprimés dans *ubp26* et *ubp22ubp26*. La surexpression de ces gènes en rapport avec le transport des lipides dans la graine pourrait expliquer les problèmes de formation des graines dans ces lignées (Figure 40). On observe également que 156 gènes sont surexprimés uniquement dans le double mutant. La régulation de ces gènes impliquerait donc potentiellement indifféremment UBP22 ou UBP26, et ils pourraient être la cible d'une activité redondante d'UBP22 et d'UBP26. De façon similaire, 235 gènes sont sous-exprimés dans le double mutant uniquement. Concernant les quelques gènes sous-exprimés dans la lignée *ubp22* (163), ils sont en majorité sous-exprimés également dans *ubp26* et *ubp22ubp26* (Figure 42D). L'expression de ces gènes semble être très sensible à un excès de H2Bub ou aux dynamiques d'enlèvement de la marque, et nécessiterait donc à la fois les activités d'UBP22 et d'UBP26 pour une induction optimale, au niveau de résolution obtenu par analyse de plantules entières.

La comparaison de la taille des gènes sur/sous-exprimés dans chaque mutant comparée à la taille moyenne des gènes révèle que pour chaque mutant, les gènes sous-exprimés sont significativement plus petits, en particulier pour *ubp26* et *ubp22ubp26* (Figure 43A). A l'inverse, les gènes surexprimés sont d'une taille similaire à la moyenne des gènes. La position des gènes dérégulés situés sur le chromosome 4 pour chaque mutant ne montre pas de distribution spécifique, les gènes dérégulés sont en majorité localisés le long des bras chromosomiques (Figure 43B). Cette observation

Chromosome 5 : 26 mb

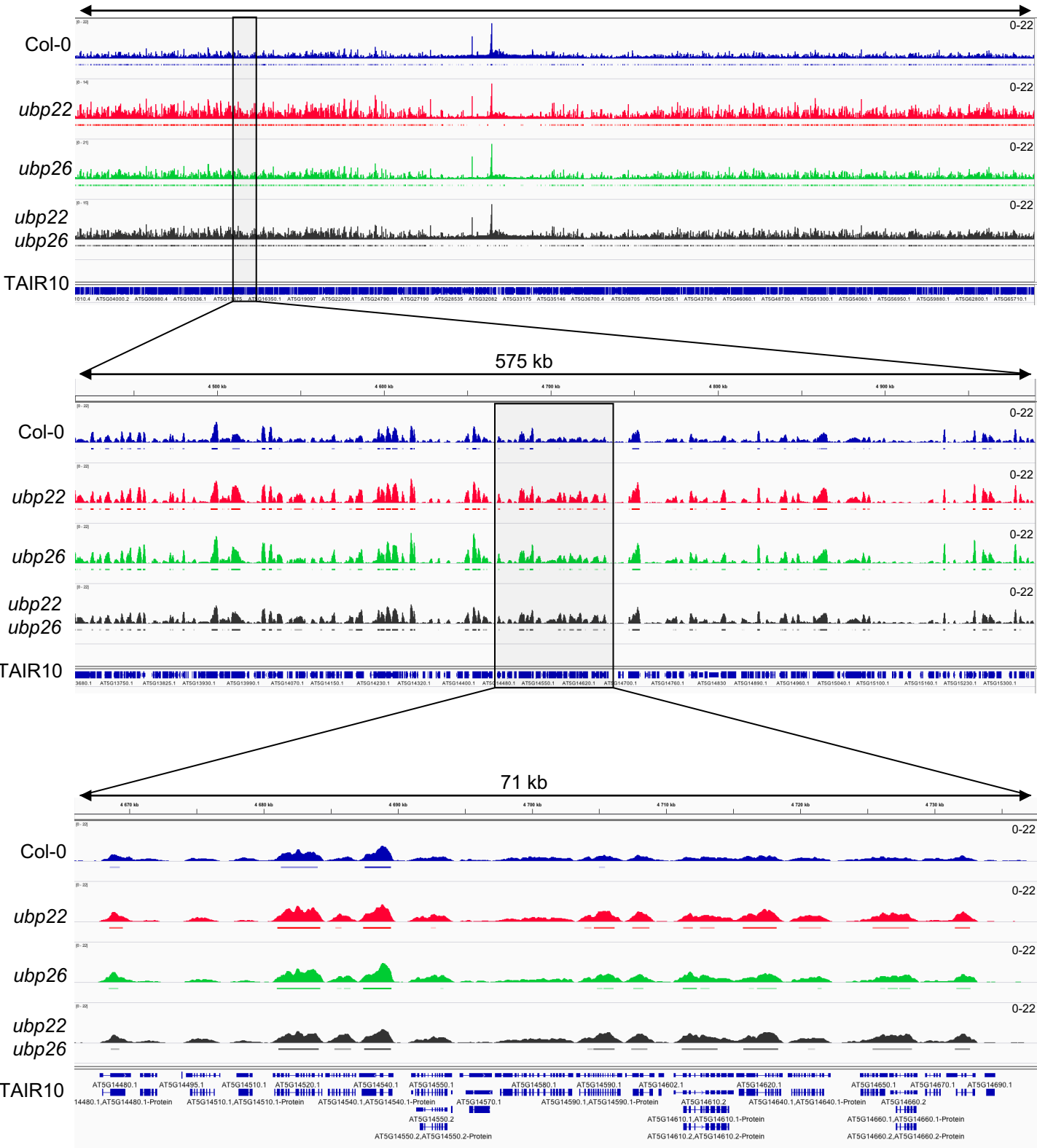


Figure 45. Visualisation de la marque H2Bub dans les différents génotypes
 Utilisation de fichiers bigWig à la même échelle et combinant les deux répliquas générés par Macs2 lors de l'annotation des pics pour chaque génotype et des fichiers résultant de l'appel des pics (barres colorées). En haut pour visualiser le chromosome 5 est montré en entier, puis zoomé sur une région d'intérêt déterminée par croisement des listes de gènes marqués par H2Bub, dans laquelle plusieurs gènes gagnent un domaine H2Bub dans les mutants.

contraste nettement avec l'impact de la perte de fonction de Ubp10 chez la levure *S. Cerevisiae*. En effet, Ubp10 retire H2Bub dans les régions télomériques pour permettre le silencing des télomères et des régions sub-télomériques affectant ainsi un gradient de gènes sub-télomériques (Emre et al., 2005 ; Gardner et al., 2005). Si ce mécanisme est conservé chez *A. thaliana*, *UBP26* et *UBP22* n'y sont pas impliquées.

L'expression des gènes de l'horloge est affectée dans les mutants *ubp22* et *ubp26*

L'expérience de séquençage des ARN des différentes lignées mutantes décrites ici n'est pas spécifiquement adaptée à l'étude de l'expression des gènes contrôlés par l'horloge circadienne. Néanmoins, les conditions de photopériode et de changements de température entre le jour et la nuit utilisées ont permis d'entraîner l'horloge circadienne dans la plupart des cellules des plantules. Tous les échantillons ont été récoltés en début d'après-midi. Dans ces conditions non dynamiques, à un moment de la journée ou de nombreux gènes de l'horloge ne sont pas dans leur pic d'expression, plusieurs gènes de l'horloge circadienne sont impactés (Figure 44). Dans ce tableau récapitulatif des changements d'amplitude de l'expression des gènes impliqués dans l'horloge circadienne, on remarque que l'expression de plusieurs gènes comme *LHY*, *CCA1* et *RVE8* est particulièrement diminuée dans tous les mutants. Cette diminution est plus élevée, touche plus de gènes dans *ubp26* que dans *ubp22*, et est très amplifiée dans le double mutant *ubp22ubp26*. Ces problèmes d'expression démontrent pour la première fois chez *Arabidopsis* un lien entre les mécanismes d'enlèvement de H2Bub et la dynamique de certains gènes, de façon analogue aux défauts d'expression de *TOC1*, *CCA1* et *LHY* lors de la perte de dépôt de H2Bub (Bourbousse et al, 2012 ; Himanen et al, 2012). Il est donc possible que la dynamique de dépôt/enlèvement de H2Bub sur ces gènes implique *UBP22* et *UBP26*.

Conclusion

Cette série d'analyses génétiques montre que les gènes *UBP22* et *UBP26* présentent d'une part des spécificités d'action et également un certain niveau de redondance fonctionnelle. Cette redondance est visible au niveau du développement végétatif, racinaire, de la formation des graines, et des gènes dérégulés dans les plantes double mutantes *ubp22ubp26* mais pas dans les mutants simples. Au niveau de résolution obtenu par immunoblot, il semble que l'inactivation conjointe des gènes *UBP22* et *UBP26* n'induit pas de gain de H2Bub supplémentaire par rapport à la mutation simple *ubp22*. Enfin, des analyses transcriptomiques ont permis de montrer que, de façon non corrélée avec le phénotype d'accumulation de H2Bub, *UBP26* impacte significativement de nombreux gènes par rapport à *UBP22*. Il est possible que dans un état de croissance de la plantule adulte en conditions

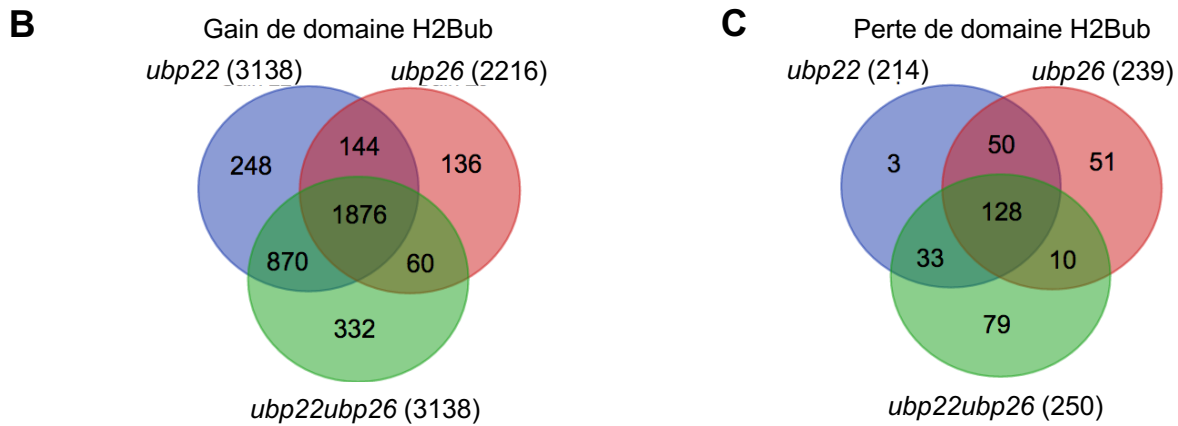
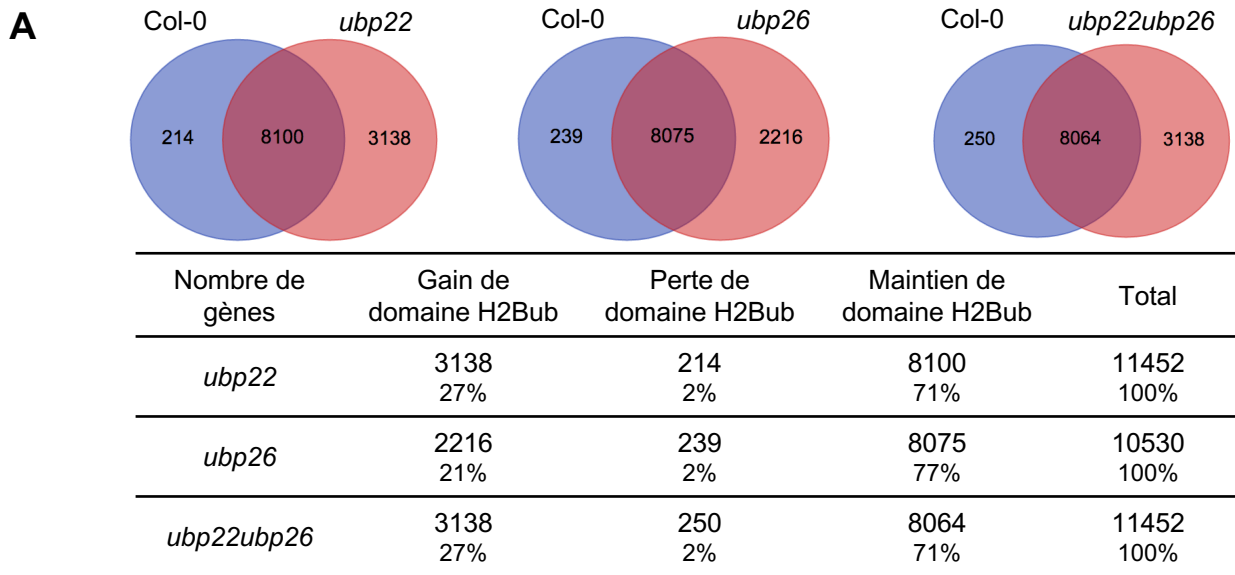


Figure 46. Analyse du nombre et de la répartition des gènes gagnant et perdant H2Bub

(A) Diagramme de Venn des gènes marqués dans chaque mutant par rapport aux gènes marqués dans les plantules Col-0 et tableau résumant pour chaque génotype, le nombre de gènes gagnant un domaine H2Bub, perdant le domaine, ou le maintenant, par rapport à la lignée Col-0. Représentation en diagramme de Venn des gènes gagnant H2Bub (B) dans les mutants et de ceux perdant H2Bub (C).

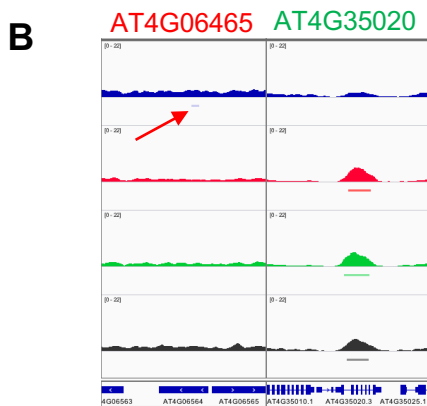
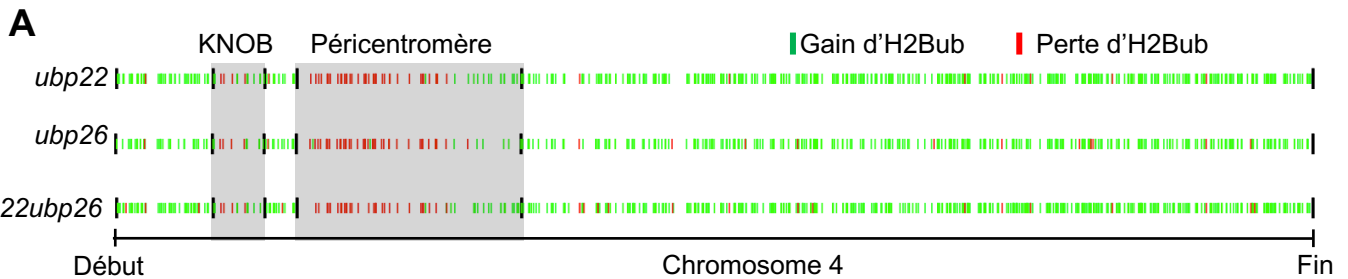


Figure 47. Analyse du nombre et de la répartition des gènes gagnant et perdant H2Bub

(A) Représentation schématique du chromosome 4 et de la position des gènes qui gagnent et perdent H2Bub dans chaque mutant. (B) Exemple représentatif d'un gène gagnant H2Bub et d'un gène perdant H2Bub dans les mutants, la flèche rouge pointe le pic appelé sur le gène AT4G06465.

de culture optimales, les plantes *ubp22* développent des mécanismes d'adaptation permettant de compenser le manque de débubiquitination de H2Bub. Par ailleurs, la baisse de la marque H3K27me3 dans le mutant *ubp26* est probablement liée à un défaut de la répression de type *Polycomb* de certains gènes. Ce défaut chromatinien pourrait être responsable davantage que l'excès de H2Bub du nombre élevé de gènes dérégulés dans *ubp26* par rapport à *ubp22* et également des défauts de germination observés. Le lien entre *UBP26* et la répression *Polycomb* des gènes sera développé dans la partie 3. Ensuite, les gènes surexprimés dans les mutants sont plus petits, et les gènes dérégulés du chromosome 4 sont répartis équitablement dans les bras de ce chromosome. Pour finir, de nombreux gènes de l'horloge circadienne sont dérégulés dans les mutants, mettant en avant le lien entre l'enlèvement de H2Bub et les changements d'expression des gènes chez *Arabidopsis*.

2.2 Etude des cibles génomiques de l'activité d'UBP22 et UB26

Etude des gènes gagnant et perdant H2Bub dans les différents génotypes

Afin d'étudier l'impact global d'UBP22 et UB26 sur le profil génomique H2Bub, j'ai effectué une expérience de ChIP-seq sur des plantules des mutants *ubp22*, *ubp26*, *ubp22ubp26* et du type sauvage Col-0 en deux répliques. D'après les résultats obtenus par immunoblot (Figure 41A), le gain de H2Bub attendu est très important, en particulier dans les plantules mutantes *ubp22* avec un doublement du niveau global de cette marque. L'appel des pics dans les différents répliques de chaque génotype par Macs2 a permis de visualiser la distribution de la marque H2Bub et des pics annotés (Figure 45). Pour chaque génotype, les pics de H2Bub sont bien définis et l'appel des pics correspond visiblement au marquage observé.

Dans un premier temps, j'ai analysé le nombre de gènes gagnant ou perdant complètement H2Bub dans chaque mutant par rapport au type sauvage Col-0, en comparant les listes de gènes recouvrant un domaine H2Bub (marqués) dans chaque lignée (Figure 46A). Tous les mutants étudiés ont de nombreux gènes gagnant H2Bub : 3138 pour *ubp22* et *ubp22ubp26*, et environ un tiers de moins pour *ubp26* (2216). Le nombre de gènes perdant leur domaine H2Bub est de dix à quatorze fois plus faible. Cette distorsion très significative entre le nombre de gènes nouvellement marqués et ceux perdant la marque H2Bub est en accord avec un rôle d'UBP22 et UB26 dans l'enlèvement de H2Bub.

En étudiant la répartition des gènes nouvellement marqués dans les mutants, on remarque 1876 gènes communs aux trois lignées, plus 870 gènes communs à *ubp22* et au double mutant (Figure 46B). Ces résultats confirment le rôle d'UBP22 et UB26 dans l'enlèvement de H2Bub et le fait que ces deux protéines ont de nombreux gènes cibles en commun. Concernant le faible ensemble de gènes

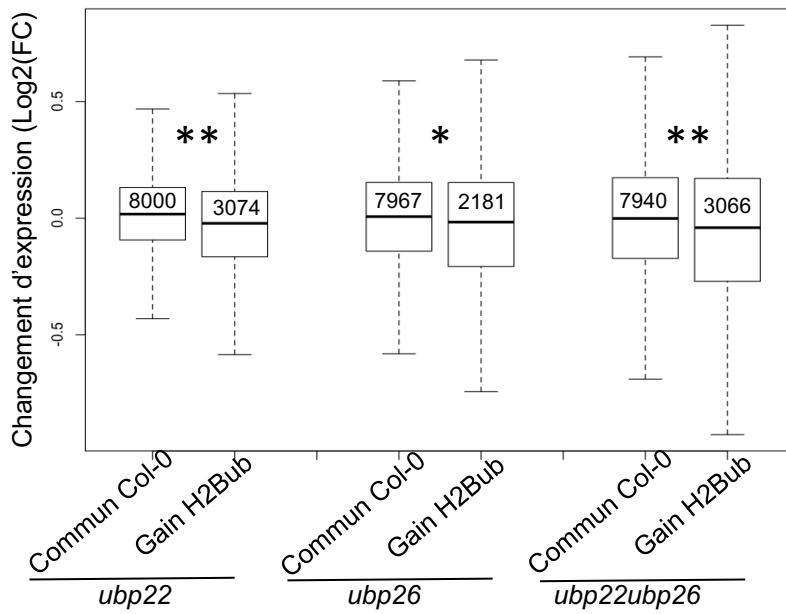


Figure 48. Analyse du changement d'expression des gènes gagnant H2Bub

Boxplot représentant le changement d'expression ($\text{Log}_2(\text{FC})$) des gènes gagnant H2Bub dans chaque mutant comparé au niveau des gènes conservant H2Bub dans les plantules sauvages et mutantes. Le nombre de gène considéré est indiqué pour chaque échantillon. **, Ttest pval < 0,05 et *, Ttest pval < 0,01.

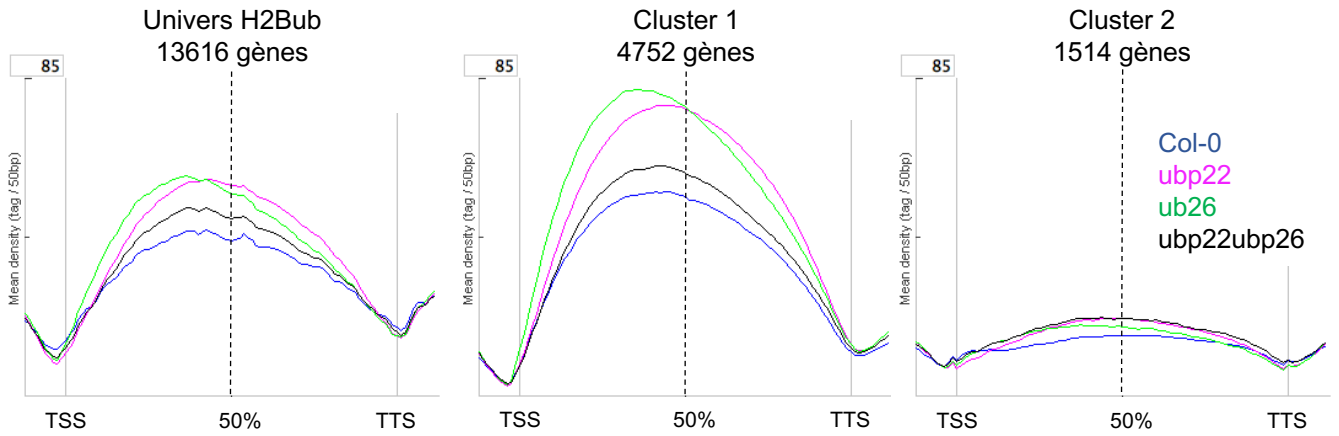


Figure 49. Analyse du niveau d'H2Bub sur différents ensembles de gènes

Utilisation de fichiers normalisés à dix millions de reads pour chaque génotype afin de représenter la densité de reads sous la forme de différents métagènes grâce au logiciel seqMINER. L'univers H2Bub représente le niveau d'H2Bub pour chaque génotype, présent sur l'ensemble des gènes marqués par H2Bub identifiés lors de l'appel des pics et l'annotation dans au moins un génotype. Les différents pics ont été séparés en sept clusters selon le profil de la marque et deux clusters d'intérêt sont représentés. (seqMINER : YE et al., 2014)

qui perdent H2Bub dans les mutants, 128 sont communs à tous les mutants et 79 perdent H2Bub uniquement dans le double mutant.

L'analyse de catégorie de fonction des gènes gagnant et perdant H2Bub dans chaque mutant n'est pas significative concernant les gènes qui perdent H2Bub dans les mutants. Quant aux nombreux gènes gagnant H2Bub, de par leur fort recoupement ils sont impliqués dans des mécanismes très similaires dans les trois mutants. Sont retrouvés préférentiellement des gènes dans des procédés métaboliques, en particulier celui de l'azote, ainsi que le développement post-embryonnaire.

Les très nombreux gènes gagnant H2Bub sont localisés de façon apparemment homogène le long des bras du chromosome (Figure 47A). A l'inverse, le positionnement des gènes gagnant et perdant H2Bub sur le chromosome 4 met en évidence la localisation péricentromérique de la quasi-totalité des gènes perdant H2Bub. Cette localisation des gènes perdant H2Bub est surprenante et après avoir étudié le profil de H2Bub sur ces gènes, il s'avère qu'un bruit de fond légèrement plus important chez le Col-0 dans cette zone génère l'appel de pics très petits par MAcs2 qui, lorsqu'ils sont localisés sur un gène, créent cet effet de perte apparente (Figure 47B). La majorité des gènes qui perdent H2Bub dans les mutants sont donc artéfactuels, à l'inverse des gènes qui gagnent la marque H2Bub.

J'ai ensuite étudié si le gain de H2Bub est lié au défaut d'expression des gènes observé dans les mutants. L'amplitude des changements d'expression des gènes gagnant H2Bub dans les mutants par rapport aux gènes marqués dans les plantules Col-0 a été comparée (Figure 48). Le résultat montre que les gènes qui gagnent la marque H2Bub dans les mutants sont significativement sous-exprimés par rapport à ceux qui sont déjà marqués dans les plantules Col-0. L'enlèvement efficace de H2Bub sur ces gènes par UBP22 et/ou UBP26 est donc nécessaire pour leur expression optimale.

Afin d'estimer l'effet des mutations sur la distribution de H2Bub sur les gènes, j'ai généré une série de métagènes, avec pour chaque génotype le niveau et la distribution de la marque H2Bub grâce au logiciel seqMINER (Ye et al., 2014) (Figure 49). Les fichiers utilisés sont normalisés à dix millions de lectures et le premier métagène nommé "Univers H2Bub" représente la densité de H2Bub chez les mutants, comparée au Col-0 pour l'ensemble des gènes marqués par H2Bub dans au moins un des quatre génotypes. Le niveau de H2Bub des trois mutants sur ce premier métagène est très supérieur à celui observé pour le type sauvage Col-0. De façon inattendue, on observe également un net déplacement du pic vers le site d'initiation de la transcription (TSS) dans le fonds génétique *ubp26*. De façon surprenante, le niveau de H2Bub du double mutant *ubp22ubp26* est inférieur à celui d'*ubp22* et *ubp26*. Le logiciel seqMINER permet de diviser l'ensemble des gènes étudiés en différents cluster selon leur profil de H2Bub. De cette manière on peut isoler les gènes sur lesquels le déplacement du pic du mutant *ubp26* est fortement présent (Cluster 1) d'autres clusters avec des profils différents (Cluster

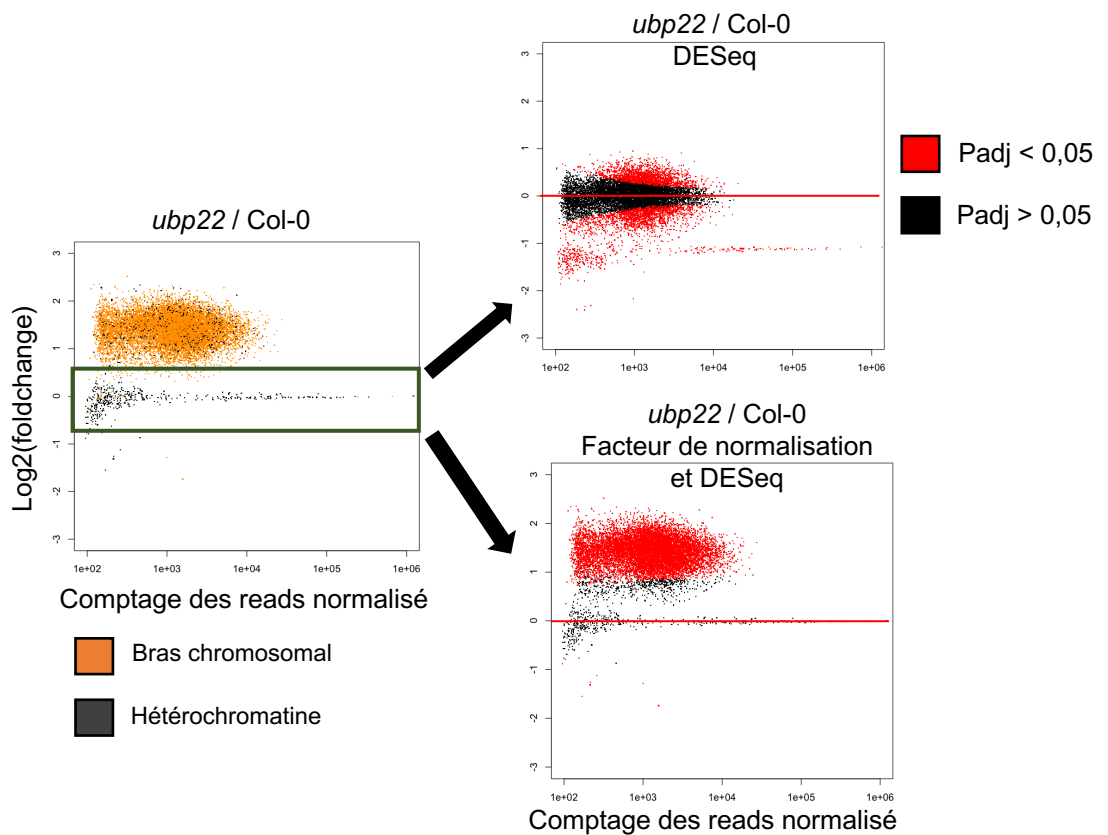
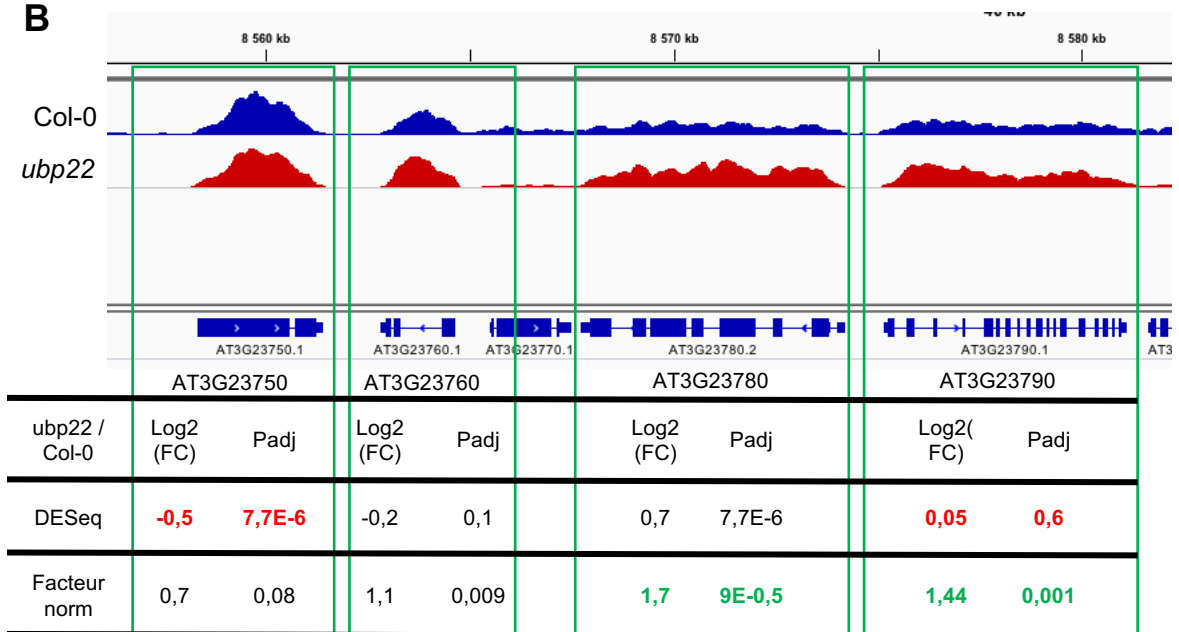
A**B**

Figure 50. Test d'une méthode de normalisation basée sur un facteur de correction

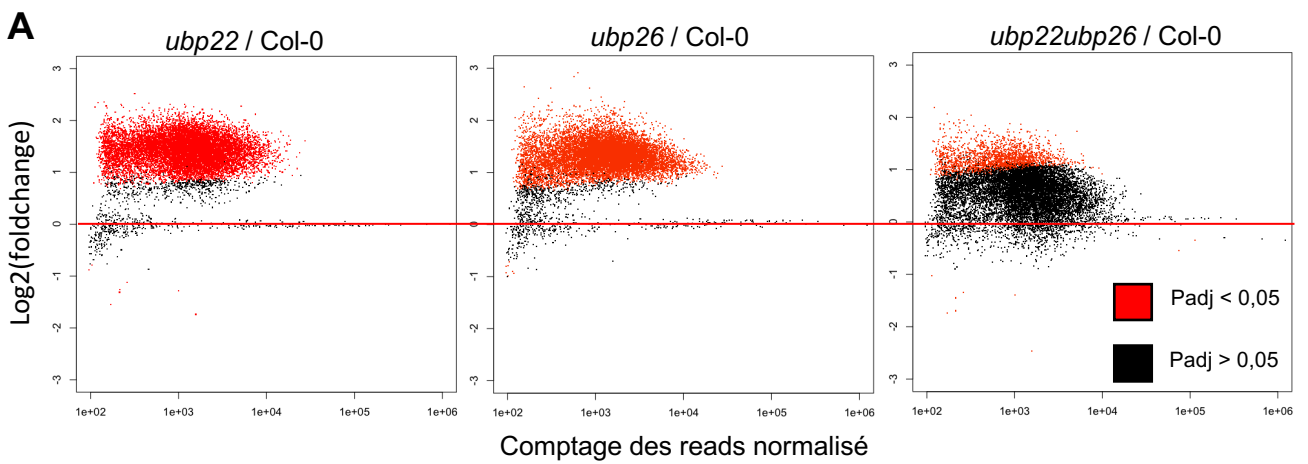
(A) Représentation par MA plot des domaines enrichis en H2Bub pour le mutant *ubp22* comparé à Col-0 en deux répliquas biologiques. Le graphique à gauche représente les données brutes, les graphiques à droite représentent les mêmes données après deux analyses statistiques différentes : DESeq seulement (en haut) ou après application du facteur de normalisation (en bas). (B) Aperçu d'une région du génome et un tableau résumant pour chaque gène son changement d'amplitude du niveau de la marque H2Bub moyenné des deux répliquas, comparé au type sauvage Col-0 ainsi que la valeur statistique de ce changement.

2). L'analyse de ces différents clusters permettra potentiellement d'identifier les gènes sur lesquels UBP22 et UBP26 ont des actions distinctes.

Normalisation des résultats du ChIP-seq

Les résultats du ChIP-seq décrits précédemment sont basés sur la comparaison des gènes associés à au moins un domaine H2Bub (ou marqués) dans les différents génotypes, ainsi que sur une analyse du profil de H2Bub basée sur des fichiers normalisés sur dix millions de lectures. Afin d'étudier l'évolution du marquage H2Bub des gènes déjà marqués dans les plantules Col-0, une analyse différentielle est nécessaire. Ce type d'analyse présente une difficulté attendue dans les cas présentant une augmentation ou baisse générale du niveau de la marque étudiée, en particulier si elle est souvent présente sur des régions déjà normalement enrichies chez le type sauvage, ce qui est typiquement observé pour H2Bub sur le corps des gènes dans les mutants $\Delta ubp8$ et $\Delta ubp10$ de *S. cerevisiae* (Schulze et al., 2011). Dans ce type de cas, le ChIP-seq peut montrer des limitations des analyses différentielles. Par exemple, la normalisation DESeq utilisée classiquement est basée sur l'hypothèse que la majorité des éléments considérés (ici les pics H2Bub) ont une couverture similaire. Ce programme harmonise la hauteur des pics identifiés par rapport à une moyenne calculée sur l'ensemble des pics du génotype de référence (Col-0 dans notre cas). Par conséquent dans le cas de changements globaux, la normalisation peut aboutir à effacer le gain pour ramener le signal à l'échelle du génome à une valeur similaire dans les deux échantillons comparés (Dillies et al., 2013). L'ajout de chromatine exogène (ou Spike-in) est une méthode récemment développée pour s'affranchir de ce type de biais. La méthode consiste à ajouter dans chaque échantillon, avant immunoprécipitation, une quantité définie de chromatine servant de référence interne à chaque ChIP. En fin de ChIP-seq, les séquences d'ADN exogène immunoprécipitées sont alignées sur le génome correspondant afin de déterminer un facteur de normalisation basé sur les différences réelles d'enrichissement entre échantillons (Orlando et al., 2014). Pour cette expérience de ChIP-seq chez les différents mutants, j'ai ajouté à la chromatine de chaque échantillon 10% de protéines de chromatine de *S. cerevisiae*. Dans cette première série d'expériences, le nombre de lectures correspondant au génome de *S. cerevisiae* obtenu après séquençage était trop faible (191000, 460000, 384000 et 260000 respectivement pour les deux répliques combinés Col-0, *ubp22*, *ubp26* et *ubp22ubp26*) pour l'utiliser comme un facteur de normalisation fiable, et nos tentatives se sont révélées infructueuses.

La représentation par MA plot (Figure 50A) met en relation une valeur de changement (fold change : M) pour chaque pic entre deux échantillons avec le comptage de lectures normalisé de ce pic (A). Le MA-plot du ChIP-seq H2Bub d'*ubp22* avant normalisation permet de distinguer deux



B

Marquage H2Bub	Hypo-ubiquitiné	Hyper-ubiquitiné
<i>ubp22</i>	6	10648
<i>ubp26</i>	0	10590

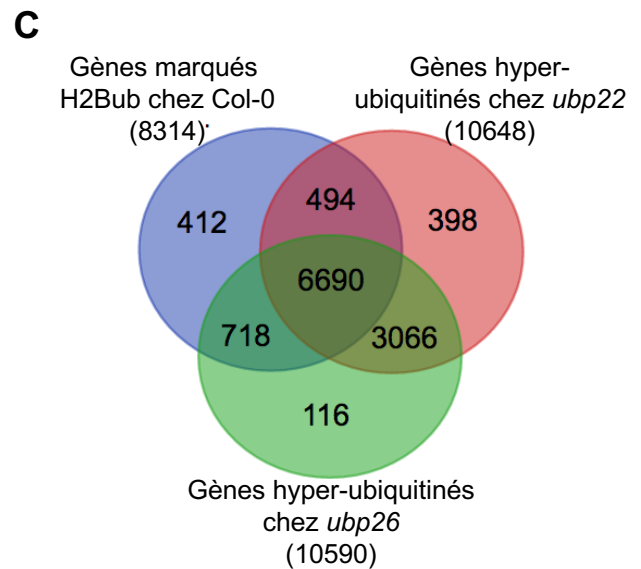


Figure 51. Visualisation des domaines changeant significativement de niveau d'H2Bub

(A) Représentation par MA plot des changements de niveau d'H2Bub significatif pour chaque génotype après application du facteur de normalisation décrit précédemment avant DESeq. (B) Tableau résumant pour les deux mutants, le nombre de gènes hypo-marqués et hyper-marqués par rapport à Col-0 chez *ubp22* et *ubp26* après application du facteur de normalisation et DESeq (C) Diagramme de Venn représentant le recouvrement entre les gènes marqués par H2Bub dans la lignée sauvage Col-0 et les gènes hyper-marqués chez les mutants *ubp22* et *ubp26*.

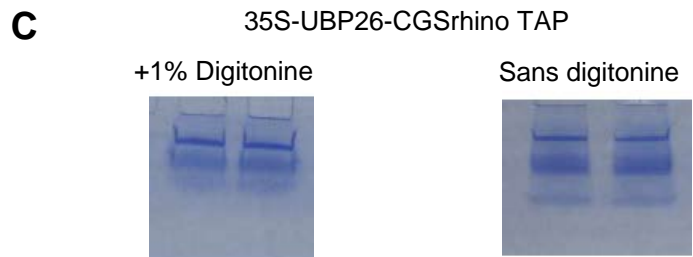
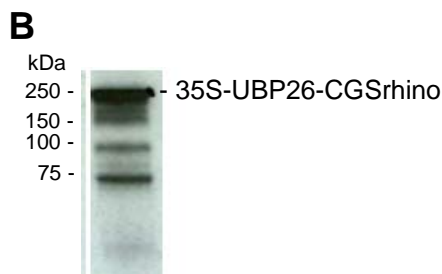
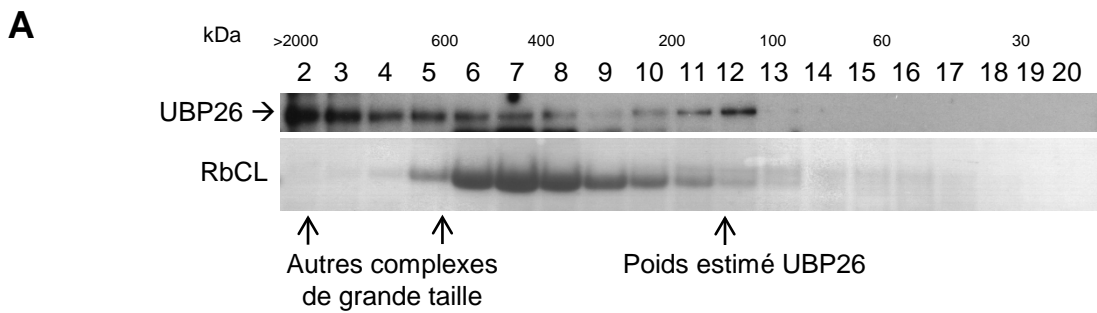
populations de pics, un important premier groupe positionné au-dessus d'un deuxième en forme de gaussienne. Si ces données sont normalisées de manière classique par DESeq, on observe deux importantes populations de domaines où H2B est significativement hyper-ubiquitinée (en rouge au-dessus de 0) ou hypo-ubiquitinée (en rouge au-dessous de 0) par rapport au type sauvage Col-0 (Figure 50A, plot en haut à droite). Cette répartition symétrique ne correspond pas au gain massif de H2Bub observé dans nos analyses précédentes, comme anticipé du biais de la normalisation des niveaux globaux entre échantillons. En étudiant ces données, j'ai remarqué que la totalité des pics du groupe inférieur étaient situés dans les régions hétérochromatiniennes (Figure 50A, plot à gauche). L'observation de leur profil le long du génome indique que ces régions sont marquées de façon artéfactuelles significativement dans tous les génotypes. Nous avons donc déterminé un facteur de normalisation arbitraire basé sur la moyenne de la couverture de ces régions hétérochromatiniennes pour chaque génotype. Lorsque ce facteur est appliqué avant l'analyse statistique DESeq, on remarque une importante population de régions hyper-marquées par H2Bub dans le mutant *ubp22*. Afin de tester la validité de cette normalisation par rapport à la technique classique, j'ai observé une région du génome intéressante en indiquant les résultats donnés par les deux techniques (Figure 50B). En estimant visuellement les changements de H2Bub on remarque que le premier gène est apparemment marqué de la même manière dans les deux génotypes alors que la normalisation classique l'estime significativement hypo-marqué dans le mutant *ubp22* (Figure 50B). De façon analogue, les deux gènes en 3' qui sont visuellement hyper-marqués ne sont considérés comme tel qu'après application du facteur de normalisation. La normalisation avec ce facteur de correction basé sur cette population de domaines hétérochromatiniens semble donc donner un résultat cohérent. De plus parmi les 3138 gènes gagnant H2Bub chez *ubp22*, 3079 sont inclus dans les gènes hyper-ubiquitinés et seulement 6 gènes perdant H2Bub le sont aussi.

L'analyse des MA-plot de chaque mutant comparé au Col-0 et normalisé grâce au facteur de normalisation arbitraire ainsi qu'une analyse statistique DESeq met en évidence les nombreux pics hyper-ubiquitinés chez chaque mutant (Figure 51). En effet pour *ubp22* et *ubp26*, la quasi-totalité des domaines d'intérêt sont hyper-marqués par H2Bub. A l'inverse une partie bien plus réduite de ces domaines est hyper-marquée chez *ubp22ubp26*. Au final, plus de 10000 gènes sont hyper-marqués par H2Bub dans *ubp22* et *ubp26* (Figure 51B), ce qui correspond à la majorité des gènes marqués par H2Bub dans le type sauvage (Figure 51C). Néanmoins, l'analyse différentielle du double mutant grâce au facteur de normalisation ne montre que peu de gènes hyper-marqués comparé à *ubp22* et *ubp26* ce qui ne correspond pas aux résultats observés par immunoblot. La validité de l'utilisation de ce facteur de normalisation restant incertaine, il semble plus sûr à ce stade de rester sur les conclusions de l'analyse des domaines gagnant ou perdant la marque H2Bub.

Conclusion

L'analyse de la distribution génomique de la marque H2Bub par CHIP-seq dans les différents génotypes confirme le rôle d'UBP22 dans l'enlèvement de H2Bub à grande échelle, puisque cette protéine impacte le niveau de cette marque sur plusieurs milliers de gènes. Environ 3000 gènes situés sur les bras des chromosomes nécessitent UB22 pour retirer complètement H2Bub et s'exprimer normalement. UB26 montre un effet similaire à UB22 sur 2000 gènes, néanmoins le lien fonctionnel avec une baisse du niveau des transcrits des gènes correspondants est moins significatif que pour la lignée *ubp22*. De façon plus surprenante au vu des niveaux de H2Bub observés par immunoblot, l'effet d'UB26 sur H2Bub semble également très vaste. De plus, la fonction de ces deux UB2 semble converger vers un grand nombre de cibles génomiques communes. Néanmoins, UB26 a un effet plus important en 5' des gènes d'après le profil de H2Bub observé par analyse métagène, suggérant une fonction moléculaire souvent distincte de celle d'UB22. Pour finir le double mutant *ubp22ubp26* semble présenter un profil épigénomique de H2Bub plutôt similaire à celui d'UB22, avec 3000 gènes gagnant H2Bub dans ce double mutant et un fort recoupement avec ceux gagnant H2Bub chez *ubp22*.

RESULTATS PARTIE 3



D

Identifiant	Protéine	+1% digitonine		Sans digitonine		Total/4exps
		Exp1	Exp2	Exp3	Exp4	
AT5G37400	DUF577 (inconnue)	8	9	7	8	4
AT2G33000	Protéine associée à l'ubiquitine (inconnue)	4	13	2		3
AT2G28450	Protéine à doigt de zinc (inconnue)			2		1
AT5G10470	KCA1				3	1
AT3G06400	CHR11				4	1
AT1G67230	CRWN1				2	1

Figure 52. Identification des protéines interagissant avec UBP26 et de la taille des complexes comprenant UBP26

(A) Immuno-détection d'UBP26 dans différentes fractions séparées selon leur poids moléculaire par chromatographie d'exclusion de taille. (B) Immuno-détection d'UBP26 fusionnée à la Gsrhino et exprimée dans des cultures cellulaires en utilisant un anticorps anti-SRB. (C) SDS-PAGE et coloration par bleu de Coomassie des protéines interagissant avec UBP26, après purification avec ou sans digitonine, avant digestion du gel et analyse des protéines par spectrométrie de masse. (D) Tableau récapitulatif des interactants d'UBP26 ainsi que leurs identifiants, le nombre de peptides identifiés pour chaque interactant dans chaque expérience et le nombre total de répliques dans lesquels les interactants ont été identifiés.

3. Etude de l'influence d'*UBP26* sur la répression transcriptionnelle

Contexte

Après avoir identifié des interactions génétiques entre *UBP22* et *UBP26* sur le développement et étudié leur impact sur les profils transcriptomiques et génomiques de la marque H2Bub, je me suis intéressé plus particulièrement aux liens entre *UBP26* et les mécanismes de répression transcriptionnelle. Comme indiqué précédemment, *UBP26* est à la fois requise pour la répression de certains éléments transposables, notamment *AtGP1* et *AtMULE* (Sridhar et al., 2007), mais aussi la répression soumise à l'empreinte parentale du gène *PHERES* dans un fonds Col-0 (Luo et al., 2008). Par ailleurs, le fort phénotype d'avortement des graines ainsi que la formation autonome d'endosperme après émasculature pour 1% des ovules est un phénotype typique mais atténué de certains mutants PRC2 comme *fis*, *mea*, *fie* et *msi1* (Hennig and Derkacheva, 2009). D'après les données de transcriptomique obtenues dans la partie 2, le phénotype moléculaire d'*UBP26* sur le niveau de la marque H3K27me3 et sur l'expression des gènes est plus prononcé qu'initialement attendu, et nécessite donc d'être caractérisé. En effet, les mécanismes moléculaires de déubiquitination de H2Bub impliquant *UBP26* seraient parfois associés à une répression transcriptionnelle et parfois à une facilitation de la transcription comme pour *UBP22* et restent difficiles à appréhender. Dans cette dernière partie, je présente une caractérisation plus fine de l'effet d'*UBP26* sur la répression des gènes ainsi que son rôle sur la formation ou la stabilité de l'hétérochromatine.

3.1 *UBP26* forme un ou plusieurs complexes de haut poids moléculaire

Afin de déterminer si *UBP26* agissait seule ou en complexe comme *UBP22*, la lignée *UBP26::UBP26-GFP* a été utilisée pour une analyse par chromatographie d'exclusion de taille suivie par une immuno-détection en utilisant un anticorps anti-GFP (Figure 52A). La protéine *UBP26-GFP* est présente dans des fractions correspondant à sa taille (environ 170 kDa sur gel SDS-PAGE) et également de façon significative dans des fractions correspondant à des poids moléculaires très élevés, allant de 400kDa à la taille d'exclusion (supérieure à 2000 kDa). Ces observations suggèrent qu'*UBP26* interagit avec une ou plusieurs autres protéines et peut former différents complexes.

Afin d'identifier la composition de ces complexes, et rechercher si *UBP26* interagit avec des régulateurs de la transcription connus, une expérience de TAP-tag a été effectuée selon la même méthode que celle utilisée dans la section 1 pour *UBP22*. Celle-ci comprend une extraction des protéines de cellules d'*Arabidopsis* transfectées en présence de 1% de digitonine. Contrairement à

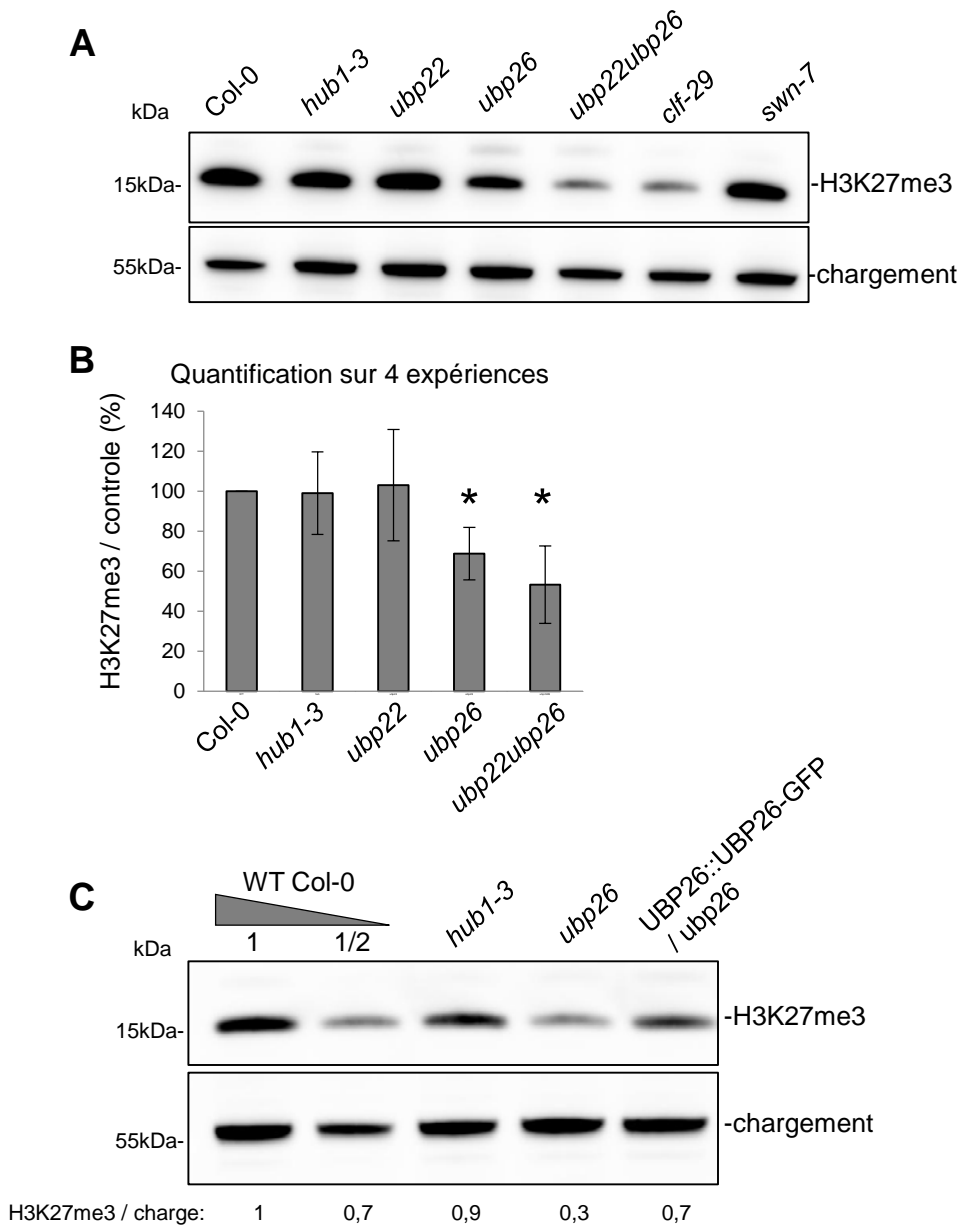


Figure 53. UBP26 impacte le niveau global d'H3K27me3

(A) Immunodétection d'H3K27me3 sur extraits chromatiniens de plantules de 7 jours. (B) Représentation de la moyenne de 4 quantifications du marquage H3K27me3 par rapport au témoin de charge pour chaque génotype (*=T.test<0,05). (C) Immunodétection d'H3K27me3 sur extraits chromatiniens de plantules de 7 d'une lignée complétée par UBP26-GFP.

UBP22, la protéine UBP26 est soluble en absence de détergent. L'expérience a donc également été effectuée dans des conditions sans digitonine afin de maximiser les chances de conserver les interactions protéine-protéine. Après contrôle de l'expression de la protéine étiquetée (Figure 52B) et du succès de sa purification TAP (Figure 52C), l'équipe de Geert de Jaeger a identifié les protéines associées à UBP26 par spectrométrie de masse (Figure 52D). Dans les 4 expériences effectuées, (deux répliques avec ou sans digitonine), deux protéines apparaissent comme partenaires principaux. Elles sont codées par les gènes *AT5G37400* et *AT2G33000* encore non caractérisés. De façon intéressante, la protéine *AT2G33000* contient un domaine Ubiquitin-Associated (UBA) trouvé chez plusieurs protéines nucléaires des voies d'ubiquitination, et également impliqué dans l'association aux nucléoporines (Grant et al., 2003).

Les quatre autres protéines interagissant de façon significative avec UBP26 ont été trouvées dans une seule des deux expériences effectuées sans détergent, et pourraient donc interagir de manière plus transitoire ou moins forte avec UBP26 : **1)** *AT2G28450* est inconnue, et de façon intéressante possède un doigt de zinc ; **2)** KINESIN-LIKE PROTEIN FOR ACTIN-BASED CHLOROPLAST MOVEMENT (*KCA1*) est une protéine permettant le mouvement des chloroplastes et leur association avec la membrane plasmique (Suetsugu et al., 2010) ; **3)** CHROMATIN-REMODELING PROTEIN 11 (*CHR11*), est un facteur de remodelage de la chromatine impliqué notamment dans la prolifération des noyaux haploïdes durant la megagametogenèse et l'expansion cellulaire pendant la phase sporophytique (Huanca-Mamani et al., 2005) ; et **4)** *CRWN1*, une des quatre membres de la famille des protéines CROWDED NUCLEI ayant un rôle structural de la périphérie nucléaire et influençant l'organisation de l'hétérochromatine (Dittmer et al., 2007; Grob et al., 2014).

Conclusion

UBP26 interagit de manière plus ou moins forte et stable avec plusieurs protéines et peut s'associer avec des complexes de très haut poids moléculaire. Du fait de leur lien avec la chromatine et l'organisation du noyau, l'identité de plusieurs de ces protéines est très intéressante. Il reste nécessaire de confirmer les interactions détectées par l'approche de TAP-tag puis de rechercher leur signification fonctionnelle. Une interaction directe entre UBP26 et *CRWN1* a été testée par double hybride de levure donnant un résultat négatif (données obtenues en collaboration avec Prof. Christophe Tatout, Université de Clermont). Le lien potentiel indirect entre UBP26 et les membres de la famille *CRWN* sera par conséquent testé prochainement par co-immunoprécipitation. Par ailleurs, des lignées mutantes par insertion de T-DNA dans les gènes *AT5G37400* et *AT2G33000* vont être étudiées, en recherchant notamment si elles sont affectées dans l'enlèvement de la marque H2Bub.

	Gène	ID	<i>ubp22ubp26</i>	<i>ubp26</i>	<i>ubp22</i>
PRC2	<i>FIE</i>	AT3G20740	NS	NS	NS
	<i>MSI1</i>	AT5G58230	NS	NS	NS
	<i>EMF2</i>	AT5G51230	NS	NS	NS
	<i>VRN2</i>	AT4G16845	NS	NS	NS
	<i>CLF</i>	AT2G23380	NS	NS	NS
	<i>SWN</i>	AT4G02020	NS	NS	NS
PRC1	<i>RING1A</i>	AT5G44280	NS	NS	NS
	<i>RING1B</i>	AT1G03770	NS	NS	NS
	<i>EMF1</i>	AT5G11530	NS	NS	NS
	<i>BMI1a</i>	AT2G30580	0,477	NS	NS
	<i>BMI1b</i>	AT1G06770	NS	NS	NS
	<i>BMI1c</i>	AT3G23060	NS	NS	NS
Enlèvement H3K27me3	<i>LHP1</i>	AT5G17690	NS	NS	NS
	<i>ELF6</i>	AT5G04240	NS	NS	NS
	<i>REF6</i>	AT3G48430	NS	NS	NS

Figure 54. Résumé des changements d'expression des gènes composant les complexes PRC1 et PRC2 dans les mutants *ubp22*, *ubp26* et *ubp22ubp26*

Tableau résumant pour chaque complexe PRC2 et PRC1 les gènes le composant et les changements de niveau d'expression ($\log_2(FC)$) par rapport au type sauvage Col-0 obtenu en RNA-seq dans chaque mutant (BH_pvalue<0,05 ; NS=Non Significatif).

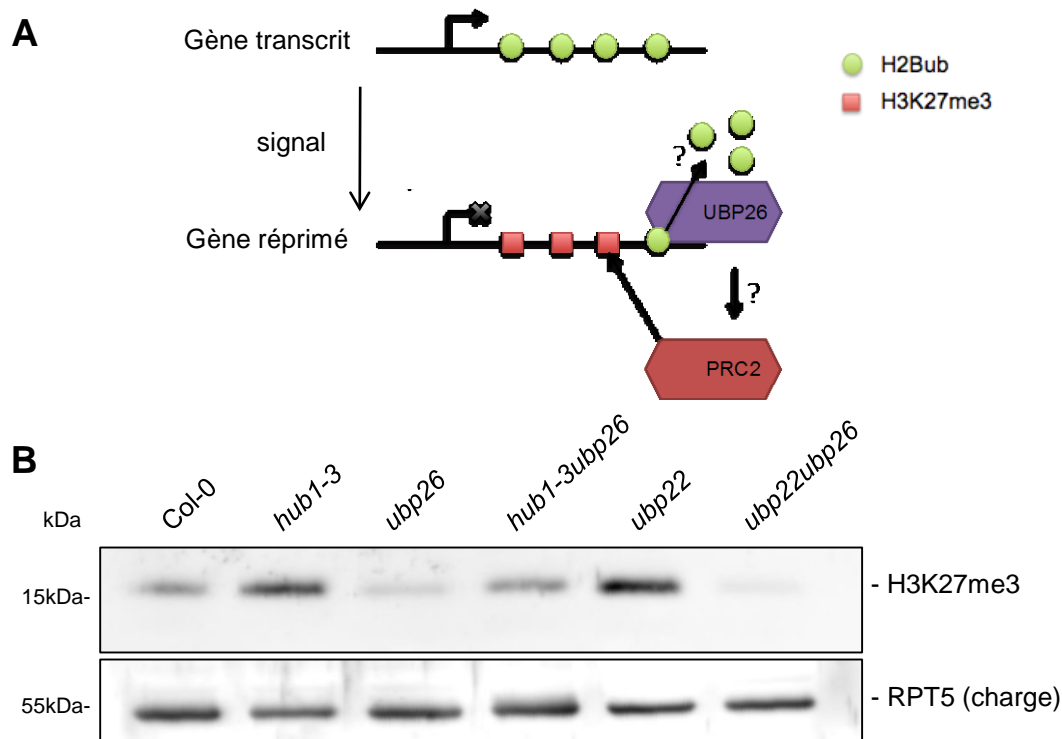


Figure 55. Potentiel mode d'action d'UBP26 sur H2Bub et H3K27me3

(A) Modèle schématique représentant un potentiel mécanisme impliquant UB26 dans l'enlèvement d'H2Bub précédant la déposition d'H3K27me3 par le complexe PRC2. (B) Immunodétection d'H3K27me3 sur extraits chromatiniens de feuilles de rosettes chez différents mutants simples et les mutants doubles *ubp22ubp26* et *hub1-3ubp26*. RPT5 sert de témoin de charge.

Une possibilité intéressante serait que AT2G33000 et/ou AT5G37400 soient nécessaires à l'activité d'UBP26 ou qu'elles contribuent à la régulation de sa propre activité.

3.2 UB26 influence positivement le dépôt ou le maintien de H3K27me3 à large échelle

Un lien possible entre UB26 et H2Bub avec l'établissement ou le maintien de H3K27me3

Comme montré précédemment au chapitre 2.1, le niveau global de H3K27me3 détecté par immunoblot est faible dans la lignée *ubp26* par rapport au type sauvage Col-0 de façon reproductible, alors qu'aucun changement n'est observé dans les lignées *hub1-3* et *ubp22*. Cette baisse est aggravée dans le double mutant *ubp22ubp26* pour atteindre un niveau comparable à celui du mutant *clf-29* dans lequel la fonction PRC2 est fortement affaiblie au stade végétatif (Figure 53A). Une quantification des niveaux de H3K27me3 sur plusieurs réplicas biologique montre une baisse de H3K27me3 de 30% pour *ubp26* et d'environ 50% pour *ubp22ubp26* (Figure 53B). La complémentation du mutant *ubp26* par *UBP26::UBP26-GFP* permet de récupérer un niveau de H3K27me3 quasi-normal (Figure 53C). Ces résultats permettent d'étendre l'observation préalable que le gène *PHERES1* présente un niveau anormalement faible de H3K27me3 (Luo et al., 2008) vers un effet beaucoup plus vaste du lien entre UB26 et les niveaux de H3K27me3.

En tant que déubiquitinase de la marque H2Bub, UB26 pourrait théoriquement influencer le dépôt de H3K27me3 à plusieurs niveaux, y compris de façon indirecte via l'expression de la machinerie responsable du dépôt de cette marque (PRC2 ou même PRC1) ou de son enlèvement par EARLY FLOWERING 6 (ELF6) ou RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6). L'analyse de mes données de RNA-seq au stade plantule indique que l'expression des gènes codant ces protéines n'est pas affectée dans les mutants *ubp22*, *ubp26* et *ubp22ubp26* mise à part celle de *BMI1a* qui est légèrement surexprimé dans le double mutant *ubp22ubp26* (Figure 54).

L'hypothèse de la dérégulation des gènes PRC2 étant a priori écartée, un modèle d'action d'UB26 sur la marque H3K27me3 dépendant de son activité sur H2Bub a été établi (Figure 55A). Dans ce modèle, UB26 interviendrait lors de l'établissement d'un état réprimé d'un gène transcrit suite à un signal endogène ou environnemental afin d'enlever les domaines H2Bub. Cet enlèvement serait nécessaire pour qu'une activité PRC2 puisse être recrutée ou capable de déposer H3K27me3, aboutissant à une répression stable du gène. Dans un mutant *ubp26* ou l'enlèvement de H2Bub serait aboli sur de nombreux domaines génomiques, le dépôt de H3K27me3 serait affecté. Ce modèle

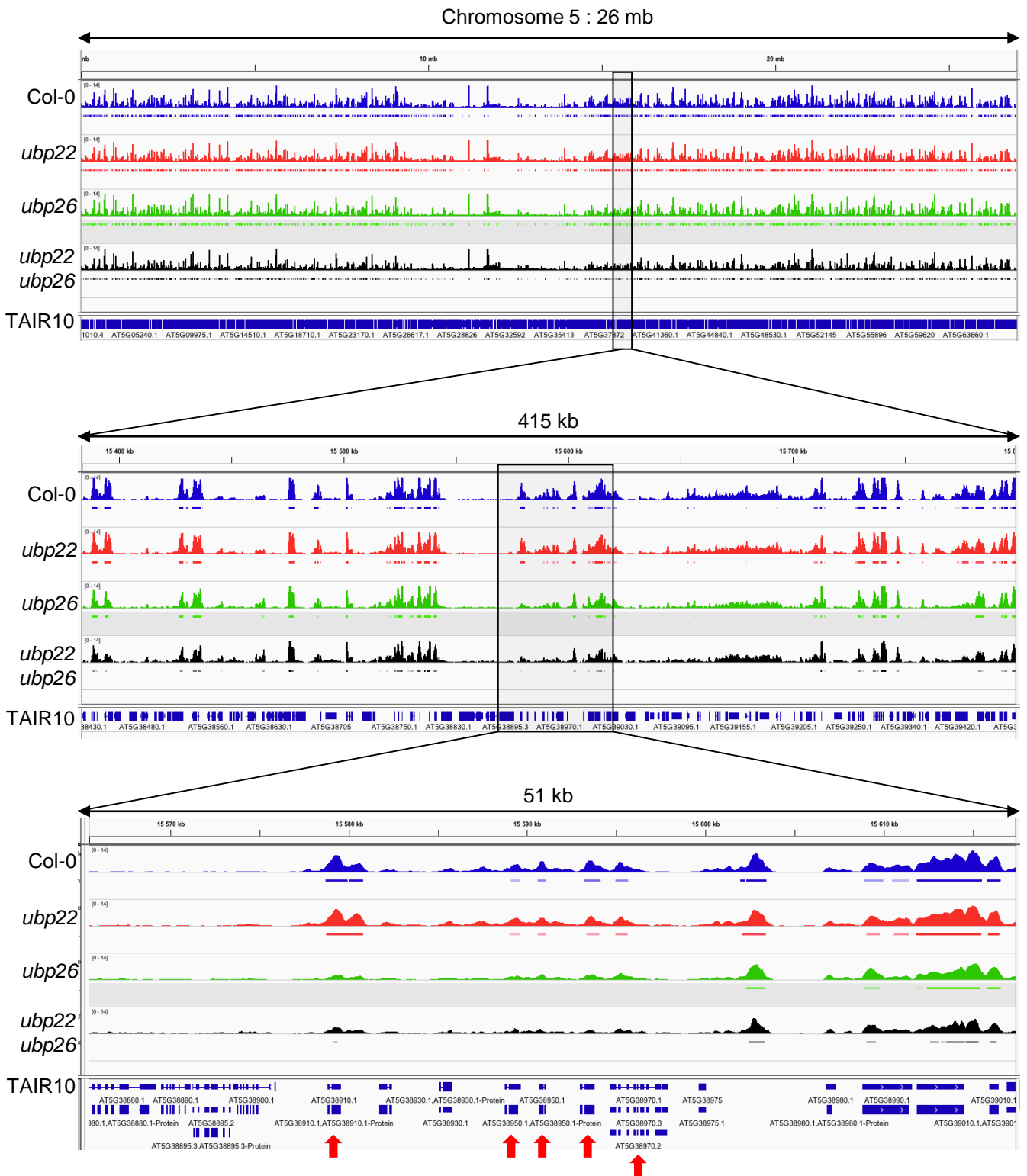


Figure 56. Visualisation de la marque H3K27me3 dans les différents génotypes

Utilisation de fichiers bigWig à la même échelle et combinant les deux répliques générés par Macs2 lors de l'annotation des pics pour chaque génotype et des fichiers résultant de l'appel des pics (barres colorées). En haut pour visualiser le chromosome 5 est montré en entier, puis zoomé sur une région d'intérêt déterminée par croisement des listes de gènes marqués par H3K27me3, dans laquelle plusieurs gènes perdent un domaine H2K27me3 dans les mutants *ubp26* et *ubp22ubp26* (flèches rouges).

pourrait expliquer pourquoi UBP22, de par sa capacité à déubiquitiner H2Bub, pourrait compenser partiellement le manque de déubiquitination de H2Bub sur certains locus. Afin de tester ce modèle un double mutant *hub1-3ubp26* a été obtenu. Dans ce mutant les histones H2B ne sont pas monoubiquitinées, permettant de tester le niveau global de H3K27me3 dans un fonds où l'activité d'UBP26 n'est plus requise pour enlever H2Bub. Etant limité par le nombre de graines disponibles, l'immuno-détection de H3K27me3 a été réalisée sur des extraits de chromatine de feuilles de rosettes de chaque lignée mutantes (Figure 55B). Dans cette expérience, on observe que le niveau de H3K27me3 est partiellement restauré dans le double mutant *ubp22ubp26*. Ce résultat est en accord avec le modèle proposé, suggérant que la stabilité de domaines H2Bub dans *ubp26* affecterait le dépôt optimal de H3K27me3 à certains locus.

Profilage génomique du niveau de H3K27me3 par CHIP-seq

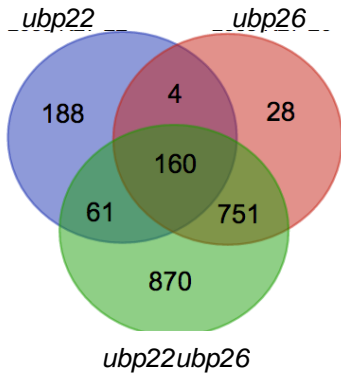
Afin d'identifier les régions génomiques où le niveau de H3K27me3 est faible dans les différentes lignées mutantes au stade plantule de 6 jours, j'ai effectué un CHIP-seq dirigé contre H3K27me3 dans le type sauvage Col-0 et dans *ubp22*, *ubp26* et *ubp22ubp26*. De la même manière que pour H2Bub, les changements de H3K27me3 attendus sont importants, par conséquent une analyse différentielle avec normalisation classique de type DESeq a été anticipée comme étant inadaptée à cette expérience. J'ai donc introduit 10% de chromatine de drosophile dans chaque échantillon de chromatine avant l'immuno-précipitation afin de servir de référence interne de type "spike-in" (Orlando et al., 2014). Les nucléosomes marqués par H3K27me3 de plante et de drosophile ont été immuno-précipités simultanément et l'ADN associé a été séquencé. Cette fois ci, le nombre de fragments correspondant au génome de drosophile obtenus après séquençage a été largement suffisant pour effectuer un alignement solide et calculer un facteur de normalisation qui sera appliqué pour les analyses différentielles.

De nombreux gènes perdent un domaine H3K27me3 dans *ubp26* et *ubp22ubp26*

Comme effectué précédemment pour le profilage de H2Bub, l'analyse bioinformatique a permis d'annoter les gènes associés à un domaine significativement enrichi en H3K27me3 (Figure 56). Les gènes marqués par au moins un domaine H3K27me3 dans la lignée Col-0 sont inclus à 88% dans les données de marquage H3K27me3 chez Col-0 publiées précédemment (Roudier et al., 2011). La comparaison des listes de gènes marqués dans chaque lignée mutante avec le type sauvage Col-0 montre que le mutant *ubp22* est faiblement affecté avec environ 150 gènes gagnant et 260 perdant un domaine H3K27me3 (Figure 57A). Les changements sont plus marqués dans les lignées *ubp26* et

A	Nombre de gènes	Perte de domaine H3K27me3	Gain de domaine H3K27me3	Maintient de domaine H3K27me3	Total
	<i>ubp22</i>	259 3%	154 2%	7095 95%	7508 100%
	<i>ubp26</i>	943 12%	369 5%	6411 83%	7723 100%
	<i>ubp22ubp26</i>	1859 25%	184 2%	5495 73%	7538 100%

B Perte de domaine H3K27me3



C Gain de domaine H3K27me3

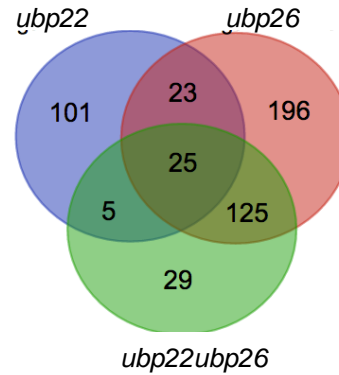


Figure 57. Analyse du nombre et de la répartition des gènes gagnant et perdant H3K27me3

(A) Tableau résumant pour chaque génotype, le nombre de gènes perdant un domaine H3K27me3, gagnant un domaine H3K27me3, ou le conservant par rapport à la lignée Col-0. Résultats obtenus en comparant les listes de gènes annotés dans chaque mutant par rapport au Col-0. Représentation en diagramme de Venn du recouvrement des gènes gagnant (B) et perdant (C) un domaine H3K27me3 dans chaque lignée mutante.

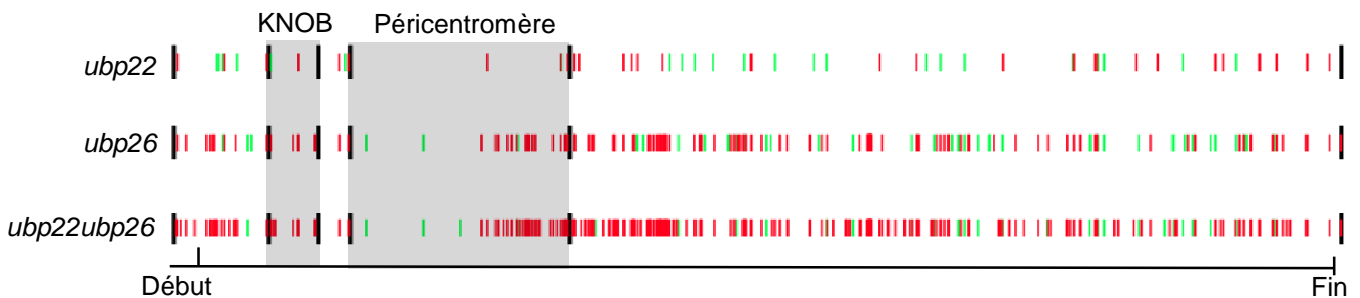


Figure 58. Analyse du nombre et de la répartition des gènes gagnant et perdant H3K27me3

Représentation schématique du chromosome 4 et de la position des gènes qui gagnent (en vert) et ceux perdant (en rouge) un domaine H3K27me3 dans chaque lignée mutante.

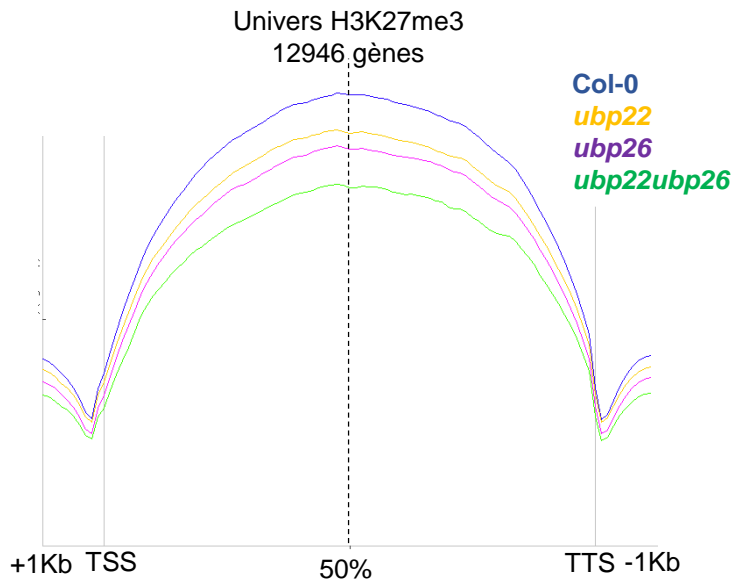


Figure 59. Métagène H3K27me3 pour chaque génotype

Utilisation de fichiers normalisés à dix millions de reads pour chaque génotype afin de représenter la densité de reads sous la forme d'un métagène grâce au logiciel seqMINER. L'univers H3K27me3 représente le niveau d'H2Bub pour chaque génotype, présent sur l'ensemble des gènes marqués par H3K27me3 identifiés lors de l'appel des pics et l'annotation dans au moins un génotype.

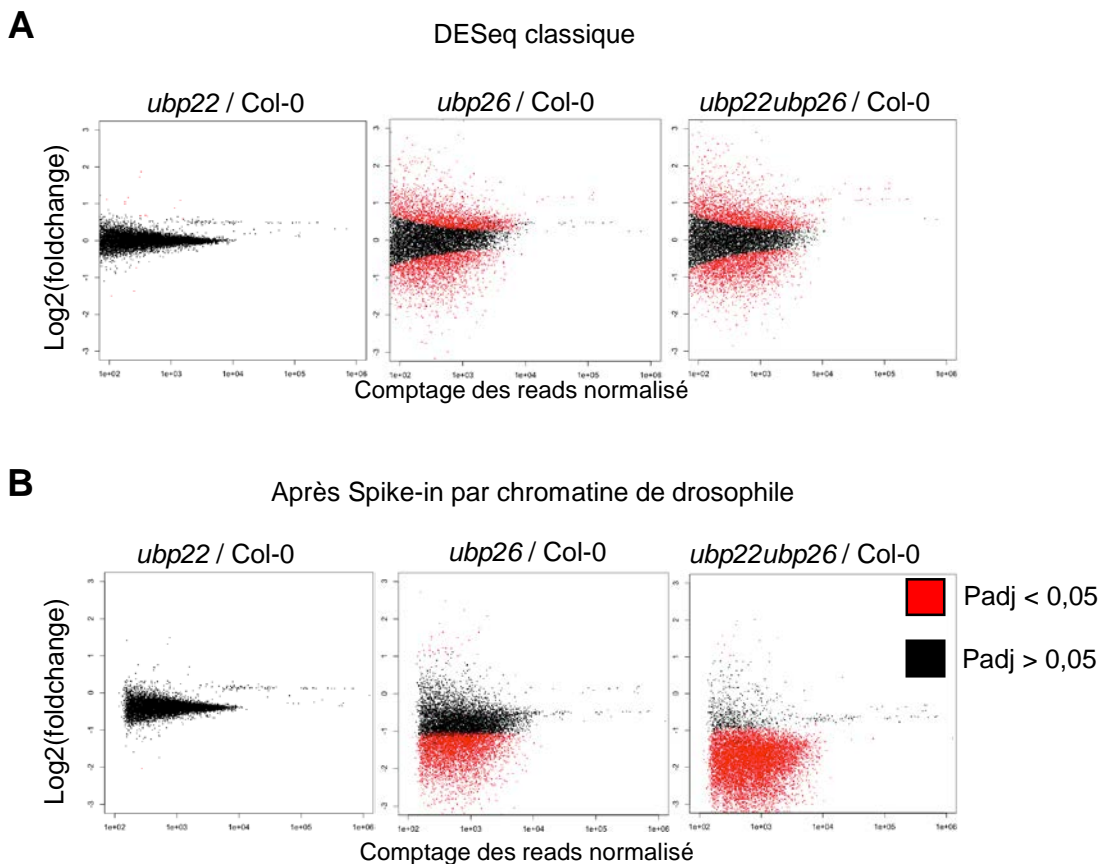


Figure 60. Effet de la normalisation sur chromatine exogène

MA-plot représentant les domaines marqués différemment (rouge) par H3K27me3 après normalisation par DESeq classique (A) ou normalisation par spike-in de chromatine exogène et analyse statistique DESeq (B) pour chaque mutant étudié en comparaison avec la lignée de type sauvage Col-0.

ubp22ubp26, avec respectivement des pertes du domaine H3K27me3 sur 943 gènes et 1859 gènes et des gains sur 369 et 184 gènes. Pour chacune des lignées analysées, ces données à l'échelle du génome sont en accord avec le niveau global de H3K27me3 observé par immuno-détection dans chaque mutant.

Ce type de variation est observable sur un génome browser (Robinson et al., 2011), avec des domaines H3K27me3 disparaissant complètement dans les lignées *ubp26* et *ubp22ubp26* alors que d'autres gènes ne sont visiblement pas affectés (Figure 56). L'analyse du recouvrement par diagramme de Venn entre les gènes perdant leur domaine H3K27me3 dans chacune des lignées mutantes met en avant un large chevauchement entre *ubp26* et *ubp22ubp26* ($n=160+751=911$) : la quasi-totalité des gènes affectés dans *ubp26* le sont dans *ubp22ubp26* (Figure 57B). Toujours en accord avec l'aggravation de la baisse du niveau de H3K27me3 dans le double mutant, un ensemble de 870 gènes perd la marque spécifiquement dans *ubp22ubp26*. La réciproque est moins claire, la distribution des gènes gagnant un domaine H3K27me3 dans les mutants analysés montre des chevauchements peu importants, suggérant l'implication de davantage d'effets secondaires dans ce sens (Figure 57C). De façon générale, ces distributions confirment l'effet prédominant d'UBP26 sur le niveau de H3K27me3 par rapport à UBP22, et confirment en même temps une compensation partielle de la fonction d'UBP26 par UBP22 sur cette activité.

De la même manière que pour H2Bub, j'ai représenté la distribution chromosomique des gènes gagnant ou perdant un domaine H3K27me3 pour chaque mutant (Figure 58). Ces gènes sont principalement localisés dans les bras du chromosome, il ne semble pas y avoir d'effet positionnel évident ni d'effet artefactuel dans la région péricentromérique comme pour H2Bub. Ces analyses seront poursuivies ultérieurement sur des listes de gènes ciblées.

Afin d'estimer l'influence de chaque mutation sur la distribution génique de H3K27me3, j'ai généré un métagène figurant l'ensemble des gènes marqués dans au moins un génotype (Figure 59). Le profil de la courbe de chaque mutant est très similaire, l'amplitude de la courbe étant maximale pour le type sauvage Col-0 puis diminuant respectivement dans les mutants *ubp22*, *ubp26* puis *ubp22ubp26*. Les baisses d'amplitude correspondent aux différents niveaux de H3K27me3 attendus mais sont probablement minimisées car les fichiers utilisés pour créer ce métagène sont normalisés à 10 millions de lectures pour chaque génotype et non par normalisation sur chromatine de drosophile.

A

Marquage H3K27me3	Hypo-marqué	Hyper-marqué
<i>ubp22</i>	0	0
<i>ubp26</i>	3385	26
<i>ubp22ubp26</i>	7227	13

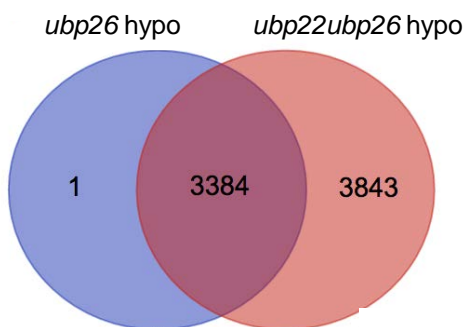
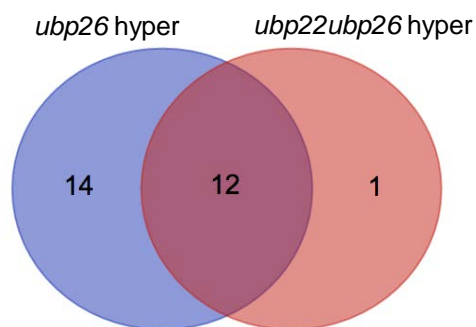
B**C**

Figure 61. Description de la variation d'H3K27me3 chez *ubp22*, *ubp26* et *ubp22ubp26*

(A) Tableau résumant pour chaque lignée mutante, le nombre de gènes hypo-marqués ou hyper-marqués par H3K27me3 par rapport au type sauvage Col-0 après analyse DESeq2 utilisant un facteur de normalisation déterminé par Spike-in de chromatine exogène ($P_{adj} < 0,05$ et $-1 > \log_2(FC) > 1$). Représentation en diagramme de Venn de la répartition des gènes hyper-marqués (B) ou hypo marqués (C) par H3K27me3 entre les deux lignées mutantes *ubp26* et *ubp22ubp26*

L'analyse différentielle des niveaux de H3K27me3 montre que des milliers de gènes sont hypo-marqués dans les lignées *ubp26* et *ubp22ubp26*

Afin de déterminer de façon plus quantitative les variations d'enrichissement en H3K27me3 dans chaque lignée mutante par rapport au type sauvage, une analyse différentielle de type DESeq2 a été entreprise. Celle-ci a été effectuée de façon classique ou en utilisant les lectures de séquençage s'alignant sur le génome de drosophile. Les résultats globaux sont représentés par MA-plots dans la Figure 60. Selon chacune des deux méthodes, le mutant *ubp22* est très peu affecté dans son niveau de H3K27me3 car aucun point rouge représentant les domaines marqués par H3K27me3 significativement enrichis ou appauvris n'est visible (Figures 60A et 60B panels de gauche), en accord avec les observations par immunoblot. Concernant *ubp26* et *ubp22ubp26* dans lesquels des changements massifs sont attendus, la normalisation classique met en évidence un ensemble de domaines hypo et hyper-marqués important, répartis de façon égale le long d'une valeur normative déterminée comme invariable par la méthode DESeq2. Ce profil logique ne correspond pas aux résultats expérimentaux précédents, que ce soit les analyses par western-blot ou la détection des domaines enrichis dans chaque lignée décrite ci-dessus. De façon plus informative, l'utilisation d'un facteur de normalisation déterminé expérimentalement par l'alignement des lectures de drosophile met en évidence un ensemble très important de domaines hypo-marqués chez *ubp26* qui s'amplifie dans le double mutant *ubp22ubp26*. Cette seconde approche plus adaptée permet donc d'une part de valider la baisse importante du niveau de la marque H3K27me3 dans ces lignées et d'identifier ces domaines.

L'analyse des données normalisées sur chromatine exogène révèle qu'aucun gène n'est affecté significativement par une hypo- ou hyper-méthylation dans la lignée *ubp22*. A l'inverse, les lignées *ubp26* et *ubp22ubp26* présentent une très forte tendance à la baisse du niveau des domaines H3K27me3, avec respectivement environ 3400 et 7227 gènes hypo-marqués dans ces deux lignées (Figure 61A). De façon remarquable, comme pour la hausse du niveau de la marque H2Bub vue précédemment, la quasi-totalité des gènes hypo-marqués dans *ubp26* sont inclus dans *ubp22ubp26* (Figure 61B). Comme vu précédemment pour les listes de gènes perdant un domaine H3K27me3, le nombre de gènes affecté par une baisse significative de H3K27me3 double dans la lignée *ubp22ubp26* par rapport à *ubp26*, suggérant ainsi que UBP22 parviendrait à compenser l'effet positif d'UBP26 sur H3K27me3 sur de nombreux gènes.

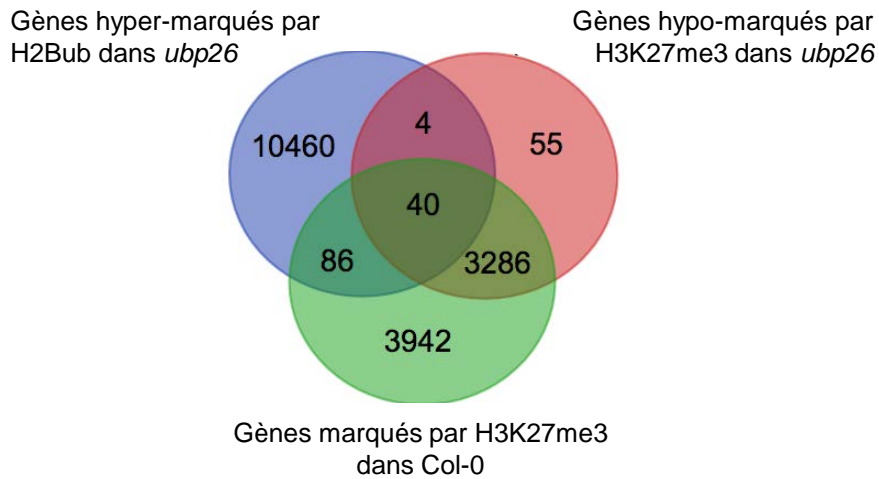


Figure 62. Etude de la proportion de gènes gagnant H2Bub aux dépens d'H3K27me3 dans *ubp26*
 Diagramme de Venn représentant le recouvrement entre les gènes hyper-marqués par H2Bub ($P_{adj} < 0,05$ $\log_2(FC) > 1$), les gènes hypo-marqués par H3K27me3 ($P_{adj} < 0,05$ $\log_2(FC) < -1$) dans le mutant *ubp26* et les gènes marqués par H3K27me3 dans la lignée sauvage Col-0.

Une absence de lien évident entre défaut de déubiquitination de H2Bub et perte de H3K27me3

D'après le modèle hypothétique proposé Figure 55A, le maintien de domaines enrichis en H2Bub sur certains gènes dans le mutant *ubp26* pourrait empêcher le dépôt optimal de la marque H3K27me3. Par extension, la baisse du niveau de H3K27me3 devrait théoriquement porter sur des domaines normalement ciblés par UBP26 pour l'enlèvement de H2Bub et non-marqués par H2Bub dans le type sauvage. Afin d'explorer cette hypothèse, j'ai croisé la liste de gènes hyper-marqués par H2Bub avec celle des gènes hypo-marqués par H3K27me3 dans le mutant *ubp26* et celle des gènes marqués par H3K27me3 dans la lignée sauvage Col-0 (Figure 1-62). De façon surprenante, seulement 40 gènes présentent les trois caractéristiques, indiquant qu'à l'exception de ces 40 gènes, les trois ensembles de gènes sont globalement très significativement distincts (test de représentativité). Ainsi, cette observation contre-intuitive suggère qu'au stade développemental étudié, UBP26 aurait exercé une activité de déubiquitination sur des sites différents de ceux qui sont affectés pour l'enrichissement en H3K27me3. Ces études récentes et encore préliminaires seront affinées pour tenter de mieux comprendre les implications de cette exclusion. De plus, le modèle pourra être testé dans des conditions dynamiques de transitions développementales ou le dépôt de H3K27me3 est primordial pour la répression active de gènes spécifiques au cours du développement ou en réponse à des signaux de l'environnement.

Conclusions

Les analyses de profilage de la marque H3K27me3 dans les différentes lignées mutantes montrent qu'UBP26 est nécessaire pour atteindre ou maintenir un niveau optimal de H3K27me3 sur des milliers de gènes. L'utilisation d'une technique de normalisation basée sur une référence interne après immono-précipitation simultanée (spike-in) de chromatine de drosophile s'est révélée essentielle pour détecter les changements massifs d'enrichissement en H3K27me3 sur des milliers de gènes dans les mutants *ubp26* et *ubp22ubp26*. Ces variations ne semblent pas aboutir à des profils de marquage génique aberrants, mais plutôt des pertes quasi-totales sur plusieurs centaines de gènes et des baisses d'enrichissement distribuées le long de nombreux autres gènes. UBP22 semble être capable de partiellement compenser l'absence d'UBP26 sur cette fonction. L'impact de la perte de fonction d'UBP26 sur le profil génomique H3K27me3 ne semble pas être dû à une dérégulation de l'expression des gènes codant des sous-unités des complexes PRC2 ou PRC1. Un modèle mécanistique est proposé, dans lequel l'enlèvement actif de domaines enrichis en H2Bub est nécessaire lors d'une transition entre état transcrit et état réprimé par PRC2 pour le dépôt de H3K27me3. Ce modèle est supporté par la suppression partielle de la baisse du niveau global de H3K27me3 dans le double mutant *hub1-*

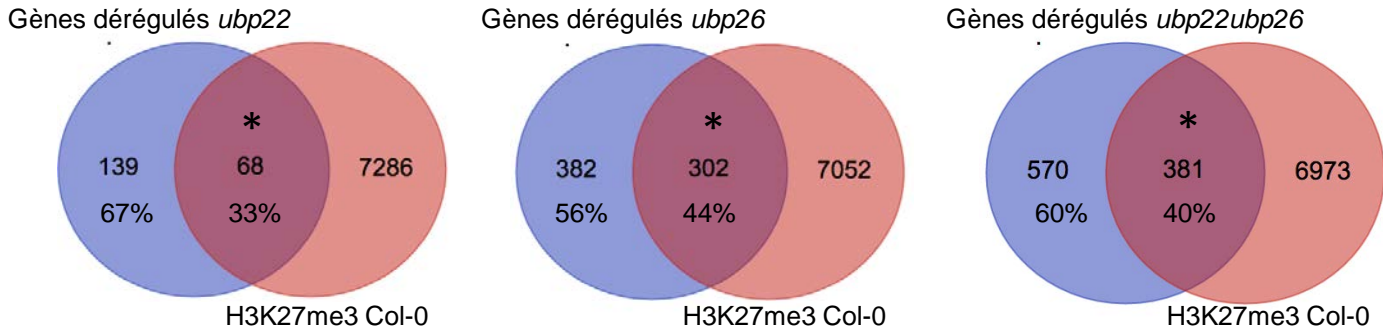


Figure 63. Etude de la proportion de gènes marqués par H3K27me3 et dérégulés dans les mutants
 Diagramme de Venn représentant pour chaque mutant le recouvrement entre les gènes dérégulés dans le RNA-seq ($P_{adj} < 0,05$ $-1 > \log_2(FC) > 1$) et les gènes marqués par H3K27me3 dans Col-0. (*= test de représentativité $p < 0,01$)

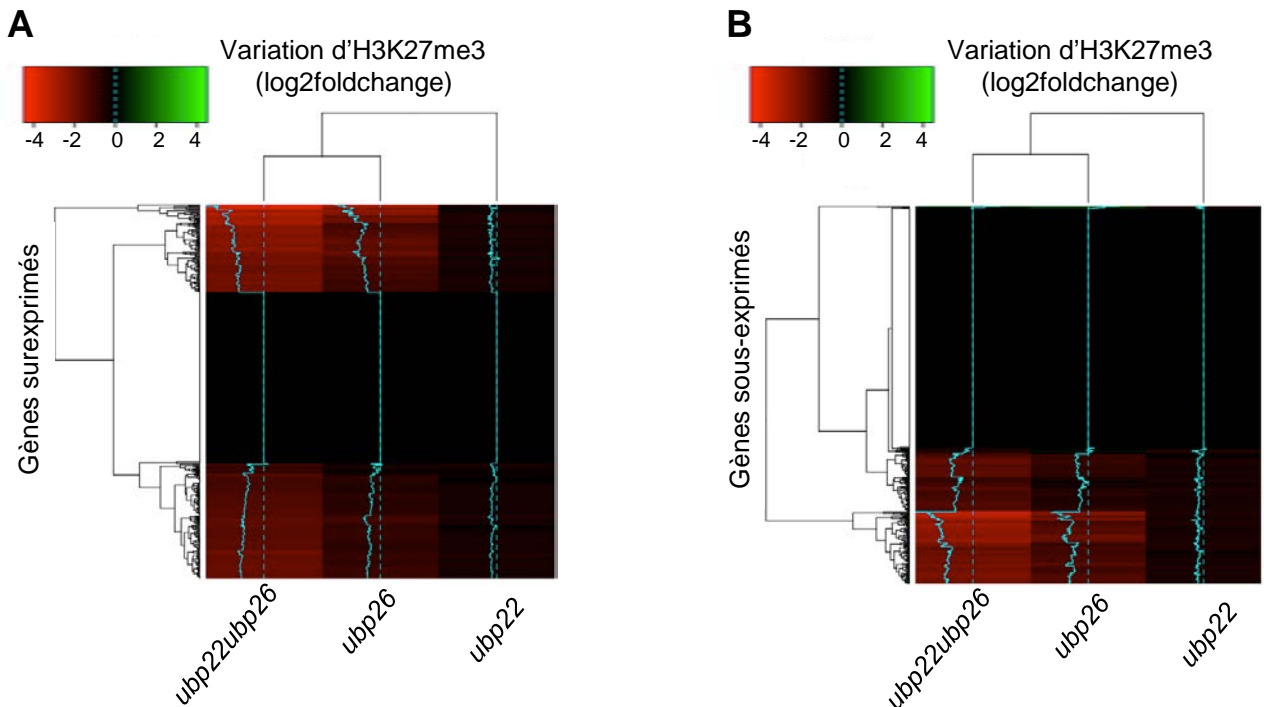


Figure 64. Visualisation de la variation d'H3K27me3 sur les gènes différentiellement exprimés dans les lignées mutantes
 Heatmap représentant le groupement hiérarchisé de la variation d'H3K27me3 déterminée par ChIP-seq pour les gènes surexprimés (A) ou sous-exprimés (B) d'après les RNA-seq des lignées indiquées ($P_{adj} < 0,05$ $1 < \log_2(FC) < -1$).

3ubp26 suggérant que le défaut de H3K27me3 dans le fonds *ubp26* est lié à la présence de la marque H2Bub. Les locus ciblés directement par UBP26 influant sur la marque H3K27me3 restent à préciser. En effet, contrairement à nos premières hypothèses, les gènes hyper-marqués par H2Bub présentent une forte tendance à ne pas être affectés eux-mêmes par un hypo-marquage H3K27me3 dans le mutant *ubp26* ou même par un marquage H3K27me3 dans la lignée sauvage Col-0, indiquant que les gènes sur lesquels H2Bub est déubiquitiné par UBP26 sont en majorité distincts de ceux sur lesquels une baisse de H3K27me3 est observée. Une sous-liste de 40 gènes dont le marquage évolue suivant nos hypothèses a pu être identifiée, et servira de support pour la poursuite de ces études.

3.3 Etude du lien entre la perte de H3K27me3 et les changements d'expression des gènes dans les lignées *ubp26*

De nombreuses études génétiques et moléculaires chez les plantes et d'autres organismes eucaryotes ont montré que la marque chromatinienne H3K27me3 est caractéristique de nombreux gènes réprimés par PRC2 (Roudier et al., 2011 ; Zhang et al., 2007). Il a donc semblé intéressant de tester si la baisse de marquage H3K27me3 dans les lignées *ubp26* et *ubp22ubp26* était reflétée par une altération de l'expression des gènes correspondants. Dans un premier temps j'ai étudié la proportion de gènes marqués par H3K27me3 parmi les gènes dérégulés dans chaque lignée mutante afin de déterminer si ces gènes sont normalement ciblés par l'activité PRC2 (Figure 63). Les gènes dérégulés dans les 3 lignées mutantes sont effectivement fréquemment marqués par H3K27me3 dans le type sauvage Col-0. En effet, le marquage affecte 33% des gènes dérégulés dans *ubp22* et augmente jusqu'à 44% et 40% respectivement pour *ubp26* et *ubp22ubp26*. Ces proportions sont significativement différentes de la proportion attendue par hasard d'après un test de représentativité, indiquant une corrélation entre le ciblage de ces gènes par PRC2 et la dérégulation de gènes dans ces lignées. Cette proportion est particulièrement élevée pour les gènes dérégulés dans *ubp26* pour lesquels 44% des gènes dérégulés sont ciblés par PRC2 dans le type sauvage.

Une analyse de groupement hiérarchique représentée par heatmap de la variation de H3K27me3 pour les gènes dérégulés ou sous-exprimés dans chaque lignée mutante permet d'observer pour environ 2/3 des surexprimés (Figure 64A) et 1/3 des gènes sous-exprimés (Figure 64B) une association entre changement d'expression et un hypo-marquage par H3K27me3. Réciproquement, cette analyse ne permet pas de mettre en évidence une tendance pour les gènes hyper-marqués. Par conséquent, j'ai réalisé une analyse des variations d'expression par rapport au type sauvage pour l'ensemble des gènes perdant ou gagnant un domaine H3K27me3 dans chaque lignée mutante (Figure 65). Aucun changement significatif n'est présent chez *ubp22*. A l'inverse, l'ensemble de gènes gagnant un domaine H3K27me3 chez *ubp26* (n=326) ou chez *ubp22ubp26* (n=162) est très significativement

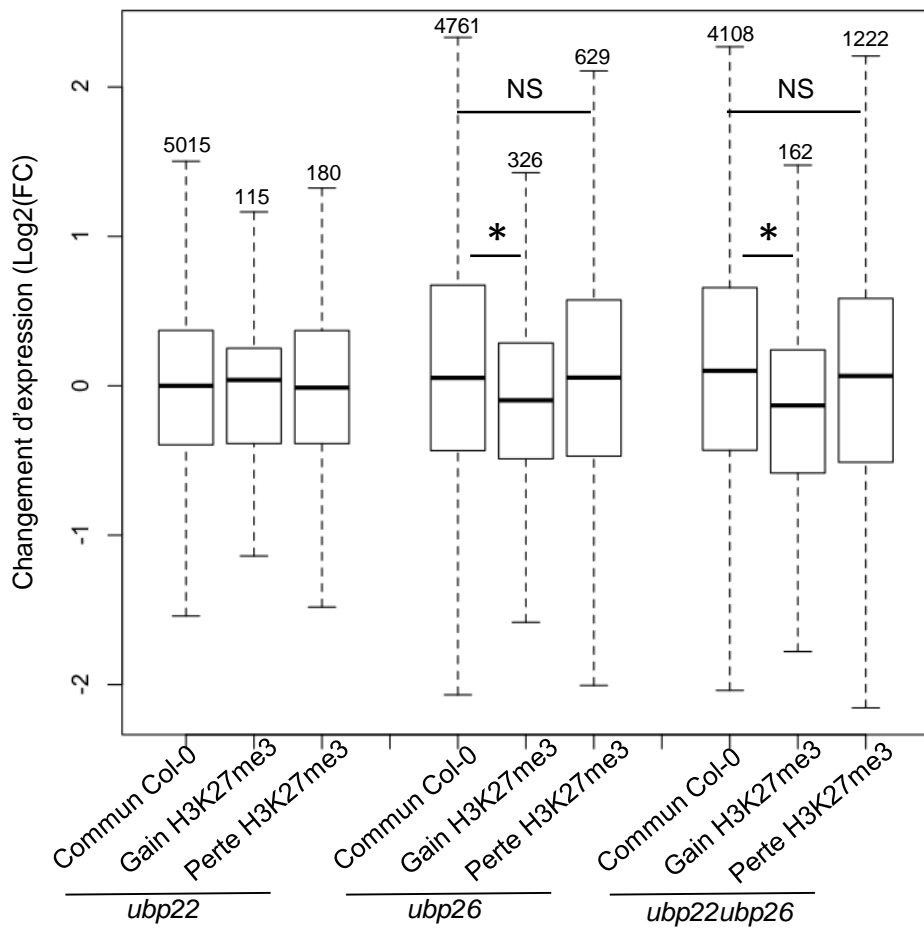


Figure 65. Analyse du changement d'expression des gènes gagnant et perdant un domaine H3K27me3

Boxplot représentant le changement d'expression (Log2(FC)) des gènes gagnant/perdant un domaine H3K27me3 dans chaque mutant comparé aux gènes conservant H3K27me3 dans les plantules sauvages et mutantes. Le nombre de gène considéré est indiqué pour chaque échantillon (*=Ttest pval < 0,01).

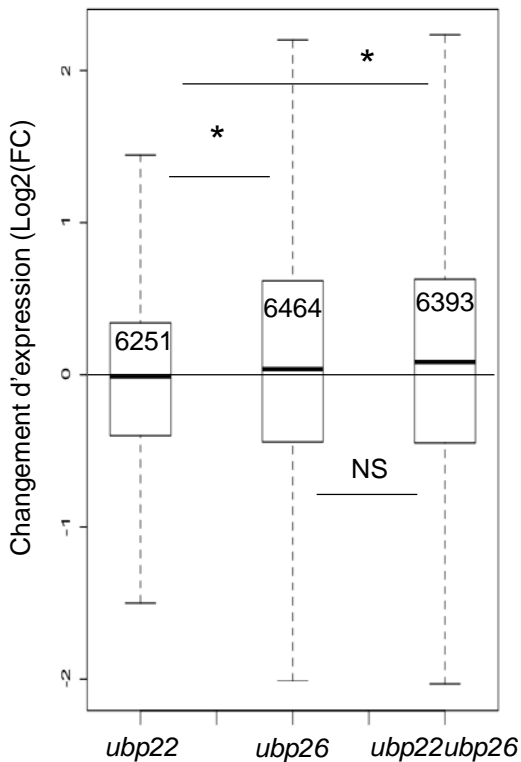


Figure 66. Analyse du changement d'expression des gènes marqués par H3K27me3 dans la lignée sauvage

Boxplot représentant le changement d'expression (Log2(FC)) des gènes marqués par H3K27me3 dans la lignée sauvage Col-0. Le nombre de gène considéré est indiqué pour chaque échantillon (*=Ttest pval < 0,01).

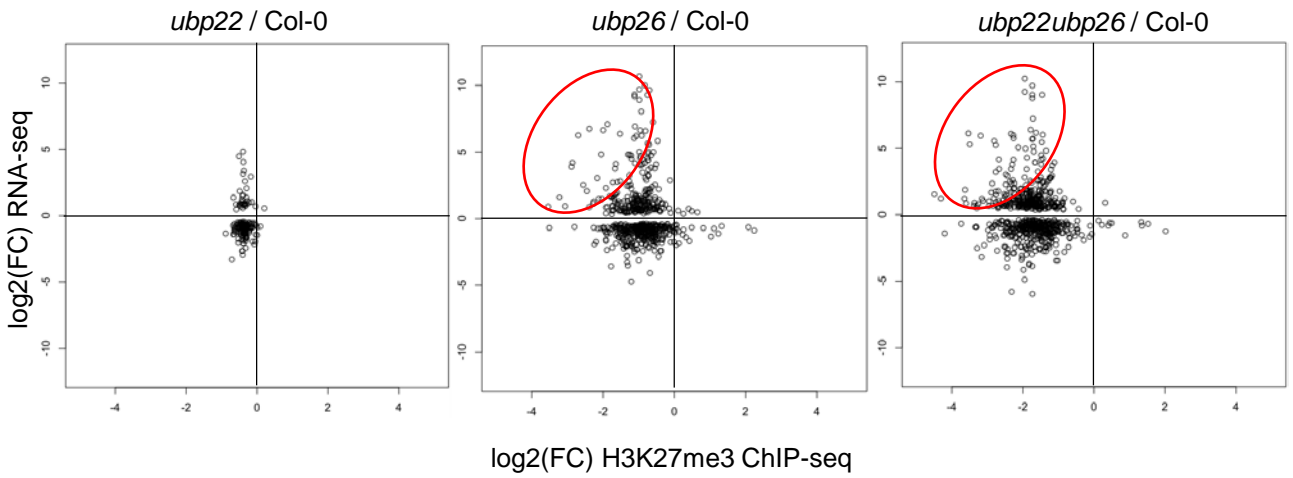


Figure 67. Analyse de la variation d'expression en fonction de la variation d'H3K27me3 pour chaque lignée

Scatter plot représentant, pour chaque mutant, le changement d'amplitude des gènes dérégulés ($\text{Padj} < 0,05$ $-1 < \log_2(\text{FC}) > 1$) en fonction de leur variation de niveau d'H3K27me3

sous-exprimé par rapport aux gènes conservant leurs domaines H3K27me3. Ce résultat est cohérent avec un rôle de l'établissement de la marque H3K27me3 par PRC2 dans la répression des gènes. En revanche, aucun changement d'expression significatif n'est observé pour les gènes perdant un domaine H3K27me3 chez *ubp26* ou *ubp22ubp26* par rapport aux gènes maintenant leur domaine H3K27me3 (Figure 65, b et B ainsi que c et C). Ce résultat suggère que la perte du domaine H3K27me3 n'impacte pas de façon générale l'expression des gènes à ce stade de développement.

Cette dernière analyse ne considérant que les gènes perdant ou gagnant globalement un domaine H3K27me3, il reste possible que d'autres gènes puissent conserver un certain niveau de marquage H3K27me3 dans *ubp26* ou *ubp22ubp26* (gènes hypo-marqués, par exemple marqués dans certaines cellules dans les plantes *ubp26*) avec une certaine conséquence en termes d'expression. J'ai donc analysé à un niveau plus global l'effet des différents mutants sur la régulation des gènes PRC2 en comparant les changements d'expression des gènes marqués H3K27me3 chez la lignée sauvage Col-0 dans chaque mutant (Figure 66). Sous l'hypothèse que de par son effet très limité sur polycomb, les gènes marqués par H3K27me3 dans le mutant *ubp22* ne changent globalement pas d'expression, on remarque que les gènes marqués par H3K27me3 dans le sauvage sont globalement significativement surexprimés chez *ubp26* et *ubp22ubp26*. Afin d'effectuer une analyse plus fine des niveaux de méthylation, par exemple en individualisant les gènes, une représentation en scatterplot de l'ensemble des gènes dont l'expression varie dans chaque mutant en fonction du changement de marquage H3K27me3 a été générée (Figure 67). Cette analyse permet en effet d'identifier des tendances fortes pour certains gènes. Pour *ubp22* les variations de marquage H3K27me3 et de niveaux de transcrits sont minimales et de très faible amplitude. À l'inverse, dans *ubp26* une population de gènes est à la fois fortement surexprimée et hypo-marquée par H3K27me3 (cercle rouge). Cette population est encore plus démarquée dans le double mutant *ubp22ubp26*.

Conclusion

L'intégration des données transcriptomiques obtenues par RNA-seq et épigénomiques sur la marque H3K27me3 a permis d'observer d'une part une forte tendance des gènes dérégulés dans les mutants perte de fonction d'*UBP26* à être des gènes marqués par H3K27me3 dans le type sauvage. D'autre part, qu'ils soient sous- ou surexprimés, environ un tiers ou deux tiers des gènes présentent respectivement une baisse du marquage H3K27me3. Une corrélation significative entre l'acquisition d'un domaine H3K27me3 et un faible niveau d'expression après perte de fonction d'*UBP26* a pu être identifiée. Ainsi qu'une légère mais significative dé-répression globale des gènes ciblés par PRC2 dans les mutants *ubp26* et *ubp22ubp26*. Une sous-population de gènes présentant une hypo-méthylation

A

	TE surexprimés	TE sous-exprimés	Total
<i>ubp22</i>	4 (50%)	4 (50%)	8
<i>ubp26</i>	61 (79%)	16 (21%)	77
<i>ubp22ubp26</i>	69 (78%)	20 (22%)	89

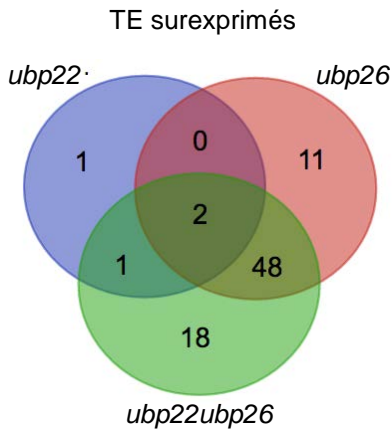
B

Figure 68. Etude des changements d'expression des TEs dans les différentes lignées

(A) Tableau récapitulatif du nombre de TEs impactés dans leur expression pour chaque lignée mutante. (B) Diagramme de Venn de montrant le recouvrement entre les listes de TEs surexprimés dans les différents mutants ($P_{adj} < 0,05$ et $\log_2(FC) > 1$)

Superfamille	TAIR10		TEs surexprimés dans <i>ubp26</i>	
	nombre	%	nombre	%
DNA/MuDR	5410	17	5	8
LTR/Copia	1781	6	9	15
DNA	1829	6	0	0
DNA/Mariner	151	0	0	0
DNA/En-Spm	941	3	9	15
LTR/Gypsy	4181	13	18	30
DNA/HAT	1035	3	1	2
DNA/Pogo	344	1	0	0
DNA/Harbinger	379	1	10	16
LINE/L1	1366	4	3	5
RC/Helitron	12945	42	1	2
SINE	131	0	1	2
DNA/Tc1	95	0	0	0
RathE1_cons	213	1	0	0
RathE2_cons	74	0	0	0
RathE3_cons	104	0	0	0
Unassigned	129	0	4	7
LINE?	81	0	0	0
total	31189		61	

Figure 69. Détermination des superfamilles de TEs affectées dans *ubp26*

Tableau récapitulatif du nombre et de la proportion relative des principales familles de TEs dans le génome d'*Arabidopsis* (source, TAIR10) et ceux surexprimés dans *ubp26* ($P_{adj} < 0,05$ - $1 > \log_2(FC) > 1$)

Chr	TE surexprimés	bras chromosomique	région péricentromérique
1	15	4	11
2	12	4	8
3	16	9	7
4	8	2	6
5	10	2	8
total	61	21	40

Figure 70. Proportion de TEs hétérochromatiniens surexprimés chez *ubp26*

Tableau récapitulatif du nombre de TEs surexprimés pour chaque chromosome, ainsi que le nombre de TEs positionnés sur les bras chromosomiques ou dans les régions péricentromériques.

et fortement surexprimés dans les lignées *ubp26* a également été mise en évidence. Ceci indique que la diminution du niveau de la marque H3K27me3 corrèle avec une surexpression du locus correspondant à ce stade de développement, mais cet effet serait généré par une minorité de gènes. Les gènes influencés par ces changements ainsi que leurs profils d'expression, notamment durant la formation de la graine et au cours du développement de la plantule, seront étudiés plus en détail dans de futures analyses afin d'identifier un potentiel lien fonctionnel.

3.3 UBP26 affecte l'organisation et la régulation de régions hétérochromatiniennes

De nombreux TEs péracentromériques sont dérégulés en absence d'UBP26

Considérant l'effet de la perte de fonction d'*UBP26* sur les éléments transposables *AtMULE*, *AtGP1* et *AtLINE1-4* identifié préalablement (Sridhar et al, 2007), j'ai utilisé les données RNA-seq pour caractériser ce phénotype à l'échelle du génome. Les paramètres utilisés pour l'alignement des lectures RNA-seq utilisés ici pour l'étude des différentes lignées mutantes sont très sélectifs. En effet, les lectures correspondant à plusieurs séquences du génome ont été assignées de façon aléatoire à une seule de ces positions. Dans ces conditions, l'étude des éléments transposable est fiable et évite de "créer" de l'information en multipliant les matchs identiques, bien que les effets observés soient potentiellement réduits. On observe que seulement 8 TEs sont dérégulés chez *ubp22*, contrairement à la lignée *ubp26* pour laquelle 77 TEs sont dérégulés, en majorité surexprimés (Figure 68A). Un nombre similaire de TEs est surexprimé dans le double mutant *ubp22ubp26*, ces TEs étant en majorité partagés avec *ubp26* (Figure 68B). Ces observations confirment et étendent la description préalable qu'*UBP26* est requis pour la répression de certains TEs (Sridhar et al., 2007), probablement du fait de la perte de déubiquitination sur ces éléments.

Les éléments transposables dé-réprimés en absence d'*UBP26* fonctionnel, ont été regroupés par famille pour analyser leur représentativité (Figure 69). On remarque que trois familles sont surreprésentées : les DNA/EN-Spm, les LTR/Gypsy et les DNA/Harbinger, en accord avec l'identification de *AtGP1* dans l'étude de Sridhar et al (2007). Le mécanisme dans lequel *UBP26* est impliqué est donc relativement spécifique à quelques types de TEs. L'analyse de leur distribution chromosomique indique qu'ils sont répartis sur les cinq chromosomes (Figure 70). Cependant, l'analyse de leurs coordonnées génomiques indique qu'environ deux tiers sont situés dans les régions péracentromériques hétérochromatiniennes d'après les coordonnées génomiques données dans Bernatavichute et al., (2008) (Figure 70). J'ai ensuite étudié si un potentiel marquage par H2Bub ou H3K27me3 de ces TEs était affecté dans les mutants. En accord avec leur localisation hétérochromatinienne, les TEs surexprimés dans *ubp26* ne sont marqués ni par H2Bub ni par H3K27me3 dans le type sauvage Col-0,

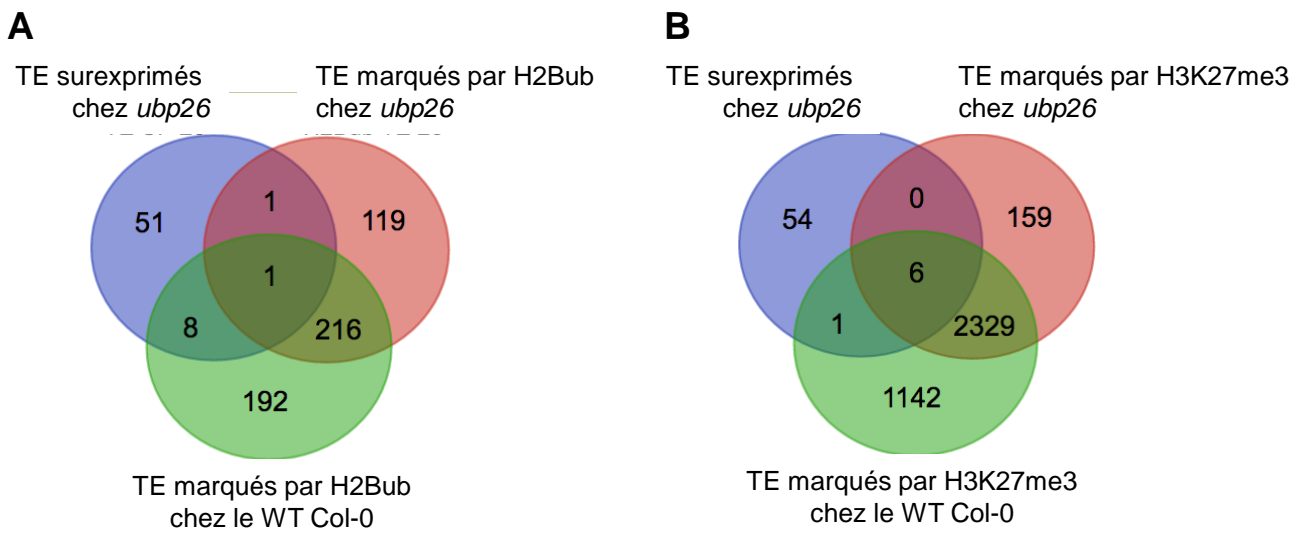


Figure 71. Etude du marquage des TEs surexprimés chez *ubp26*

(A) Diagramme de Venn représentant le recouvrement entre les listes de TEs surexprimés chez *ubp26*, les TEs marqués par H2Bub chez *ubp26* et ceux marqués par H2Bub chez le type sauvage Col-0 (B) Analyse similaire au diagramme A avec le marquage H3K27me3.

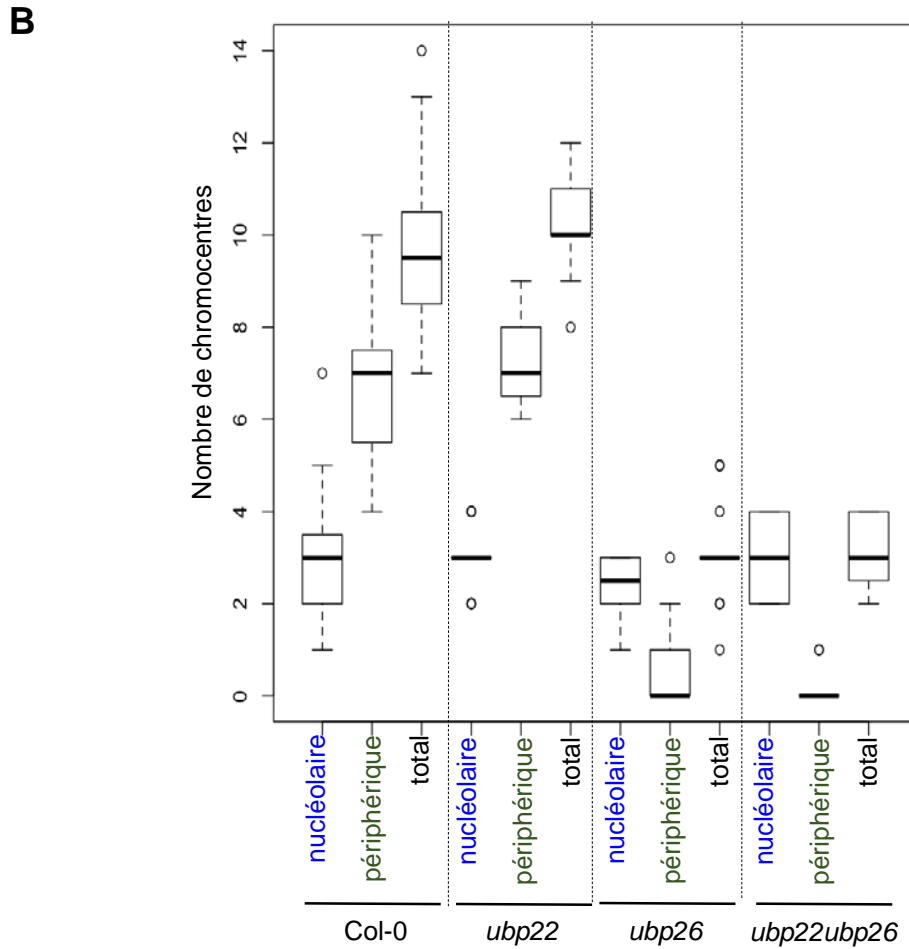
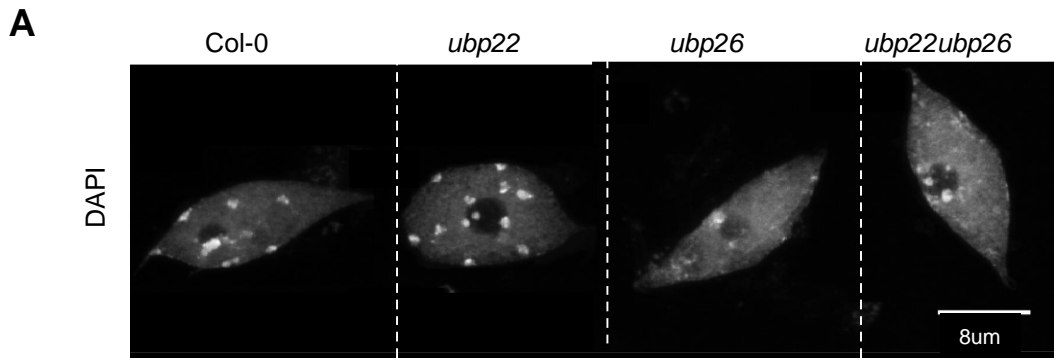


Figure 72. Etude de l'organisation de l'hétérochromatine dans la lignée *ubp26*

(A) Image représentative de noyaux de cotylédons matures isolés de plantules de 7 jours pour chaque lignée indiquée et colorés au DAPI. (B) Quantification sur 50 noyaux par génotype des chromocentres nucléolaires et périphériques après isolement de noyaux et coloration au DAPI.

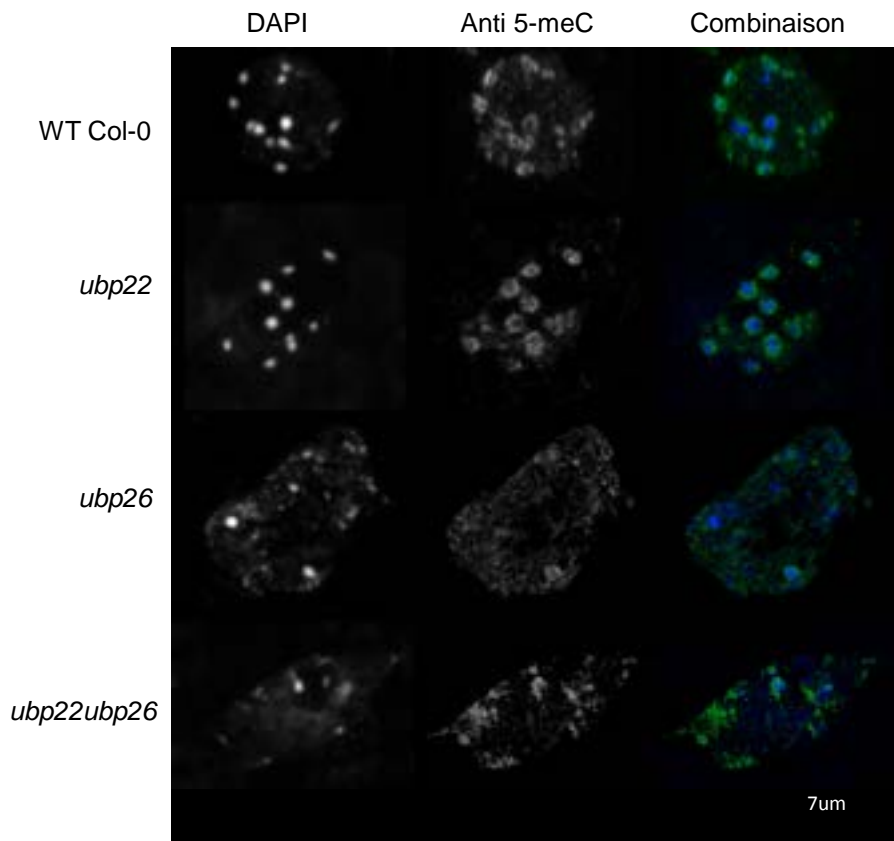


Figure 73. Visualisation de la méthylation de l'ADN dans la lignée *ubp26*

Immuno-détection de la méthylation de l'ADN chez le type sauvage Col-0 et dans la lignée *ubp26* sur des noyaux de cotylédons isolés de plantules de 7 jours. Une combinaison montre le DAPI en bleu l'ADN méthylé en vert.

et on observe que pour l'immense majorité d'entre eux ce n'est également pas le cas dans *ubp26* (Figure 71).

L'organisation nucléaire est affectée chez *ubp26*

Les analyses transcriptomiques ci-dessus indiquent qu'UBP26 influence la répression d'éléments répétés de façon spécifique aux régions péricentromériques, qui représentent une large part de l'hétérochromatine chez Arabidopsis. Afin de tester si ce phénotype est associé à un défaut d'organisation de l'hétérochromatine, j'ai effectué un marquage de l'ADN au DAPI sur des noyaux d'Arabidopsis isolés de cotylédons de plantules de 7 jours et observé leur architecture nucléaire par microscopie confocale (Figure 72A). La lignée de type sauvage Col-0 et le mutant *ubp22* ont une architecture nucléaire similaire qui correspond au profil attendu avec typiquement un regroupement de l'hétérochromatine ainsi définie cytologiquement en 8 à 10 chromocentres (Fransz et al., 2002). A l'inverse, les noyaux de cotylédons des mutants *ubp26* et *ubp22ubp26* présentent très peu de chromocentres visibles. La quantification de deux catégories de chromocentres sur cinquante noyaux de chaque génotype confirme ces observations, avec différents effets suivant leur localisation nucléolaire, connue pour contenir les unités ADNr 45S silencieux (Fransz and de Jong, 2011) ou périphérique, (Figure 72B). Les chromocentres périphériques contenant de nombreux éléments transposables sont quasi indétectables. Ce phénotype est très marqué et également homogène dans la population de noyaux. Une analyse par immunofluorescence utilisant un anticorps anti-5-méthylcytidine montre que l'ADN fortement méthylé est principalement concentré au niveau des chromocentres dans le type sauvage et le mutant *ubp22* comme attendu alors que dans le mutant *ubp26* la méthylation est toujours présente mais largement dispersée dans le nucléoplasme (Figure 73). Dans l'ensemble, ces analyses montrent que UB26 a une fonction non seulement dans la régulation de l'expression de TEs péricentromériques, mais plus particulièrement dans l'établissement ou le maintien de régions hétérochromatiniennes condensées et silencieuses.

Conclusion

UBP26 est impliquée dans la répression de plusieurs dizaines d'éléments transposables en majorité hétérochromatiniens qui ne sont typiquement pas marqués par H2Bub ni par H3K27me3. Les nombres de TEs dé-réprimés après perte de fonction d'UBP26 sont peut-être sous-estimés, et des analyses complémentaires seront effectuées afin d'étudier plus en détail l'impact d'UBP26 sur la transcription de ces TEs et le lien potentiel avec un effet plus général d'UBP26 dans l'organisation de l'hétérochromatine. Ainsi, ces analyses ont révélé qu'UBP26 est nécessaire pour la mise en place ou la

maintenance d'une hétérochromatine structurée au sein de chromocentres périphériques chez *Arabidopsis*, potentiellement en association avec des facteurs de la périphérie nucléaire comme par exemple la famille des protéines CRWN identifiée par TAP-tag.

DISCUSSION

4.1 Un module de déubiquitination de type SAGA-DUBm atypique chez *A. thaliana*

Les travaux effectués pendant cette thèse sur l'espèce *Arabidopsis thaliana* ont permis d'identifier la protéine UBP22 comme étant un homologue de l'ubiquitine protéase Ubp8 de *S. cerevisiae*. UBP22 est capable de compléter un mutant de levure perte de fonction pour *Ubp8*, démontrant ainsi son activité de déubiquitination de l'histone H2B *in vivo*, probablement en formant un module de déubiquitination fonctionnel chez cette espèce. Comme Ubp8, UBP22 s'associe physiquement avec AtSUS1 et AtSGF11, les orthologues de Sus1 et Sgf11 de *S. cerevisiae* au sein d'un module nucléaire. La modélisation de la structure secondaire de ce module de trois protéines indique qu'elle est très similaire à celle identifiée par cristallographie pour le DUBm de *S. cerevisiae*, avec une conservation des lobes d'assemblage et catalytique ainsi que des trois domaines doigts de zinc, qui chez *S. cerevisiae*, sont nécessaires à l'assemblage et l'activité enzymatique du module. La perte de fonction d'UBP22 aboutit à un gain global de la marque H2Bub d'environ deux fois, essentiellement au niveau de régions transcrites des gènes, indiquant que UBP22 participe au maintien d'un faible niveau de H2Bub chez Arabidopsis. Ces observations confirment que le SAGA-DUBm de la levure et son activité de déubiquitination de H2Bub, très conservés chez d'autres espèces comme l'humain et la drosophile, le sont aussi chez Arabidopsis. De plus UBP22 serait la seule déubiquitinase impliquée dans ce module. En effet, il a été montré ici par TAP-tag que UBP22 est la seule UBP interagissant avec AtSGF11 et également la seule présentant une structure tridimensionnelle prédite similaire à Ubp8.

Plus inattendu, un gène codant pour Sgf73 ou ATXN7, le quatrième composant du SAGA-DUBm respectivement chez *S. cerevisiae* ou l'humain et la drosophile, n'est pas identifiable dans le génome d'Arabidopsis. De plus, aucune sous-unité potentielle du complexe SAGA n'a été détectée lors des expériences de TAP-tag utilisant UBP22 comme appât, mais également utilisant AtSGF11, qui fait partie de SAGA dans tous les autres organismes étudiés : seules les trois protéines UBP22, AtSGF11 et AtSUS1 ont pu être co-purifiées. L'absence de potentiel homologue de Sgf73 pose plusieurs interrogations sur le fonctionnement de cette voie de déubiquitination de H2Bub chez Arabidopsis. En effet chez *S. cerevisiae* Sgf73 est essentiel pour l'activité catalytique du module via son doigt de zinc et sert de pont pour l'associer au gigantesque complexe SAGA. Cette protéine est donc primordiale pour l'activité du module chez cette espèce (Durand et al., 2014; Köhler et al., 2010). Il est intéressant de noter qu'en revanche, chez la drosophile, le module reste fonctionnel malgré la perte de fonction d'Atxn7, et dans ce cas il fonctionne indépendamment du complexe SAGA (Mohan et al., 2014). Chez l'humain également, les protéines ATXN7L3 et ENY2 (respectivement orthologues de ScSgf11 et ScSus1) peuvent interagir avec deux autres ubiquitine protéases, USP51 et USP27X, et déubiquitiner H2Bub indépendamment de SAGA. Ces éléments suggèrent que le module UBP22-AtSGF11-AtSUS1 serait potentiellement capable d'être actif de façon indépendante de Sgf73 et du complexe SAGA chez

Arabidopsis. Si le module caractérisé dans cette thèse est indépendant de SAGA, un nouveau mécanisme d'adressage de ce complexe pourrait être présent chez Arabidopsis. Dans de futures analyses, la détermination des dynamiques d'acétylation portées par le complexe SAGA dans un fonds mutant *ubp22* permettra peut-être d'apporter des informations sur la coopérativité entre les deux activités enzymatiques d'acétylation des histones H3/H4 et de déubiquitination de H2B normalement portées par le complexe SAGA. Par ailleurs, l'étude de la coévolution de la structure des composants des DUBm pourrait peut-être permettre d'expliquer comment certains modules peuvent être enzymatiquement actifs sans Sgf73/ATXN7 alors que d'autres ne le peuvent pas.

L'analyse par chromatographie d'exclusion de taille a montré que la protéine UBP22-GFP s'associe à un complexe ayant approximativement la taille prédite pour un module UBP22-GFP/AtSGF11/AtSUS1, mais cette protéine est aussi détectée dans des complexes de haut poids moléculaire. Ces complexes pourraient soit apparaître de façon artéfactuelle par agrégation de la protéine durant l'analyse de chromatographie, soit correspondre de façon significative à un assemblage de haut poids moléculaire. Pour tester si AtSGF11 fait également partie de ces différents complexes, l'expérience de chromatographie d'exclusion de taille sera répétée après avoir introduit UBP22-GFP dans un fond mutant *sgf11-1*, permettant ainsi de tester la formation ou la stabilité du module en absence de cette protéine chez Arabidopsis. Le phénotype de gain de H2Bub global dans le fonds mutant *sgf11-1* montre déjà à ce stade une influence essentielle de ce second composant sur l'activité de déubiquitination de H2Bub, probablement portée par UBP22. D'autre part, des expériences de co-immunoprécipitation utilisant UBP22-GFP comme appât suivies d'analyses par spectrométrie de masse pourraient éventuellement permettre d'identifier d'autres partenaires d'UBP22 dans des conditions moins stringentes que celles utilisées pour l'approche TAP-tag.

L'analyse de la distribution subnucléaire des trois composants UBP22, AtSGF11, AtSUS1 et également de DDA1 par immunofluorescence a montré une localisation euchromatinienne excluant les chromocentres, à l'exception de AtSUS1. Sa localisation partiellement hétérochromatinienne suggère que AtSUS1 pourrait être impliquée dans un autre mécanisme que celui avec UBP22 et SGF11. Chez *S. cerevisiae*, Sus1 fait partie du complexe TREX-2 qui interagit avec les pores nucléaires et est impliqué dans l'exportation des ARN messagers (García-Oliver et al., 2012). Les principaux composants de ce complexe et son interaction avec les pores nucléaires sont conservés chez Arabidopsis, néanmoins l'implication d'AtSUS1 reste hypothétique (Lu et al., 2010). L'analyse des protéines partenaires de cette petite protéine permettrait potentiellement de déterminer si elle est impliquée dans le complexe TREX-2 ou un autre complexe chez Arabidopsis.

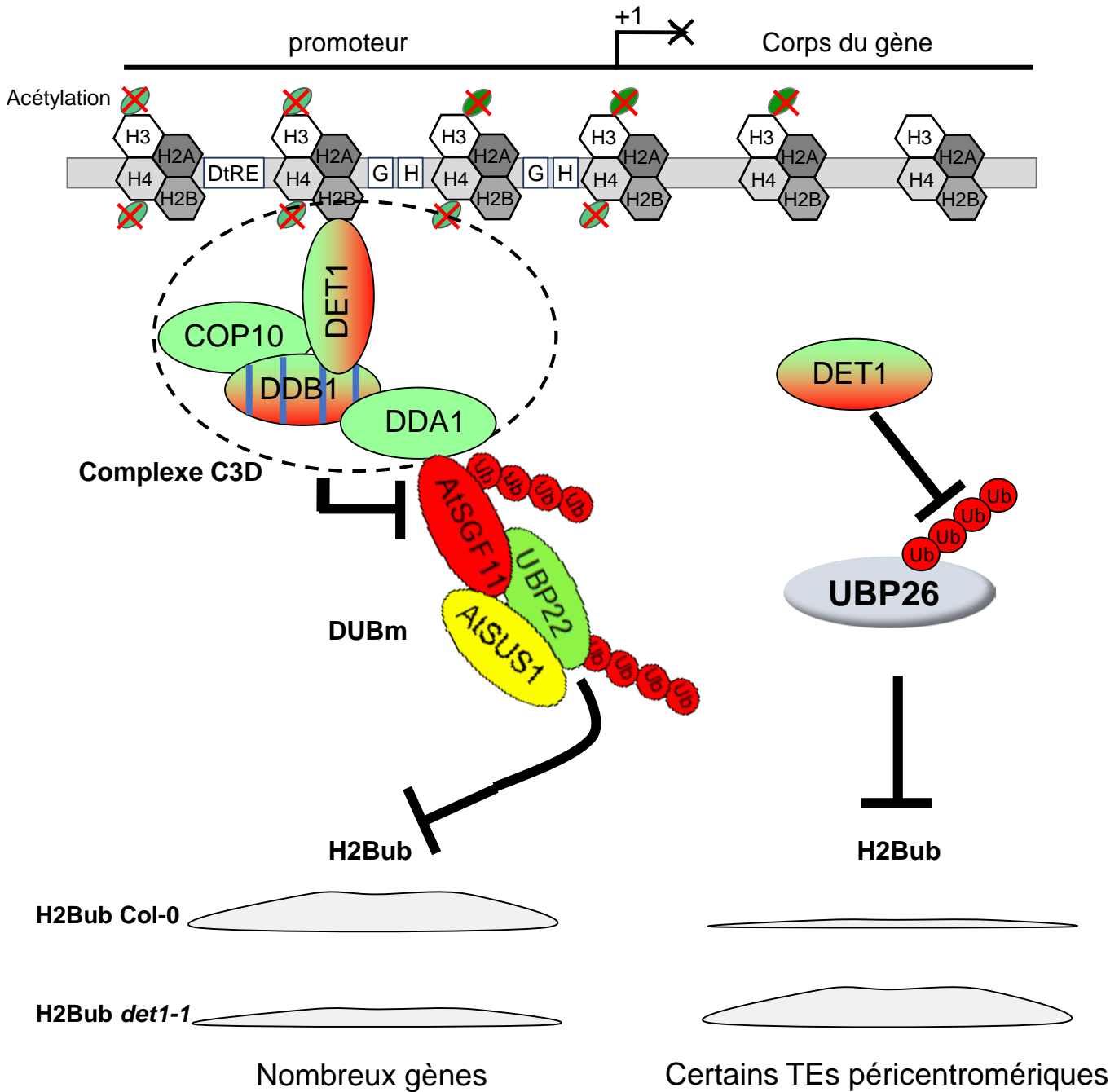


Figure 74. DET1 agit de manière antagoniste sur le DUBm et UBP26

Le complexe C3D catalyse la poly-ubiquitination d'AtSGF11 et potentiellement d'UBP22 menant à la dégradation protéasomale du module UBP22-AtSGF11-AtSUS1 et à l'accumulation d'H2Bub. Dans le mutant *det1-1*, l'accumulation du module entraîne une dé-ubiquitination excessive et une baisse du niveau d'H2Bub sur de nombreux gènes. A l'inverse DET1 est requis pour la stabilité d'UBP26 permettant une dé-ubiquitination et le silencing efficace de certains TEs. Le mutant *det1-1* est probablement limité en quantité d'UBP26, créant une accumulation d'H2Bub sur ces TEs, et la réactivation partielle de certains d'entre eux au niveau des régions hétérochromatiniennes péricentromériques.

4.2 La régulation du DUBm par la signalisation lumière

Différentes analyses réalisées au cours de cette thèse et de façon concomitante par l'équipe du Dr Vicente Rubio (CNB, Madrid) ont montré que l'abondance des protéines UBP22 et AtSGF11 est dramatiquement plus élevée dans des plantules poussées à la lumière qu'à l'obscurité. Le mécanisme régulateur impliqué est apparemment indépendant d'une régulation transcriptionnelle, les niveaux de transcrits des deux gènes étant similaires dans ces deux conditions (données non montrées). Il s'agit certainement d'un mécanisme de dégradation protéolytique contrôlé par poly-ubiquitination d'UBP22 et AtSGF11. Une poly-ubiquitination de chacune des deux protéines dans des extraits de plantules à l'obscurité a été observée par analyse d'affinité à une résine P62 (Rubio et al, données non montrées). Les analyses en cours permettront de tester si DET1 est directement impliqué dans le contrôle de la poly-ubiquitination et de dégradation d'UBP22, de façon similaire à AtSGF11.

Pendant longtemps, le mécanisme par lequel DET1 influence de façon globale le niveau de H2Bub sur des centaines de gènes identifiés au laboratoire est resté très obscur. Il était difficile d'expliquer un effet de perte d'enrichissement dans la marque H2Bub aussi large sur les gènes dans les plantules mutantes *det1-1*, coïncidant par ailleurs avec un gain de H2Bub sur de nombreux TEs (Figure 21, données non publiées). La mise en évidence par l'équipe du Dr. Rubio de l'interaction entre DET1-DDB1 et DDA1 (Irigoyen et al., 2014) ainsi que le travail collaboratif auquel j'ai participé nous permet aujourd'hui de mieux aborder ces questions. Plus précisément, la protéine AtSGF11 interagit *in planta* et en double hybride de levure avec la protéine DDA1, établissant ainsi un lien physique entre le module UBP22 et le complexe C3D composé des protéines COP10-DDB1-DET1-DDA1. Par ailleurs, AtSGF11 exprimée sous le contrôle d'un promoteur 35S est également beaucoup plus abondante dans un fonds mutant *det1-1*. En absence de régulation transcriptionnelle du gène correspondant (données non montrées), la suraccumulation de AtSGF11 dans le mutant *det1-1* met en évidence sa dégradation protéasomale *via* le complexe C3D, en particulier dans les plantules skotomorphogéniques. Des expériences sont en cours pour déterminer si les autres éléments du DUBm, en particulier UBP22, sont aussi dégradés par le complexe C3D.

Ce nouveau lien entre DET1 et le module UBP22 permet d'expliquer d'une part comment DET1 agit sur H2Bub, et d'autre part la perte de H2Bub observée sur de nombreux gènes dans le mutant *det1-1* (Figure 74). Dans ce modèle, la stabilité du module UBP22-AtSGF11-AtSUS1 est contrôlée par DET1 *via* la protéine de liaison DDA1, de façon à réguler de façon globale la capacité de déubiquitination de l'histone H2Bub. Cette hypothèse est appuyée par la diminution du niveau global de H2Bub après surexpression d'UBP22-GFP. Le fait que le répresseur transcriptionnel DET1 participe, *via* la dégradation de AtSGF11 et possiblement aussi d'UBP22, à contrôler le niveau global d'une marque de la chromatine caractéristique des éléments activement transcrits peut a priori sembler

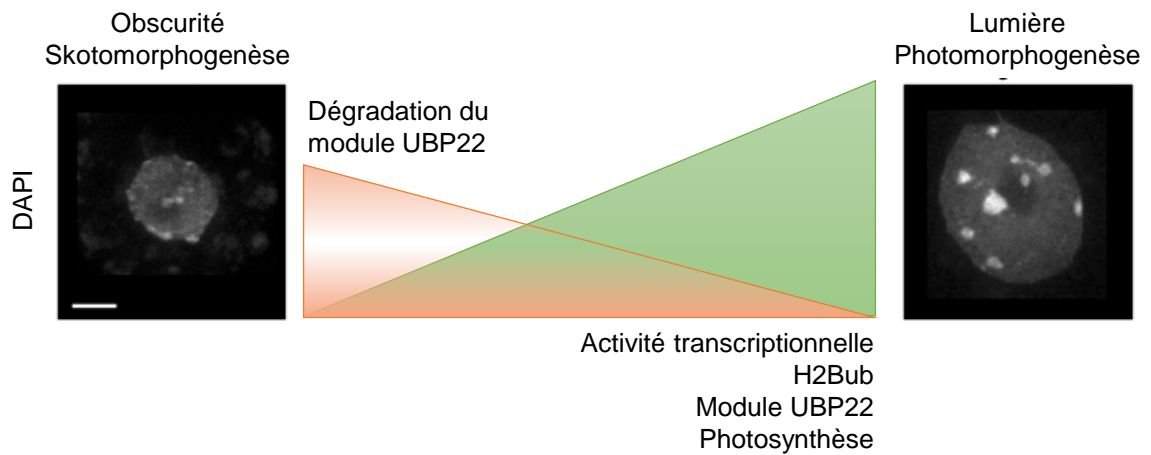


Figure 75. Schémas récapitulatif de plusieurs facteurs dont la quantité diffère entre les développements skotomorphogénique et photomorphogénique

A l'obscurité les noyaux skotomorphogéniques montrent un faible niveau d'H2Bub, une faible transcription et une forte dégradation du module UBP22. A l'inverse, les noyaux photomorphogéniques ont une forte activité transcriptionnelle, ont plus d'H2Bub, le module UBP22 est plus abondant et la photosynthèse est active.

contre-intuitif. Ce mécanisme met en avant le rôle positif de la déubiquitination de H2Bub et par extension du cycle d'ubiquitination/déubiquitination de l'histone H2B dans la facilitation de l'élongation de la transcription observé chez d'autres espèces (Weake et Workman 2008). En perturbant ce cycle co-transcriptionnel *via* la dégradation de sous-unités du module UBP22, l'accumulation de H2Bub aurait tendance à affecter le niveau de transcription de nombreux gènes. Cette corrélation a été mise en évidence par intégration des données de RNA-seq et de CHIP-seq qui montrent effectivement une baisse très significative du niveau des transcrits des gènes gagnant un domaine H2Bub dans les plantules *ubp22* par rapport au type sauvage.

L'ensemble de ces observations permet de proposer un modèle selon lequel la signalisation lumineuse, *via* DET1 et le complexe C3D, contrôle la production d'une machinerie intimement liée à l'activité de transcription lorsque les conditions d'obscurité ralentissent son développement (Figure 75). Dans le cadre de la photomorphogenèse, le contrôle de la dégradation du module UBP22 par le complexe C3D corrèle avec un faible niveau de transcription observé dans les noyaux skotomorphogéniques pour chaque niveau de ploïdie (Bourbousse et al., 2015). La signification fonctionnelle de ce type de contrôle global reste à appréhender plus en détail. Une possibilité serait que la plante fasse coïncider l'expression de la machinerie de modification de la chromatine associée à la transcription avec l'activité transcriptionnelle de la cellule, régulant ainsi le métabolisme des ARN messagers en fonction des besoins cellulaires. Afin de mieux comprendre la part de l'accumulation du module UBP22 dans les phénotypes affectant *det1-1*, il serait intéressant de mieux caractériser les lignées surexprimant UBP22-GFP dans lesquelles le niveau de H2Bub est globalement moins important que chez le type sauvage. Dans ces lignées, l'effet d'accumulation du module pourrait être découplé d'autres mécanismes impactés dans *det1-1*, permettant ainsi de rechercher si d'autres facteurs chromatinien liés à la transcription voire à l'ARN Pol 2 elle-même sont régulés par la signalisation lumière dans des conditions extrêmes comme l'obscurité totale.

Un deuxième aspect chromatinien intéressant de la photomorphogenèse abordé dans cette thèse porte sur l'augmentation progressive de la taille des noyaux et la formation rapide de chromocentres contenant l'essentiel de l'hétérochromatine (Bourbousse et al., 2015). Les protéines de la famille CRWN sont des protéines spécifiques des plantes servant à l'organisation de la lamina nucléaire en absence de lamines chez *Arabidopsis* (Meier et al., 2017). Elles sont impliquées dans la structure de la périphérie nucléaire et la condensation de l'hétérochromatine (Dittmer et al., 2007; Sakamoto and Takagi, 2013), et pourraient jouer un rôle dans le mécanisme de réorganisation de l'hétérochromatine durant la photomorphogenèse (données non publiées). Les résultats de l'expérience de TAP-tag obtenus sans détergent ouvrent donc la possibilité qu'UBP26 soit un facteur de modification et de maintien des états hétérochromatiniens lié à l'organisation de la périphérie

nucléaire. Ceci est en accord avec la présentation dans le chapitre 3 qu'UBP26 est requis pour la formation ou le maintien des chromocentres périphériques. L'association UBP26 et CRWN1 ne semble pas être directe d'après des tests en double-hybride de levure, mais ces protéines pourraient cependant s'associer au sein d'un complexe. En effet, il a été observé ici qu'UBP26 fait partie d'un complexe de très haut poids moléculaire. Considérant l'intérêt de cette association potentielle, des expériences de co-immunoprécipitation de protéines fusion UBP26-GFP suivies d'analyse des protéines associées par spectrométrie de masse sont actuellement en cours.

Il reste nécessaire d'entreprendre une analyse fonctionnelle des autres partenaires d'UBP26, en particulier les deux gènes *AT2G33000* et *AT2G2840* dont les protéines ont été purifiées avec UBP26 même en présence de digitonine. La fonction de ces protéines pourra être caractérisée par l'utilisation de lignées T-DNA potentiellement nulles (données non montrées), en se focalisant notamment sur leur phénotype en termes de développement, d'organisation nucléaire, d'expression des TEs et du niveau des marques chromatiniennes H2Bub et H3K27me3 afin de déterminer rapidement si ces gènes sont impliqués avec UBP26 dans ces différents mécanismes régulateurs. Une possibilité parmi d'autres serait que ces protéines influencent l'activité ubiquitine protéase d'UBP26, notamment *AT2G33000* par son domaine UBA. Enfin, la confirmation de l'association d'UBP26 avec CRWN1 et/ou d'autres protéines de la famille CRWN ouvrirait la voie à l'identification d'un nouveau lien direct entre mécanismes moléculaires de modification de l'épigénome et régulation de l'organisation spatiale de la chromatine dans le noyau.

4.3 La redondance fonctionnelle partielle entre UBP22 et UBP26

L'apparition d'un défaut de développement racinaire ainsi que l'aggravation des problèmes de croissance et de fertilité du mutant *ubp26* dans le double mutant *ubp22ubp26* ont été les premiers éléments montrant une redondance fonctionnelle partielle entre ces deux déubiquitinase de l'histone H2Bub. L'origine de ces défauts développementaux n'a pas été clairement identifiée. Des expériences portant sur la quantification de la taille moyenne des cellules épithéliales ainsi qu'une mesure de l'efficacité de la photosynthèse pourraient apporter des éléments de réponse à la petite taille des feuilles de la rosette du double mutant. De plus, une analyse du méristème racinaire, par coloration des cellules de la pointe racinaire et visualisation au microscope confocal, permettra de déterminer si le double mutant est affecté dans la division ou la différenciation de ces cellules.

Au niveau des marques chromatiniennes, la redondance fonctionnelle partielle entre *UBP26* et *UBP22* est visible au niveau de la forte diminution du niveau de H3K27me3 observé par immunoblot sur des extraits chromatiniens d'*ubp26*, qui est aggravée dans le double mutant *ubp22ubp26*. Cette

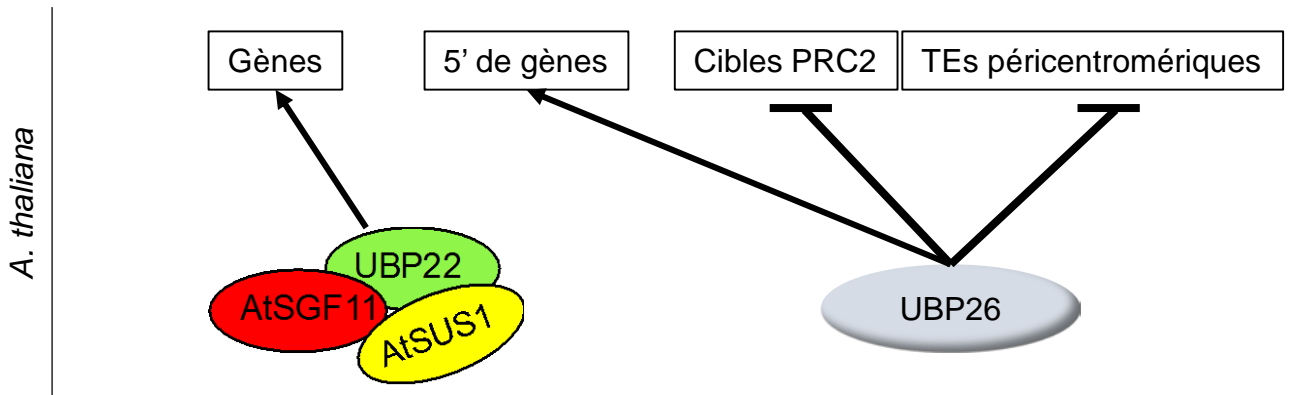
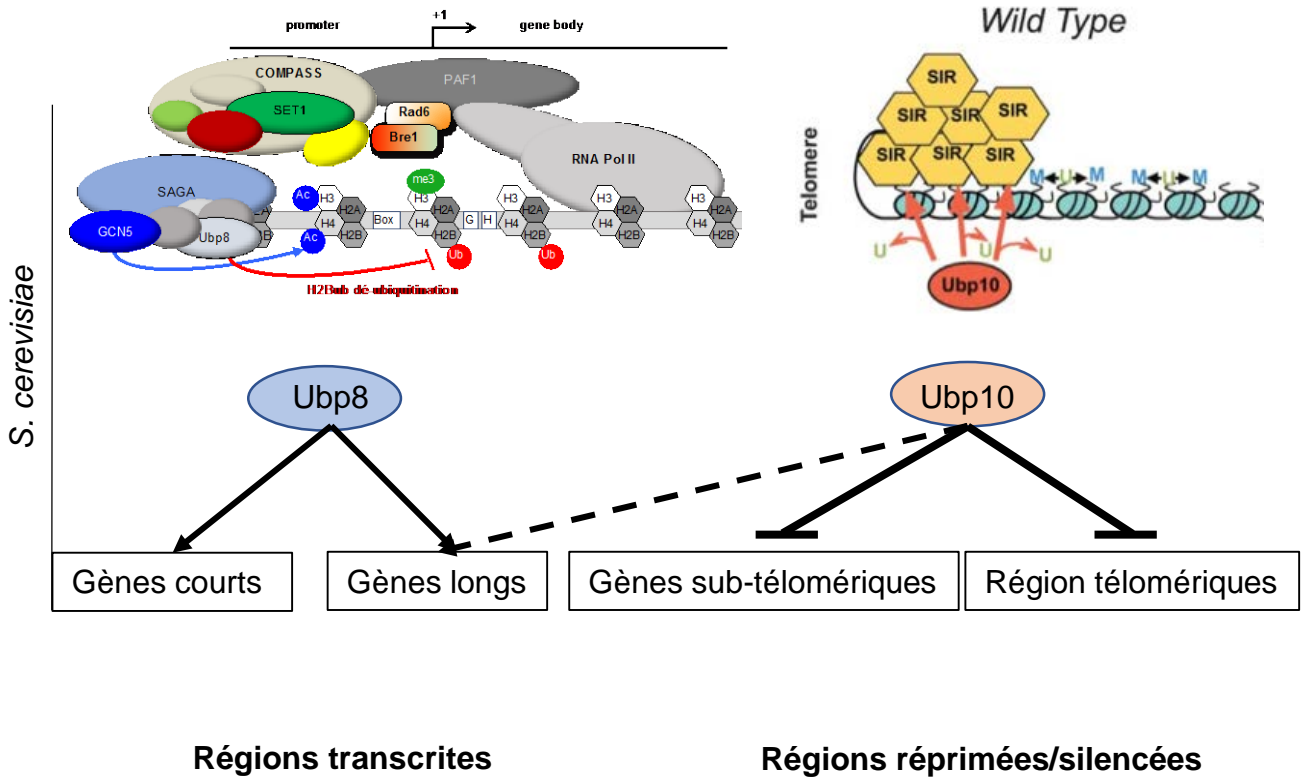


Figure 76. Schémas récapitulatif des loci dé-ubiquitinés par Ubp8, Ubp10, UBP22 et UBP26
 Résumé des loci dé-ubiquitinés chez *S. cerevisiae* par Ubp8 et Ubp10. (D'après Emre et al., (2005); Gardner et al., (2005); Schulze et al., (2011)) ainsi que des loci dé-ubiquitinés par UBP22 et UBP26 identifiés dans cette thèse.

observation a été confirmée de façon solide par une analyse à l'échelle du génome utilisant une normalisation par spike-in de chromatine exogène. Elle pourrait être à l'origine de plusieurs des phénotypes développementaux observés chez le double mutant, en particulier les défauts de fertilité et de longueur racinaire, comme le résultat d'une moindre répression dans le double mutant de gènes normalement régulés par PRC2. L'aggravation de la perte globale de H3K27me3 est donc potentiellement liée à la dérégulation de 391 gènes uniquement dans le double mutant *ubp22ubp26*. Ces gènes, leur lien potentiel avec la répression médiée par PRC2 ainsi que leur implication dans les différents phénotypes qui affectent le double mutant nécessitent des analyses plus détaillées.

Les analyses immunoblots et CHIP-seq de la marque H2Bub effectuées dans cette thèse montrent que UBP22 et UBP26 enlèvent H2Bub sur de très nombreux gènes, nombre d'entre eux étant communs. Cette observation est en accord avec le gain de H2Bub similaire observé par immunoblot entre les mutants *ubp22* et *ubp22ubp26* et contraste avec l'effet nettement moins visible par immunoblot de la perte de fonction d'*UBP26* sur le niveau de H2Bub. La combinaison des analyses immunoblot et CHIP-seq indique donc qu'UBP22 impacte la distribution de H2Bub sur davantage de gènes qu'UBP26. L'analyse des profils du marquage H2Bub par métagène a montré une activité d'UBP26 sur H2Bub plus importante en 5' sur de nombreux gènes. Ces gènes seront étudiés plus en détail dans de futures analyses, notamment leur taille, leur position dans le génome et leur fonction, afin de déterminer un potentiel critère de recrutement spécifique d'UBP26 par rapport à UBP22. Il est intéressant de noter que contrairement à *S. cerevisiae*, où Ubp8 et Ubp10 déubiquitinent des locus différents (Weake et Workman, 2008 ; Schulze et al., 2011 ; Gardner et al., 2005), cette séparation semble beaucoup moins nette pour les gènes d'*Arabidopsis*. De façon générale, la distinction de fonction évidente entre UBP22 et UBP26 est qu'UBP22 mais pas UBP26 s'associe à un module de type SAGA, alors qu'UBP26 impacte à la fois des gènes transcrits comme UBP22 mais influence aussi des mécanismes de répression de type PRC2 sur les gènes et de type hétérochromatiniens sur certains TEs péracentromériques (Figure 76). Pour étudier plus en détail la redondance fonctionnelle entre UBP22 et UBP26, une expérience de CHIP-seq de la distribution génomique de ces protéines étiquetées par la GFP permettrait de déterminer les cibles génomiques directes de ces protéines et mettre en évidence des potentielles différences d'adressage entre ces deux protéines dans des conditions dynamiques telles que le dé-étiolement.

4.4 UBP22, UBP26 et la régulation de l'expression des gènes

L'analyse transcriptomique effectuée sur des plantules de 6 jours cultivées dans des conditions optimales a mis en évidence un nombre de gènes dérégulés relativement faible dans le mutant *ubp22*

(44 gènes surexprimés contre 163 gènes sous-exprimés). Ce résultat est en accord avec des observations similaires faites dans des lignées perte de fonction de *Ubp8* chez *S. cerevisiae* ou de *ATXN7* chez l'humain (Gardner et al., 2005 ; Atanassov et al., 2016). Comme dans ces espèces, malgré la perte importante de l'activité de déubiquitination induisant un gain important de marque H2Bub, les plantules présentent de faibles phénotypes moléculaires et physiologiques. Dans une condition stable et un stade de développement durant lesquels de nombreux organes ne font plus de divisions cellulaires, les plantes semblent capables de compenser une potentielle perte d'efficacité de la transcription. Afin de mettre en évidence un potentiel défaut d'activation des gènes affectant *ubp22*, j'ai tenté de soumettre des plantules à un stress chaud et un stress lumineux appelé photo-blanchiment induit après une longue période d'obscurité. En effet, les plantes *ubp22* ne présentent pas de phénotype visible mais leur transcriptome montre que plusieurs gènes de réponse à la chaleur sont dérégulés (données non montrées). Malgré plusieurs essais, des problèmes d'homogénéité du stress chaud ainsi que des problèmes de reproductibilité des expériences de photo-blanchiment m'ont empêché d'apporter une réponse claire quant à la capacité de réponse du mutant *ubp22* dans ces conditions. D'autre part, j'ai effectué plusieurs expériences de dé-étiolement pour étudier si l'induction des gènes était affectée dans le mutant *ubp22*, comme le laboratoire l'a démontré pour le mutant *hub1-3* dans lequel la marque H2Bub est indétectable (Bourbousse et al., 2012). Néanmoins, la faible reproductibilité des résultats sur les gènes candidats étudiés, dans ces expériences très sensibles, ne me permet pas de conclure à ce jour. Cet aspect de la régulation des gènes par UBP22 lors de transitions développementales ou dans des environnements stressant sera repris dans les analyses futures.

Enfin, plusieurs gènes codant des éléments centraux de l'horloge circadienne sont dérégulés dans les trois mutants *ubp22*, *ubp26* et *ubp22ubp26*. Ce résultat prometteur suggère l'implication d'UBP22 et UBP26 dans ce mécanisme de dynamique d'oscillation très précise et quotidienne de leur expression et des marques chromatinienne associées à un état permissif à la transcription. En effet, le laboratoire a montré que la marque H2Bub varie rythmiquement au cours de la journée de façon concomitante sur l'ensemble des gènes des boucles principales du cœur de l'horloge. Par conséquent il est possible d'imaginer que le cycle d'ubiquitination/déubiquitination de H2Bub impliquant ces ubiquitine protéases est probablement actif lors de la phase de transcription, mais que lors de la phase de répression un mécanisme de déubiquitination actif impliquant principalement UBP26 enlève le domaine H2Bub. J'ai récemment initié l'analyse de l'oscillation de la marque H2Bub sur des plantules d'une lignée sauvage et des trois mutants après entrainement de l'horloge pendant 10 jours. Ceci devrait permettre de déterminer si l'oscillation et le niveau global de H2Bub de certains des gènes de l'horloge circadienne sont affectés dans ces mutants. Les résultats préliminaires sont prometteurs, la

plupart des gènes étudiés présentant une oscillation de H2Bub perturbée mais un réplica biologique est nécessaire avant de conclure sur ces résultats. En complément de ces expériences de CHIP-qPCR, une analyse de l'expression des gènes correspondants par RT-qPCR sera effectuée pour étudier l'effet de la perte de l'oscillation de H2Bub sur l'oscillation du niveau de leurs transcrits.

4.5 UBP26 et la répression des gènes *via* une activité *Polycomb*

A l'inverse d'UBP22, UBP26 affecte l'expression de nombreux gènes. De façon a priori non anticipée UBP26 semble impliquée dans la régulation de gènes ciblés par une activité PRC2. Cette observation étend largement l'effet décrit d'UBP26 sur le niveau de la marque H3K27me3 sur le gène *PHERES1* et sa régulation par empreinte parentale (Liu et al., 2008). De plus il a été observé un recouvrement enrichi des gènes normalement marqués par H3K27me3 chez des plantules sauvages parmi les gènes dérégulés dans les plantules *ubp26* (44%). L'analyse globale des gènes pour lesquels un domaine H3K27me3 apparaît dans *ubp26* montre en effet une baisse du niveau de transcrits. Par opposition, la perte massive d'un domaine H3K27me3 sur plusieurs milliers de gènes induit globalement un gain d'expression, probablement *via* la forte surexpression d'une sous-population de gènes. La régulation spatio-temporelle au cours de la formation de la graine et du développement de la plantule reste à décrypter pour spécifier ce lien causal entre perte de répression PRC2 et surexpression.

Par opposition à UBP22, on peut supposer que c'est l'influence d'UBP26 dans un mécanisme de répression des gènes de type *Polycomb* qui mène à la fois à une plus forte perturbation du transcriptome et à des phénotypes plus marqués dans le mutant *ubp26* que chez *ubp22*. En particulier, les phénotypes de faible fertilité, de formation de graines fripées ou le léger phénotype de type *fis* (Liu et al., 2008) ainsi que l'accumulation de transcrits de gènes de réserve lipidique (nos analyses RNA-seq) peuvent résulter de ce type de défaut chromatinien. Autrement dit, la baisse du niveau de H3K27me3 observée sur des centaines de gènes dans le mutant *ubp26* et son aggravation dans *ubp22ubp26* corréle avec une dérégulation des gènes et les phénotypes affectant *ubp26* et *ubp22ubp26*. Ainsi, la recherche d'un lien plus spécifique entre UBP26 et la répression de type *Polycomb* est prometteuse.

Un mécanisme par lequel UBP26 permet l'établissement ou le maintien de domaines enrichis en H3K27me3 est inconnu. La redondance fonctionnelle partielle avec UBP22 et la récupération d'un niveau de H3K27me3 global similaire à celui du Col-0 dans des feuilles de rosette double mutant *hub1-3ubp26-2* appuient un modèle selon lequel l'activité d'UBP26 est requise pour celle de PRC2 à un certain stade de développement. Ces observations nous ont permis d'élaborer un modèle théorique

selon lequel l'enlèvement de domaines H2Bub favorables à la transcription favorise l'établissement d'un état répressif par PRC2. Ceci expliquerait en partie l'expression dans les plantules *ubp26* de gènes normalement réprimés lors du développement de la graine ou au cours de la germination. Cependant, ce modèle reste théorique à ce stade. En effet, l'observation que l'enrichissement en H2Bub et la baisse en H3K27me3 sont visiblement opérés sur des sets de gènes distincts au stade plantule met un doute sur l'étendue possible d'un lien fonctionnel entre déubiquitination H2Bub et triméthylation de H3K27. Ces expériences de profilage par ChIP-seq ont tout de même permis de mettre en évidence un set de 40 gènes se comportant selon le modèle proposé. Ce nombre est extrêmement faible considérant le nombre de gènes hyper-marqués par H2Bub et hypo-marqués par H3K27me3 dans les plantules *ubp26*, suggérant une anti-corrélation. Le double mutant *hub1-3ubp26-2* a récemment été amplifié et sera utilisé pour des analyses plus précises du niveau de H3K27me3 lorsque H2Bub ne représente aucun frein au dépôt de H3K27me3. Un phénotypage de ce nouveau double mutant sera aussi utile pour étudier d'éventuelles aggravations/améliorations de certains phénotypes affectant *ubp26* en absence de ce potentiel frein à des transitions de gènes actifs vers la leur répression. Par ailleurs, l'analyse du phénotype de plantes issues du croisement récemment effectué entre *ubp26* et le mutant PRC2 *clf-29* sera également utile pour tester les relations génétiques entre perte de fonction de déubiquitination de H2Bub par UBP26 avec une baisse de fonction de triméthylation de H3K27 par CLF.

Par ailleurs, il n'est pas exclu que UBP26 puisse réguler l'abondance de certaines protéines non-histones telles que, des composants de complexes PRC2 stabilisés par déubiquitination. Ce mécanisme hypothétique alternatif permettrait d'expliquer la baisse de H3K27me3 par manque de complexe PRC2 dans un mutant *ubp26*. Enfin, même si le modèle proposé ne semble pas être pertinent à ce stade de développement, il est possible qu'il le soit à d'autres étapes de la vie de la plante, les complexes PRC2 impactant de nombreuses étapes de développement. Ce concept est assez attractif dans ce cas, au vu de l'impact clair d'UBP26 au cours de l'embryogénèse observé par des études préalables (Liu et al., 2008) et nos analyses transcriptomiques.

Le profil de H3K27me3 observé sur l'univers des gènes marqués dans au moins un génotype ne permet pas de distinguer une différence du profil en métagène. Une étude plus approfondie des différents clusters d'intérêt pourra potentiellement permettre d'isoler des sous-ensembles de gènes montrant des profils de H3K27me3 atypiques. A ce stade, il semble que l'effet d'UBP26 sur la distribution génique de H3K27me3 soit homogène le long de la région transcrite. De façon générale, la recherche de lien entre la perte d'enrichissement H3K27me3 et la dérégulation des gènes après perte de fonction *UBP26* doit être approfondie. Il sera notamment possible d'isoler des listes des gènes pour lesquels la perte de cette marque est liée avec une surexpression. L'étude de ces gènes dont la

répression est très sensible au niveau de H3K27me3 et de leurs caractéristiques pourrait permettre de mieux comprendre la répression *Polycomb* en lien avec UBP26.

4.6 UBP26 et l'hétérochromatine

Une analyse RNA-seq très restrictive sur les lectures répétées a permis d'identifier qu'environ 77 TEs sont dé-réprimés dans le mutant *ubp26*, représentant essentiellement des éléments hétérochromatiniens localisés dans les régions péri-centromériques. Ces résultats sont en accord avec des données publiées montrant un rôle d'UBP26 dans le silencing de quelques éléments candidats (Sridhar et al., 2007). L'intégration des données de ChIP-seq H2Bub et H3K27me3 dans ces analyses m'a permis d'observer que les TEs sur-exprimés ne présentent pas de changement détectable du marquage en H2Bub ou H3K27me3. A ce stade, il est difficile de conclure de façon absolue sur un lien de cause à effet entre un défaut de débubiquitination de l'histone H2B sur ces TEs et leur expression, notamment du fait de leur nature répétée pouvant aboutir à la perte de signal en ChIP-seq si seulement quelques-uns des éléments répétés du génome sont à l'origine des transcrits. Des analyses plus spécifiques restent donc nécessaires pour s'affranchir de la perte d'information potentielle due au placement aléatoire de chaque lecture correspondant à plusieurs régions du génome. Enfin les TEs dérégulés dans un fonds *ubp26* et ceux dont le marquage par H2Bub augmente seront comparés aux TEs dé-réprimés et marqués par H2Bub dans le mutant *det1-1* afin de déterminer si DET1 influence la répression de certains TEs de façon indirecte *via* la stabilisation d'UBP26.

D'autres part, la distribution des profils H2Bub et H3K27me3 dans chacune des trois lignées *ubp22*, *ubp26* et *ubp22ubp26* mutantes sera étudiée de façon similaire à l'analyse effectuée sur les gènes. Des perturbation de l'enrichissement H3K27me3 et/ou de H2Bub pourraient amorcer la levée d'un premier "verrou" de répression de certains éléments transposables péri-centromériques. Ainsi, le modèle proposé pour des gènes pour lequel l'enlèvement de H2Bub par UBP26 est nécessaire pour le dépôt de H3K27me3 pourrait également être adapté à certains TEs.

4.7 Conclusions

L'ubiquitine protéase UBP22, homologue de ScUbp8, déubiquitine H2Bub au sein d'un module atypique composé par UBP22-AtSUS1-AtSGF11 agissant probablement de façon indépendante du complexe SAGA. Ce module agit à très large échelle sur des milliers de gènes transcrits, probablement dans les mécanismes basaux de la transcription. La protéine UBP26 déubiquitine H2Bub de façon partiellement redondante au module UBP22 sur de nombreux gènes mais est aussi plus spécifiquement impliquée dans des mécanismes de répression transcriptionnelle impliquant un mécanisme de type Polycomb sur des gènes qui reste à déterminer. UBP26 joue également un rôle dans la répression de certains éléments transposables péracentromériques ainsi que dans l'organisation nucléaire de ces régions hétérochromatiniennes.

MATERIEL ET METHODES

- **Matériel végétal**

L'ensemble des lignées utilisées dans cette thèse sont dans le fond génétique Columbia (Col-0). Les lignées mutantes *ubp22-1* et *ubp26-2* sont annotées respectivement *ubp22* et *ubp26* dans le texte.

Mutant	Identifiant	type	Origine	Référence
<i>ubp22-1</i>	GABI_263H06-1394	Mutant d'insertion	Gabi-kat	
<i>sgf11-1</i>	SAIL_856_F11	Mutant d'insertion	NASC	
<i>ubp26-2</i>	SALK_024392.40.25.X	Mutant d'insertion	ABRC stock	Sridhar et al., (2007)
<i>det1-1</i>	CS6158	Mutant EMS	ABRC stock	Chory et al., (1989)
<i>hub1-3</i>	GABI_276D08	Mutant d'insertion	Gabi-kat	
<i>clf-29</i>	SALK_021003.55.50.x	Mutant d'insertion	ABRC stock	Bouveret et al., (2006)
<i>swn-7</i>	SALK_109121	Mutant d'insertion	ABRC stock	Farrona et al., (2011)

Lignée transgénique	Vecteur utilisé	Origine
35S::GFP-UBP22	pB7GWF2	Laboratoire
35S::35S-UBP26	pB7GWF2	Laboratoire
Col-0/pUBP22::UBP22-GFP	pB7WG,0	Laboratoire
Col-0/pUBP26::UBP26-GFP	pB7WG,0	Laboratoire
<i>ubp22</i>/pUBP22::UBP22-GFP	pB7WG,0	Laboratoire
<i>ubp26</i>/pUBP26::UBP26-GFP	pB7WG,0	Laboratoire
35S::GFP-SGF11	pGWB6	V. Rubio
35S::GFP-SUS1	pGWB6	V. Rubio

- **Conditions de culture**

La culture en terre s'effectue après traitement du terreau avec un larvicide (Trigard 0,49 g.L⁻¹) et passage des graines à -20°C pendant 24-48h. Les plantes sont cultivées en chambre de culture en conditions de jour long : 16h de lumière à 23°C (100 µmol.m².s⁻¹)/8h d'obscurité à 19°C. Le phénotypage en jours courts est effectué en incubateur de culture (Percival) avec une photopériode 8h de lumière à 23°C (100 µmol.m².s⁻¹)/16h d'obscurité à 19°C. La culture *in vitro* à partir de graines stérilisées s'effectue dans un incubateur de culture (Percival) en conditions de jour long. Les graines sont stérilisées en surface dans une solution d'éthanol à 70% et de triton à 0,05% pendant 3 min, puis lavées dans de l'éthanol à 90%, avant d'être déposées, une fois sèches, sur un milieu MS solide (avec 0,9% d'agar). Les boîtes sont transférées en incubateur après une stratification de 3 jours à 4°C.

5.2 Méthodes

Phénotypage

- **Mesure du diamètre des plantes et dissection**

Après deux jours à -20°C, les graines sont semées en terre, les pots sont randomisés puis mis à pousser, en conditions de jour long dans la chambre de culture ou jour court en incubateur de culture. Après quatre semaines, le diamètre de 20 plantes de chaque génotype est mesuré. Les feuilles d'une plante représentative de chaque génotype ayant poussé en jour long est ensuite sélectionnée, disséquée, alignée avec les autres sur une feuille noire et pris en photo.

- **Mesure de l'évolution du nombre de feuilles**

Après deux jours à -20°C, les graines sont semées en terre, les pots sont randomisés puis mis à pousser, en conditions de jour long. Le nombre de feuilles de 20 plantes de chaque génotype est compté après 10, 14, 18 et 22 jours.

- **Mesure du temps de floraison**

Après deux jours à -20°C, les graines sont stratifiées en tubes à -4°C puis semées en terre, les pots sont randomisés puis mis à pousser en conditions de jour court en incubateur de culture. Le temps de floraison est évalué en comptant le nombre de feuilles de rosette au moment de la sortie du bouton floral, sur 12 à 16 plantes par génotype.

- **Mesure de la longueur de la racine et de la ploïdie**

Après stérilisation à l'éthanol, les graines sont stratifiées dans l'eau à -4°C pendant trois jours. Elles sont ensuite semées une par une sur deux niveaux dans des boîtes de pétri carrées contenant du milieu MS solide avec 1% de sucrose et mises à pousser verticalement. Après 5 jours et 7 jours, les boîtes sont scannées et la taille de la racine est mesurée grâce au logiciel ImageJ. Les racines sont ensuite découpées finement avec une lame de rasoir dans une boîte de pétri sur la glace afin d'extraire les noyaux qui sont ensuite coloré au DAPI et analysés par cytométrie de flux.

- **Phénotypage des siliques et de la germination.**

5 siliques au même niveau de développement sont prélevées sur 4 plantes pour chaque génotype. Les 20 siliques par génotypes sont scannées et mesurées grâce au logiciel ImageJ. Des siliques surnuméraires représentatives de chaque mutant sont ouvertes et prises en photo. Après plusieurs jours de séchage dans un tube Eppendorf contenant une silique, les graines de chaque silique

sont placées à -20°C deux jours et semées sans stérilisation *in vitro*. Après 7 jours, le nombre de plantules par boîte est décompté pour chaque silique de chaque génotype.

Analyses d'expression

- Extraction d'ARN

Les ARN totaux sont extraits de plantules entières à l'aide du kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel), qui comprend un traitement à la DNase sur colonne, selon les indications du constructeur. Après dosage au spectrophotomètre Nanodrop, les ARN sont analysés sur gel d'agarose 2% pour vérifier leur pureté.

- RT-PCR quantitative

1µg d'ARN purifiés sont utilisés par réaction de rétrotranscription. Pour éviter toute contamination d'ADN génomique, ils sont préalablement traités avec 1U de DNase I (Invitrogen) à température ambiante pendant 15 minutes. Puis la réaction est arrêtée par ajout d'EDTA (concentration finale 2,5 mmol.L-1) et incubation à 65°C pendant 10 min. La réaction de RT est alors réalisée avec le kit High Capacity cDNA RT (Applied Biosystems) en association avec des oligonucléotides « aléatoires ». Pour exclure une éventuelle contamination des échantillons par de l'ADN génomique, une PCR est réalisée avec des amorces situées de part et d'autre d'un intron du gène ACT2 (Fermentas) et la taille des amplicons obtenus est analysée sur gel d'agarose 2%. La PCR quantitative est réalisée en utilisant 1 µL d'ADNc avec le mélange de réactifs SYBR Green Master Mix, selon les indications du fournisseur, sur un appareil LightCycler 480 (Roche).

Analyse des modifications d'histones

- Fixation des plantules

Pour les expériences de ChIP, les plantules de 7 jours subissent une étape de crosslink par une infiltration de 15min dans une solution de formaldéhyde à 1%. La fixation est stoppée par ajout de glycine à une concentration finale de 125mM. Les plantules sont alors rincées, séchées et congelées.

- Extraction de la chromatine

Les tissus sont broyés et la poudre obtenue est homogénéisée dans le tampon EB1 (30 mL pour 1 g de poudre). L'ensemble est filtré deux fois sur un tissu de polyester (Miracloth, Calbiochem) (pores

de 25 µm). Après centrifugation à 4000 rpm pendant 20 min, le culot est lavé dans un tampon EB2, puis repris dans un tampon EB3 à 1,7 mol.L-1 de saccharose. Le culot repris est déposé en coussin sur un volume équivalent de tampon EB3, puis l'ensemble est centrifugé 1h à 13200 rpm. Ce dernier culot est finalement repris dans le tampon NLB, donnant ainsi l'extrait de chromatine.

- **Immuno-précipitation de la chromatine (ChIP)**

L'échantillon de chromatine est soniqué grâce à un sonicateur (Bioruptor, Diagenode) pendant 12 min et l'efficacité de la sonication est vérifiée sur gel d'agarose sur une fraction de la chromatine. Après élimination des débris par centrifugation, la concentration en protéines est déterminée par la méthode BCA (BCA Protein Assay, Thermo Scientific). 50ug de chromatine mélangée à 5ug (10%) de chromatine soniquée de drosophile en cas de spike-in, sont utilisés pour l'immunoprécipitation et une partie est conservée pour constituer l'input. L'immuno-précipitation est réalisée en présence de billes magnétiques couplées à des protéines A ou G (ChIP Adembeads, Ademtech). Avant immunoprécipitation, 5 µg d'anticorps sont incubés avec 50 µL de billes (couplage) et la chromatine est incubée avec 20µL de billes magnétiques (pré-clearing) pendant 3h à 4°C. La chromatine pré-clearée est alors incubée une nuit à 4°C avec les billes couplées aux anticorps. Les billes sont ensuite lavées dans des solutions de salinité croissante (tampons LSW, HSW, LiClW) puis dans du TE. Les billes ainsi que les inputs sont repris dans 500 µL de tampon d'élution, puis sont ajoutés 10 µL d'EDTA à 0,5 mol.L-1, 20 µL de Tris-HCl à 1 mol.L-1 (pH 6,5) et 10 µL de protéinase K à 10mg.mL-1. Après une incubation de 2 heures à 37°C, le surnageant des billes (IP) est récupéré. Tous les tubes (inputs et IP) sont incubés sur la nuit à 65°C dans du NaCl 100 mmol.L-1 final afin d'annuler le crosslink. L'ADN des inputs et des échantillons après immuno-précipitation est finalement extrait par traitement au phénol/chloroforme puis précipitation à l'éthanol et est resuspendu dans 100 µL d'eau. Les anticorps utilisés pour ces expériences sont : anti H2Bub (Millipore 05-1312) et anti H3K27me3 (Millipore 07-449).

- **Test de complémentation de levure *ΔUbp8***

La lignée *ΔUbp8* (UCC6992) nous a été généreusement fournie par l'équipe de Richard Gardner. La partie codante d'UBP22, a été amplifiée par PCR avec l'enzyme AccuPrime (Thermo Scientific) puis a été insérée dans un plasmide pCM185. Les lignées de levures ont ensuite été transformées en suivant les instructions du manuel Clontech pour les protocoles de levure (www.clontech.com). Les protéines totales sont ensuite extraites grâce au mélange d'un tampon urée/SDS avec des billes, suivit par des étapes de chauffage et de vortex. Après une centrifugation, le surnageant est récupéré et utilisé pour l'immuno-détection de H2Bub.

Cytologie

- **Extraction de noyaux et coloration DAPI ou immuno-détection**

Des plantules de 7 jours ayant poussé *in vitro* sont fixées dans un tampon PEM avec 4% de formaldéhyde sous cloche à vide. Après plusieurs lavages, les cotylédons sont finement hachés avec une lame de rasoir et conservés dans un tampon Galbraith avant d'être filtrés à travers un maillage de 45µm. Les noyaux sont ensuite déposés sur une lame APTES/glutaraldéhyde et après séchage, une goutte de vectashield contenant 2µg/µL de DAPI est déposée sur la lame puis une lamelle est ajoutée et scellée avec du vernis. Dans le cas d'une immuno-fluorescence, la lame est bloquée avec une solution de PEMSB pendant 2h puis incubés tout la nuit avec l'anticorps primaire. Le lendemain, après plusieurs lavages, l'anticorps secondaire ALEXA488 est incubé sur la lame pendant 2h, et le vectashield avec DAPI est ajouté avant de sceller la lame avec une lamelle.

- **Immuno-détection de la méthylation de l'ADN**

Pour cette immuno-détection, les plantules sont fixées dans un buffer Carnoy puis lavées dans un citrate buffer et digérées avec une solution de digestion combinant cellulase, cytohelicase, pectolyase à 0,5%. Les plantules sont ensuite rincées et squashées entre lame et lamelle avant d'être plongées dans l'azote puis la lamelle est retirée et la lame est mise à sécher. La lame est incubée d'abord avec une solution de RNase A à 100µg/mL pendant 1h à 37°C puis rincée dans un tampon SSC et post-fixée avec une solution de PBS contenant 1% de formaldéhyde. Après plusieurs rinçages, les lames sont placées trois minutes à 80°C avec 20uL de HB50, lavées à l'éthanol, bloquées avec une solution de PBS 1% BSA, rincées, puis incubées avec l'anticorps anti 5-meC pendant deux heures et l'anticorps secondaire ALEXA488 30min.

5.2.5 Tandem affinity purification (TAP) d'après Van Leene et al., (2015)

Cette expérience de TAP a été faite à partir de deux litres de cultures de cellules surexprimant les protéines UBP22 ou UBP26 fusionnées à la double étiquette en C terminal. Les protéines sont extraites par broyage dans l'azote liquide avec le tampon d'extraction puis centrifugées deux fois à 16000g pendant 10min à 4°C et un dosage bradford des protéines (BioRad Protein Assay Kit) permet de déterminer leur concentration. La première étape de purification est effectuée grâce à une résine « IgG Sepharose FF » (GE healthcare) puis la résine est incubée avec la protéase « Rhinovirus 3C protéase » (GE healthcare) à 4°C et la deuxième étape de purification sur une résine « Streptavidine Sepharose » (GE healthcare) qui nécessite la desthiobiotin pour l'élution.

Les protéines présentes dans l'éluât final sont séparées sur un gradient NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen), suivit par une digestion à la trypsine et les peptides sont analysés grâce au système nano-

LC, connecté à un spectromètre de masse LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fischer) et identifiés grâce à la base de données TAIRplus et le software MASCOT (matrix science). Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec l'équipe du Dr. Geert de Jaeger (VIB Ghent Belgique).

Analyses bio-informatiques

Les expériences de RNA-seq ont été effectuées par la plateforme de génomique de l'IBENS (Paris). Les ARN messagers (polyA+) ont été purifiés à partir d'1µg d'ARN totaux par oligo(dT) et les banques préparées en utilisant le kit brin spécifique TruSeq stranded mRNA (Illumina). Le séquençage single end read end de 50 pb a été effectué sur le Hiseq 1500 (Illumina).

Les résultats de séquençage ont été analysés par Sophie Lemoine en utilisant le pipeline Eoulsan, la quantification des lectures a été réalisée par FeatureCounts, les lectures plus courtes que 40 bases, les queues poly-N ainsi que les lectures dont la qualité est inférieure à 30 (Illumina quality filter reads) ont été retirées avant l'alignement. Les lectures restantes ont été alignées sur le génome d'*Arabidopsis thaliana* par le programme STAR (version 2.5.2b), et les lectures alignées sur plusieurs endroits du génome ont été placées aléatoirement à un seul de ces endroits. L'annotation du génome GFF3 de la base de données ARAPORT11 a été utilisée pour annoter les gènes et les régions se recouvrant ont été analysées par featureCounts. L'analyse différentielle a été réalisée en utilisant DESeq2 1.8.1.

Les données de CHIP-seq ont été générées à la plateforme IGBMC (Strasbourg). Les banques ont été générées grâce au kit MicroPlex (Diagenode) (12 cycles d'amplification) et séquencées en single end 1x50 bases par Illumina Hiseq 2500. Les données ont ensuite été analysées par Tao Ye (IGBMC Strasbourg). L'alignement des lectures a été effectué par Bowtie avec les paramètres -k 1 --best -y -S -l 40 -p 8. La détection des différents pics a été effectuée par Macs2 avec l'option narrow peak et seuls les pics présents dans les deux répliques ont été gardés. L'annotation des pics à des gènes et des éléments transposables a été effectuée séparément (-250pb TSS => TTS), un pic peut être associé à plusieurs gènes et un gène peut contenir plusieurs pics.

Pour le projet H3K27me3, la normalisation est basée sur le « spike in » de chromatine de drosophile menant à nombre de lectures alignées sur le génome de drosophile obtenues après séquençage et le facteur de normalisation est calculé selon la méthode utilisée dans Orlando et al. (2014). DESeq2 a été utilisé pour l'analyse statistique des deux projets après application des différents facteurs de normalisation. Pour la normalisation du projet H2Bub, l'approche avec spike in de chromatine de levure n'ayant pas marché, un set de pics présent dans tous les inputs a tout d'abord été déterminé. La couverture moyenne sur ces pics aspécifiques a été calculée pour chaque IP et a servi de facteur de normalisation. L'ensemble des boxplots, scatterplots, heatmaps et MA plots ont été effectués grâce au logiciel R (www.r-project.org)

5.3 Buffers

-CHIP

Extraction Buffer 1 (EB1)

sucrose	0,4 mol/L	
Tris-HCl pH 8	10 mmol/L	
MgCl ₂	10 mmol/L	
BME	5 mmol/L	
PMSF	0,1 mmol/L	
Inhibiteurs de protéases (Complete, Roche)		1 tablette/50 mL

Extraction Buffer 2 (EB2)

Sucrose	0,25 mol/L	
Tris-HCl pH 8	10 mmol/L	
MgCl ₂	10 mmol/L	
Triton X-100	1%	
BME	5mmol/L	
PMSF	0,1mmol/L	
Inhibiteurs de protéases (Complete mini, Roche)		1 tablette/10 mL

Extraction Buffer 3 (EB3)

sucrose	1,7 mol/L	
Tris-HCl pH 8	10 mmol/L	
Triton X-100	0,15%	
MgCl ₂	2 mmol/L	
BME	5 mmol/L	
PMSF	0,1 mmol/L	
Inhibiteurs de protéases (Complete mini, Roche)		1 tablette/10 mL

Nuclei lysis buffer (NLB)

Tris-HCl pH 8	50 mmol/L	
EDTA	10 mmol/L	
SDS	1%	
Inhibiteurs de protéases (Complete mini, Roche)		1 tablette/10 mL

ChIP Dilution Buffer (CDB)

Triton X-100	1,1%	
EDTA	1,2 mmol/L	
Tris-HCl pH 8	16,7 mmol/L	
NaCl	167 mmol/L	

Elution Buffer

SDS	1%	
NaHCO ₃	0,1 mol/L	

Low Salt Wash Buffer (LSW)

NaCl	150 mmol/L	
SDS	0,10%	
Triton X-100	1%	
EDTA	2 mmol/L	
Tris-HCl pH 8	20 mmol/L	

Matériel et Méthodes

High Salt Wash Buffer (HSW)

NaCl	0,5 mol/L
SDS	0,10%
Triton X-100	1%
EDTA	2 mmol/L
Tris-HCl pH 8	20 mmol/L

LiCl Wash Buffer (LiClW)

LiCl	0,25 mol/L
NP-40	1%
sodium deoxycholate	1%
EDTA	1 mmol/L
Tris-HCl pH 8	10 mmol/L

TE Buffer

Tris-HCl pH 8	10 mmol/L
EDTA	1 mmol/L

-Cytologie

2X PEM

- PIPES pH7.3 (KOH) 100 mM	5 ml at 1M
- MgSO4 10 mM	0.5 ml at 1M
- EGTA pH 7.1 (KOH) 10 mM	1 ml at 0.5M
- H2O	<u>to 50 ml</u>

PEMSB

- PEM 1X	25 ml at 2X
- Saponin 0.05%	5 ml at 0.5% (10X Stock = 0.05g in 10 ml H2O)
- BSA 2%	1 g
- H2O	<u>to 50 ml</u>

Galbraith buffer (50ml)

45mM MgCl ₂	2,25 mL of 1M stock
20mM MOPS	2mL of 0,5M stock
30mM Sodium Citrate	3ml of 0,5M stock
0,3% triton X-100	0,75ml of 20% stock
pH 7 with NaOH,	

-TAP

Tampon d'extraction

Tris-HCl pH 7.6,	25 mM
MgCl ₂ ,	15 mM
NaCl,	150 mM
p-nitrophenyl phosphate,	15 mM
β-glycerophosphate,	60 mM
NP-40,	0.1%
Na ₃ VO ₄ ,	0.1 mM
NaF,	1 mM
PMSF,	1 mM
E64,	1 μM

Complete EDTA-free Ultra Tablet, 1/10 mL
ethylene glycol 5%
benzonase 2500 units
Pour UBP22 : digitonine 1%

5.4 Primers

UBP22_RT2_Fwd	TTCCGCCTAAACATGTCTCC	RT-PCR
UBP22_RT2_Rev	CCACAACCCTTTAAGCCTCA	RT-PCR
UBP22_RT1_Fwd	GTCCGCGAGGATTTTCATTT	RT-PCR
UBP22_RT1_Rev	TTGCATCGTTGAAGCATCTG	RT-PCR
ubp26-2 F	CCACAGATTGGCTTCGTCTATGG	génotypage
ubp26-2 R	GACACAACCATGCGAGCACC	génotypage
hub1-3 F	TCCAAGCATCTTTGTCTCTC	génotypage
hub1-3 R	ATTCGAAGGGGAGCTAGAGG	génotypage
UBP22-1 F	GCAGCTTTTTGGTTTGGGTA	génotypage
UBP22-1 R	TGTTGACCACTCAACCAAAG	génotypage
GABI 8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	génotypage
LB3	TAGCATCTGAATTTAATAACCAATCTCGATACAC	génotypage
Lbb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	génotypage

REFERENCES

- Ahmad, M., and Cashmore, A.R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366, 162–166.
- Atanassov, B.S., Mohan, R.D., Lan, X., Kuang, X., Lu, Y., Lin, K., Mclvor, E., Li, W., Zhang, Y., Florens, L., et al. (2016). ATXN7L3 and ENY2 Coordinate Activity of Multiple H2B Deubiquitinases Important for Cellular Proliferation and Tumor Growth. *Mol. Cell* 62, 558–571.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381.
- Barneche, F., Malapeira, J., and Mas, P. (2014). The impact of chromatin dynamics on plant light responses and circadian clock function. *J Exp Bot* 65.
- Batta, K., Zhang, Z., Yen, K., Goffman, D.B., and Pugh, B.F. (2011). Genome-wide function of H2B ubiquitylation in promoter and genic regions. *Genes Dev* 25, 2254–2265.
- Benhamed, M., Bertrand, C., Servet, C., and Zhou, D.X. (2006). Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell* 18, 2893–2903.
- Benvenuto, G., Formiggini, F., Laflamme, P., Malakhov, M., and Bowler, C. (2002). The photomorphogenesis regulator DET1 binds the amino-terminal tail of histone H2B in a nucleosome context. *Curr Biol* 12, 1529–1534.
- Bernatavichute, Y.V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2008). Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 3, e3156.
- Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle, M., Anders, M., Dubin, M.J., Benvenuto, G., Bowler, C., Genschik, P., et al. (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 47, 591–603.
- Bonnet, J., Wang, C.-Y., Baptista, T., Vincent, S.D., Hsiao, W.-C., Stierle, M., Kao, C.-F., Tora, L., and Devys, D. (2014). The SAGA coactivator complex acts on the whole transcribed genome and is required for RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 28, 1999–2012.
- Bourbousse, C., Ahmed, I., Roudier, F., Zabulon, G., Blondet, E., Balzergue, S., Colot, V., Bowler, C., and Barneche, F. (2012). Histone H2B Monoubiquitination Facilitates the Rapid Modulation of Gene Expression during *Arabidopsis* Photomorphogenesis. *PLoS Genet* 8, e1002825.
- Bourbousse, C., Mestiri, I., Zabulon, G., Bourge, M., Formiggini, F., Koinig, M., Spencer C., B., Frasz, P., Bowler, C., and Barneche, F. (2015). Heterochromatin reorganization during photomorphogenic reprogramming of plant development. *Proc Natl Acad Sci U A* 112, E2836-44.
- Bouyer, D., Roudier, F., Heese, M., Andersen, E.D., Gey, D., Nowack, M.K., Goodrich, J., Renou, J.-P., Grini, P.E., Colot, V., et al. (2011). Polycomb Repressive Complex 2 Controls the Embryo-to-Seedling Phase Transition. *PLoS Genet* 7, e1002014.
- Bratzel, F., Lopez-Torrejon, G., Koch, M., Del Pozo, J.C., and Calonje, M. (2010). Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr Biol* 20, 1853–1859.

- Cao, H., Li, X., Wang, Z., Ding, M., Sun, Y., Dong, F., Chen, F., Liu, L., Fan, L., Doughty, J., Li, Y., et al. (2015). Histone H2B Monoubiquitination Mediated by HISTONE MONOUBIQUITINATION1 and HISTONE MONOUBIQUITINATION2 Is Involved in Anther Development by Regulating Tapetum Degradation-Related Genes in Rice. *Plant Physiol.* *168*, 1389–1405.
- Cao, Y., Dai, Y., Cui, S., and Ma, L. (2008). Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of FLOWERING LOCUS C regulates flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell* *20*, 2586–2602.
- Charron, J.-B.F., He, H., Elling, A.A., and Deng, X.W. (2009). Dynamic landscapes of four histone modifications during deetiolation in Arabidopsis. *Plant Cell Online* *21*, 3732–3748.
- Chen, H., Shen, Y., Tang, X., Yu, L., Wang, J., Guo, L., Zhang, Y., Zhang, H., Feng, S., Strickland, E., et al. (2006). Arabidopsis CULLIN4 Forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in Mediating Light Control of Development. *Plant Cell* *18*, 1991–2004.
- Chen, H., Huang, X., Gusmaroli, G., Terzaghi, W., Lau, O.S., Yanagawa, Y., Zhang, Y., Li, J., Lee, J.-H., Zhu, D., et al. (2010). Arabidopsis CULLIN4-Damaged DNA Binding Protein 1 Interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA Complexes to Regulate Photomorphogenesis and Flowering Time. *Plant Cell Online* *22*, 108–123.
- Choi, Y.H., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J.J., Goldberg, R.B., Jacobsen, S.E., and Fischer, R.L. (2002). DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis. *Cell* *110*, 33–42.
- Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L., and Ausubel, F. (1989). Arabidopsis thaliana mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* *58*, 991–999.
- Chua, Y.L., Brown, A.P.C., and Gray, J.C. (2001). Targeted histone acetylation and altered nuclease accessibility over short regions of the pea plastocyanin gene. *Plant Cell* *13*, 599–612.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. (2002). Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* *111*, 185–196.
- De Lucia, F., Crevillen, P., Jones, A.M., Greb, T., and Dean, C. (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 16831–16836.
- Deng, X.W., Caspar, T., and Quail, P.H. (1991). cop1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev* *5*, 1172–1182.
- Dhawan, R., Luo, H., Foerster, A.M., Abuqamar, S., Du, H.N., Briggs, S.D., Mittelsten Scheid, O., and Mengiste, T. (2009). HISTONE MONOUBIQUITINATION1 interacts with a subunit of the mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in Arabidopsis. *Plant Cell* *21*, 1000–1019.
- Dillies, M.-A., Rau, A., Aubert, J., Hennequet-Antier, C., Jeanmougin, M., Servant, N., Keime, C., Marot, G., Castel, D., Estelle, J., et al. (2013). A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Brief. Bioinform.* *14*, 671–683.
- Dittmer, T.A., Stacey, N.J., Sugimoto-Shirasu, K., and Richards, E.J. (2007). LITTLE NUCLEI genes affecting nuclear morphology in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Online* *19*, 2793–2803.

- Doherty, C.J., and Kay, S.A. (2010). Circadian control of global gene expression patterns. *Annu Rev Genet* 44, 419–444.
- Dong, J., Tang, D., Gao, Z., Yu, R., Li, K., He, H., Terzaghi, W., Deng, X.W., and Chen, H. (2014). Arabidopsis DE-ETIOLATED1 represses photomorphogenesis by positively regulating phytochrome-interacting factors in the dark. *Plant Cell* 26, 3630–3645.
- Du, J., Zhong, X., Bernatavichute, Y.V., Stroud, H., Feng, S., Caro, E., Vashisht, A.A., Terragni, J., Chin, H.G., and Tu, A. (2012). Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell* 151, 167–180.
- Durand, A., Bonnet, J., Fournier, M., Chavant, V., and Schultz, P. (2014). Mapping the Deubiquitination Module within the SAGA Complex. *Structure* 22, 1553–1559.
- Earley, K.W., Shook, M.S., Brower-Toland, B., Hicks, L., and Pikaard, C.S. (2007). In vitro specificities of Arabidopsis co-activator histone acetyltransferases: implications for histone hyperacetylation in gene activation. *Plant J* 52, 615–626.
- Eissenberg, J.C., and Shilatifard, A. (2009). Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev. Biol. In Press, Corrected Proof*.
- Emre, N.C.T., Ingvarsdottir, K., Wyce, A., Wood, A., Krogan, N.J., Henry, K.W., Li, K.Q., Marmorstein, R., Greenblatt, J.F., Shilatifard, A., et al. (2005). Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol. Cell* 17, 585–594.
- Fankhauser, C., and Casal, J.J. (2004). Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *Plant J* 39, 747–760.
- Fierz, B., Chatterjee, C., McGinty, R.K., Bar-Dagan, M., Raleigh, D.P., and Muir, T.W. (2011). Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nat Chem Biol* 7, 113–119.
- Filion, G.J., van Bommel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., de Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J., et al. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. *Cell* 143, 212–224.
- Fleming, A.B., Kao, C.F., Hillyer, C., Pikaart, M., and Osley, M.A. (2008). H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol Cell* 31, 57–66.
- Franklin, K.A., and Quail, P.H. (2010). Phytochrome functions in Arabidopsis development. *J Exp Bot* 61, 11–24.
- Fransz, P., and de Jong, H. (2011). From nucleosome to chromosome: a dynamic organization of genetic information. *Plant J* 66, 4–17.
- Fransz, P., De Jong, J.H., Lysak, M., Castiglione, M.R., and Schubert, I. (2002). Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14584–14589.
- García-Oliver, E., García-Molinero, V., and Rodríguez-Navarro, S. (2012). mRNA export and gene expression: The SAGA–TREX-2 connection. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1819, 555–565.

- Gardner, R.G., Nelson, Z.W., and Gottschling, D.E. (2005). Ubp10/Dot4p Regulates the Persistence of Ubiquitinated Histone H2B: Distinct Roles in Telomeric Silencing and General Chromatin 10.1128/MCB.25.14.6123-6139.2005. *Mol Cell Biol* 25, 6123–6139.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T., David, L., and Zhu, J.-K. (2002). ROS1, a Repressor of Transcriptional Gene Silencing in Arabidopsis, Encodes a DNA Glycosylase/Lyase. *111*, 803–814.
- Govind, C.K., Zhang, F., Qiu, H., Hofmeyer, K., and Hinnebusch, A.G. (2007). Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Mol Cell* 25, 31–42.
- Grant, P.A., Eberharter, A., John, S., Cook, R.G., Turner, B.M., and Workman, J.L. (1999). Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J. Biol. Chem.* 274, 5895–5900.
- Grant, R.P., Neuhaus, D., and Stewart, M. (2003). Structural basis for the interaction between the Tap/NXF1 UBA domain and FG nucleoporins at 1A resolution. *J. Mol. Biol.* 326, 849–858.
- Grimanelli, D., and Roudier, F. (2013). Epigenetics and development in plants: green light to convergent innovations. *Curr Top Dev Biol* 104, 189–222.
- Grob, S., Schmid, M.W., and Grossniklaus, U. (2014). Hi-C analysis in Arabidopsis identifies the KNOT, a structure with similarities to the flamenco locus of Drosophila. *Mol Cell* 55.
- Hark, A.T., Vlachonassios, K.E., Pavangadkar, K.A., Rao, S., Gordon, H., Adamakis, I.-D., Kaldis, A., Thomashow, M.F., and Triezenberg, S.J. (2009). Two Arabidopsis orthologs of the transcriptional coactivator ADA2 have distinct biological functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1789 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939908002010>, 117–124.
- Harmer, S.L., Panda, S., and Kay, S.A. (2001). Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 215–253.
- Hennig, L., and Derkacheva, M. (2009). Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players? *Trends Genet* 25, 414–423.
- Henry, K.W., Wyce, A., Lo, W.S., Duggan, L.J., Emre, N.C., Kao, C.F., Pillus, L., Shilatifard, A., Osley, M.A., and Berger, S.L. (2003). Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17, 2648–2663.
- Himanen, K., Woloszynska, M., Boccardi, T.M., De Groeve, S., Nelissen, H., Bruno, L., Vuylsteke, M., and Van Lijsebettens, M. (2012). Histone H2B monoubiquitination is required to reach maximal transcript levels of circadian clock genes in Arabidopsis. *Plant J* 72, 249–260.
- Hochstrasser, M. (1996). Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 84, 813–815.
- Huanca-Mamani, W., Garcia-Aguilar, M., León-Martínez, G., Grossniklaus, U., and Vielle-Calzada, J.-P. (2005). CHR11, a chromatin-remodeling factor essential for nuclear proliferation during female gametogenesis in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17231–17236.
- Hwang, W.W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A.G., Tong, A., Boone, C., and Madhani, H.D. (2003). A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol. Cell* 11, 261–266.

- Ikeda, Y., and Kinoshita, T. (2009). DNA demethylation: a lesson from the garden. *Chromosoma* *118*, 37–41.
- Irigoyen, M.L., Iniesto, E., Rodriguez, L., Puga, M.I., Yanagawa, Y., Pick, E., Strickland, E., Paz-Ares, J., Wei, N., De Jaeger, G., et al. (2014). Targeted Degradation of Abscisic Acid Receptors Is Mediated by the Ubiquitin Ligase Substrate Adaptor DDA1 in Arabidopsis. *Plant Cell* *26*, 712–728.
- Jiao, Y., Lau, O.S., and Deng, X.W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* *8*, 217–230.
- Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., and Wada, M. (2001). Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* *291*, 2138–2141.
- Kang, M.-Y., Yoo, S.-C., Kwon, H.-Y., Lee, B.-D., Cho, J.-N., Noh, Y.-S., and Paek, N.-C. (2015). Negative regulatory roles of DE-ETIOLATED1 in flowering time in Arabidopsis. *Sci. Rep.* *5*.
- Kankel, M.W., Ramsey, D.E., Stokes, T.L., Flowers, S.K., Haag, J.R., Jeddeloh, J.A., Riddle, N.C., Verbsky, M.L., and Richards, E.J. (2003). Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* *163*, 1109–1122.
- Kharchenko, P.V., Alekseyenko, A.A., Schwartz, Y.B., Minoda, A., Riddle, N.C., Ernst, J., Sabo, P.J., Larschan, E., Gorchakov, A.A., Gu, T., et al. (2011). Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* *471*, 480–485.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* *116*, 259–272.
- Kim, D.-H., and Sung, S. (2014). Polycomb-Mediated Gene Silencing in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cells* *37*, 841–850.
- Kim, D., Hong, A., Park, H.I., Shin, W.H., Yoo, L., Jeon, S.J., and Chung, K.C. (2017). Deubiquitinating enzyme USP22 positively regulates c-Myc stability and tumorigenic activity in mammalian and breast cancer cells. *J. Cell. Physiol.*
- Koehler, C., Bonnet, J., Stierle, M., Romier, C., Devys, D., and Kieffer, B. (2014). DNA Binding by Sgf11 Protein Affects Histone H2B Deubiquitination by Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase (SAGA). *J. Biol. Chem.* *289*, 8989–8999.
- Köhler, A., Pascual-García, P., Llopis, A., Zapater, M., Posas, F., Hurt, E., and Rodríguez-Navarro, S. (2006). The mRNA export factor Sus1 is involved in Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase-mediated H2B deubiquitylation through its interaction with Ubp8 and Sgf11. *Mol. Biol. Cell* *17*, 4228–4236.
- Köhler, A., Zimmerman, E., Schneider, M., Hurt, E., and Zheng, N. (2010a). Structural Basis for Assembly and Activation of the Heterotetrameric SAGA Histone H2B Deubiquitinase Module. *Cell* *141*, 606–617.
- Köhler, A., Zimmerman, E., Schneider, M., Hurt, E., and Zheng, N. (2010b). Structural Basis for Assembly and Activation of the Heterotetrameric SAGA Histone H2B Deubiquitinase Module. *Cell* *141*, 606–617.

- Kohler, C., Hennig, L., Bouveret, R., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., and Gruissem, W. (2003). Arabidopsis MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *Embo J.* 22, 4804–4814.
- Krichevsky, A., Zaltsman, A., Lacroix, B., and Citovsky, V. (2011). Involvement of KDM1C histone demethylase and OTLD1 otubain-like histone deubiquitinase complexes in plant gene repression. [10.1073/pnas.1014030108](https://doi.org/10.1073/pnas.1014030108). *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Kuo, M.-H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E.A., and Allis, C.D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev.* 12, 627–639.
- Lafos, M., Kröll, P., Hohenstatt, M.L., Thorpe, F.L., Clarenz, O., and Schubert, D. (2011). Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during Arabidopsis differentiation. *PLoS Genet.* 7, e1002040.
- Lau, O.S., and Deng, X.W. (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci* 17, 584–593.
- Lau, O.S., Huang, X., Charron, J.B., Lee, J.H., Li, G., and Deng, X.W. (2011). Interaction of Arabidopsis DET1 with CCA1 and LHY in mediating transcriptional repression in the plant circadian clock. *Mol Cell* 43, 703–712.
- Law, J.A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11, 204–220.
- Law, J.A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., and Jacobsen, S.E. (2011). SHH1, a Homeodomain Protein Required for DNA Methylation, As Well As RDR2, RDM4, and Chromatin Remodeling Factors, Associate with RNA Polymerase IV. *PLoS Genet* 7, e1002195.
- Lee, K.K., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2005). The deubiquitylation activity of Ubp8 is dependent upon Sgf11 and its association with the SAGA complex. *Mol Cell Biol* 25, 1173–1182.
- Lee, K.K., Swanson, S.K., Florens, L., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2009). Yeast Sgf73/Ataxin-7 serves to anchor the deubiquitination module into both SAGA and Slik(SALSA) HAT complexes. *Epigenetics Chromatin* 2, 2.
- Leivar, P., and Monte, E. (2014). PIFs: Systems Integrators in Plant Development[W]. *Plant Cell* 26, 56–78.
- Leivar, P., and Quail, P.H. (2010). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci* 16, 19–28.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Quail, P.H. (2008). The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* 20, 337–352.
- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565–570.
- Li, K., Gao, Z., He, H., Terzaghi, W., Fan, L.-M., Deng, X.W., and Chen, H. (2015). Arabidopsis DET1 represses photomorphogenesis in part by negatively regulating DELLA protein abundance in darkness. *Mol. Plant* 8, 622–630.

- Li, Y., Yang, Y., Li, J., Liu, H., Chen, F., Li, B., Cui, B., and Liu, Y. (2017). USP22 drives colorectal cancer invasion and metastasis via epithelial-mesenchymal transition by activating AP4. *Oncotarget* **8**, 32683–32695.
- Lindroth, A.M., Cao, X., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S., and Jacobsen, S.E. (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* **292**, 2077–2080.
- Liu, Y., Koornneef, M., and Soppe, W.J. (2007). The absence of histone H2B monoubiquitination in the *Arabidopsis* hub1 (*rdo4*) mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy. *Plant Cell* **19**, 433–444.
- Liu, Y., Wang, F., Zhang, H., He, H., Ma, L., and Deng, X.W. (2008). Functional characterization of the *Arabidopsis* ubiquitin-specific protease gene family reveals specific role and redundancy of individual members in development. *Plant J* **55**, 844–856.
- Lu, Q., Tang, X., Tian, G., Wang, F., Liu, K., Nguyen, V., Kohalmi, S.E., Keller, W.A., Tsang, E.W.T., Harada, J.J., et al. (2010). *Arabidopsis* homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin. *Plant J.* **61**, 259–270.
- Luo, M., Luo, M.Z., Buzas, D., Finnegan, J., Helliwell, C., Dennis, E.S., Peacock, W.J., and Chaudhury, A. (2008). UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 26 is required for seed development and the repression of PHERES1 in *Arabidopsis*. *Genetics* **180**, 229–236.
- Ma, L.G., Li, J.M., Qu, L.J., Hager, J., Chen, Z.L., Zhao, H.Y., and Deng, X.W. (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* **13**, 2589–2607.
- Maxwell, B.B., Andersson, C.R., Poole, D.S., Kay, S.A., and Chory, J. (2003). HY5, Circadian Clock-Associated 1, and a cis-element, DET1 dark response element, mediate DET1 regulation of chlorophyll a/b-binding protein 2 expression. *Plant Physiol* **133**, 1565–1577.
- McClung, C.R. (2011). The genetics of plant clocks. *Adv Genet* **74**, 105–139.
- Meier, I., Richards, E.J., and Evans, D.E. (2017). Cell Biology of the Plant Nucleus. *Annu. Rev. Plant Biol.* **68**, 139–172.
- Mohan, M., Herz, H.-M., Smith, E.R., Zhang, Y., Jackson, J., Washburn, M.P., Florens, L., Eissenberg, J.C., and Shilatifard, A. (2011). The COMPASS Family of H3K4 Methylases in *Drosophila*. *Mol. Cell Biol.* **31**, 4310–4318.
- Mohan, R.D., Dialynas, G., Weake, V.M., Liu, J., Martin-Brown, S., Florens, L., Washburn, M.P., Workman, J.L., and Abmayr, S.M. (2014). Loss of *Drosophila* Ataxin-7, a SAGA subunit, reduces H2B ubiquitination and leads to neural and retinal degeneration. *Genes Dev.* **28**, 259–272.
- Molitor, A., and Shen, W.H. (2013). The polycomb complex PRC1: composition and function in plants. *J Genet Genomics* **40**, 231–238.
- Moraga, F., and Aquea, F. (2015). Composition of the SAGA complex in plants and its role in controlling gene expression in response to abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* **6**.
- Olins, D.E., and Olins, A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 809–814.

- Orlando, D.A., Chen, M.W., Brown, V.E., Solanki, S., Choi, Y.J., Olson, E.R., Fritz, C.C., Bradner, J.E., and Guenther, M.G. (2014). Quantitative ChIP-Seq Normalization Reveals Global Modulation of the Epigenome. *Cell Rep.* *9*, 1163–1170.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* *405*, 462–466.
- Pazhouhandeh, M., Molinier, J., Berr, A., and Genschik, P. (2011). MSI4/FVE interacts with CUL4–DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 3430–3435.
- Pedmale, U.V., Huang, S.S., Zander, M., Cole, B.J., Hetzel, J., Ljung, K., Reis, P.A., Sridevi, P., Nito, K., Nery, J.R., et al. (2016). Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell* *164*, 233–245.
- Perrella, G., and Kaiserli, E. (2016). Light behind the curtain: photoregulation of nuclear architecture and chromatin dynamics in plants. *New Phytol.* *212*, 908–919.
- Pikaard, C.S., and Scheid, O.M. (2014). Epigenetic Regulation in Plants. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, a019315.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O’Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schafer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., et al. (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* *332*, 103–106.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* *29*, 24–26.
- Rockwell, N.C., Su, Y.-S., and Lagarias, J.C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. In *Annual Review of Plant Biology*, pp. 837–858.
- Rothbart, S.B., and Strahl, B.D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 627–643.
- Roudier, F., Ahmed, I., Bérard, C., Sarazin, A., Mary-Huard, T., Cortijo, S., Bouyer, D., Caillieux, E., Duvernois-Berthet, E., and Al-Shikhley, L. (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J.* *30*, 1928–1938.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Wysocka, J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol. Cell* *25*, 15–30.
- Sadowski, M., Suryadinata, R., Tan, A.R., Roesley, S.N.A., and Sarcevic, B. (2012). Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life* *64*, 136–142.
- Sakamoto, Y., and Takagi, S. (2013). LITTLE NUCLEI 1 and 4 regulate nuclear morphology in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* *54*, 622–633.
- Samara, N.L., and Wolberger, C. (2011). A new chapter in the transcription SAGA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *21*, 767–774.

- Samara, N.L., Datta, A.B., Berndsen, C.E., Zhang, X., Yao, T., Cohen, R.E., and Wolberger, C. (2010). Structural insights into the assembly and function of the SAGA deubiquitinating module. *Science* 328, 1025–1029.
- Samara, N.L., Ringel, A.E., and Wolberger, C. (2012). A Role for Intersubunit Interactions in Maintaining SAGA Deubiquitinating Module Structure and Activity. *Structure* 20, 1414–1424.
- Schubert, D., Clarenz, O., and Goodrich, J. (2005). Epigenetic control of plant development by Polycomb-group proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 553–561.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., and Kay, S.A. (2001). A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 2659–2670.
- Schulze, J.M., Hentrich, T., Nakanishi, S., Gupta, A., Emberly, E., Shilatifard, A., and Kobor, M.S. (2011). Splitting the task: Ubp8 and Ubp10 deubiquitinate different cellular pools of H2BK123. *Genes Dev.* 25, 2242–2247.
- Sequeira-Mendes, J., Araguez, I., Peiro, R., Mendez-Giraldez, R., Zhang, X., Jacobsen, S.E., Bastolla, U., and Gutierrez, C. (2014). The Functional Topography of the Arabidopsis Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States. *Plant Cell* 26, 2351–2366.
- Servet, C., Conde e Silva, N., and Zhou, D.-X. (2010). Histone Acetyltransferase AtGCN5/HAG1 Is a Versatile Regulator of Developmental and Inducible Gene Expression in Arabidopsis. *Mol. Plant* 3 <http://mplant.oxfordjournals.org/content/3/4/670.abstract>, 670–677.
- Sharrock, R.A., and Clack, T. (2002). Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. *Plant Physiol.* 130, 442–456.
- Sheerin, D.J., Menon, C., Oven-Krockhaus, S. zur, Enderle, B., Zhu, L., Johnen, P., Schleifenbaum, F., Stierhof, Y.-D., Huq, E., and Hiltbrunner, A. (2015). Light-Activated Phytochrome A and B Interact with Members of the SPA Family to Promote Photomorphogenesis in Arabidopsis by Reorganizing the COP1/SPA Complex. *Plant Cell* 27, 189–201.
- Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75, 243–269.
- Smith, E., and Shilatifard, A. (2009). Developmental biology. Histone cross-talk in stem cells. *Science* 323, 221–222.
- Sridhar, V.V., Kapoor, A., Zhang, K., Zhu, J., Zhou, T., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., and Zhu, J.-K. (2007). Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature* 447, 735–738.
- Srivastava, R., Rai, K.M., Pandey, B., Singh, S.P., and Sawant, S.V. (2015). Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase (SAGA) Complex in Plants: Genome Wide Identification, Evolutionary Conservation and Functional Determination. *PLOS ONE* 10, e0134709.
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., and Rout, M.P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 490–501.
- Suetsugu, N., Yamada, N., Kagawa, T., Yonekura, H., Uyeda, T.Q.P., Kadota, A., and Wada, M. (2010). Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8860–8865.

- Sun, Z.-W., and Allis, C.D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**, 104–108.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2016). Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 115–126.
- Tepperman, J.M., Hudson, M.E., Khanna, R., Zhu, T., Chang, S.H., Wang, X., and Quail, P.H. (2004). Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *Plant J.* **38**, 725–739.
- Van Leene, J., Eeckhout, D., Cannoot, B., De Winne, N., Persiau, G., Van De Slijke, E., Vercruyse, L., Dedecker, M., Verkest, A., Vandepoele, K., et al. (2015). An improved toolbox to unravel the plant cellular machinery by tandem affinity purification of Arabidopsis protein complexes. *Nat. Protoc.* **10**, 169–187.
- Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W.M.P., van Schaik, F.M.A., Varier, R.A., Baltissen, M.P.A., Stunnenberg, H.G., Mann, M., and Timmers, H.T.M. (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* **131**, 58–69.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873–878.
- Weake, V.M., and Workman, J.L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* **29**, 653–663.
- Weake, V.M., and Workman, J.L. (2011). SAGA function in tissue-specific gene expression. *Trends Cell Biol.*
- Weake, V.M., Lee, K.K., Guelman, S., Lin, C.-H., Seidel, C., Abmayr, S.M., and Workman, J.L. (2008). SAGA-mediated H2B deubiquitination controls the development of neuronal connectivity in the *Drosophila* visual system. *EMBO J* **27**, 394–405.
- Weinhofer, I., Hehenberger, E., Roszak, P., Hennig, L., and Köhler, C. (2010). H3K27me3 Profiling of the Endosperm Implies Exclusion of Polycomb Group Protein Targeting by DNA Methylation. *PLOS Genet.* **6**, e1001152.
- Woo, H., Pontes, O., Pikaard, C., and Richards, E. (2007). VIM1, a methylcytosine-binding protein required for centromeric heterochromatinization. *Genes Dev* **21**, 267–277.
- Wood, A., Krogan, N.J., Dover, J., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Golshani, A., Zhang, Y., Greenblatt, J.F., et al. (2003). Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* **11**, 267–274.
- Wyce, A., Xiao, T., Whelan, K.A., Kosman, C., Walter, W., Eick, D., Hughes, T.R., Krogan, N.J., Strahl, B.D., and Berger, S.L. (2007). H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Mol Cell* **27**, 275–288.
- Xu, X., Paik, I., Zhu, L., Bu, Q., Huang, X., Deng, X.W., and Huq, E. (2014). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR1 Enhances the E3 Ligase Activity of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 to Synergistically Repress Photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell Online tpc.114.125591*.

- Yan, N., Doelling, J.H., Falbel, T.G., Durski, A.M., and Vierstra, R.D. (2000). The ubiquitin-specific protease family from Arabidopsis. AtUBP1 and 2 are required for the resistance to the amino acid analog canavanine. *Plant Physiol.* **124**, 1828–1843.
- Yanagawa, Y., Sullivan, J.A., Komatsu, S., Gusmaroli, G., Suzuki, G., Yin, J., Ishibashi, T., Saijo, Y., Rubio, V., Kimura, S., et al. (2004). Arabidopsis COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes 10.1101/gad.1229504. *Genes Dev.* **18**, 2172–2181.
- Yang, C., Bratzel, F., Hohmann, N., Koch, M., Turck, F., and Calonje, M. (2013). VAL- and AtBMI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to postgerminative growth in Arabidopsis. *Curr Biol* **23**, 1324–1329.
- Ye, T., Ravens, S., Krebs, A., and Tora, L. (2014). Interpreting and Visualizing ChIP-seq Data with the seqMINER Software. In *Stem Cell Transcriptional Networks*, B.L. Kidder, ed. (Springer New York), pp. 141–152.
- Yu, H., Kago, G., Yellman, C.M., and Matouschek, A. (2016). Ubiquitin-like domains can target to the proteasome but proteolysis requires a disordered region. *EMBO J.* **35**, 1522–1536.
- van Zanten, M., Koini, M.A., Geyer, R., Liu, Y., Brambilla, V., Bartels, D., Koornneef, M., Fransz, P., and Soppe, W.J. (2011). Seed maturation in Arabidopsis thaliana is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U A* **108**, 20219–20224.
- Zhang, D., Jiang, F., Wang, X., and Li, G. (2017). Downregulation of Ubiquitin-Specific Protease 22 Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition in Osteosarcoma Cells. *Oncol. Res.* **25**, 743–751.
- Zhang, X.Y., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y.V., Pellegrini, M., Goodrich, J., and Jacobsen, S.E. (2007). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol* **5**.
- Zhang, X.-Y., Varthi, M., Sykes, S.M., Phillips, C., Warzecha, C., Zhu, W., Wyce, A., Thorne, A.W., Berger, S.L., and McMahon, S.B. (2008). The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression. *Mol. Cell* **29**, 102–111.
- Zhou, V.W., Goren, A., and Bernstein, B.E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 7–18.
- Zhou, Y., Romero-Campero, F.J., Gómez-Zambrano, Á., Turck, F., and Calonje, M. (2017). H2A monoubiquitination in Arabidopsis thaliana is generally independent of LHP1 and PRC2 activity. *Genome Biol.* **18**, 69.
- (1994). *Photomorphogenesis in Plants* (Dordrecht: Springer Netherlands).

Titre : Caractérisation fonctionnelle des voies de la déubiquitination de l'histone H2B chez *Arabidopsis thaliana*

Mots clés : H2Bub, déubiquitination, photomorphogenèse

Les plantes disposent de mécanismes rapides d'adaptation de leur physiologie et de leur développement à des conditions environnementales changeantes. Leur mise en œuvre dépend largement d'une capacité de reprogrammation de l'expression des gènes qui implique généralement des changements continus de l'épigénome. Chez de nombreux organismes, différentes voies d'enlèvement de la monoubiquitination de l'histone H2B (H2Bub) participent d'une part à faciliter la transcription des gènes par l'ARN polymérase II et d'autre part à éviter l'établissement d'un état permissif à la transcription par enlèvement de domaines enrichis en H2Bub sur des régions répétées telles que les séquences télomériques. Cette thèse a porté sur l'étude des voies régulant la marque chromatiniennne H2Bub chez les plantes, dont la connaissance des mécanismes de contrôle dynamique est très fragmentaire. Une nouvelle ubiquitine protéase de l'espèce *Arabidopsis thaliana* a été identifiée comme étant un homologue fonctionnel de Ubp8, une protéine associée à l'élongation de la transcription au sein d'un module de déubiquitination d'H2Bub du complexe SAGA chez *S. cerevisiae*. L'identification et la caractérisation fonctionnelle de trois composants de ce module chez *A. thaliana* a révélé qu'il agit sur des milliers de gènes, suggérant son implication dans des mécanismes basaux de la transcription. Dans une seconde partie, il a été observé que l'abondance de deux sous-unités de ce module est régulée au cours de la photomorphogenèse par DET1, un acteur central de la signalisation de la lumière. Cette transition développementale permet l'adaptation du métabolisme et de la morphologie de la plante en réponse à la première exposition à la lumière, notamment via l'établissement de l'activité photosynthétique. La régulation post-traductionnelle du module de déubiquitination de l'histone H2B pourrait permettre d'ajuster son activité aux changements d'activité transcriptionnelle de la cellule au cours de cette transition. Une approche génétique a également permis d'identifier une redondance fonctionnelle partielle entre l'activité du module de déubiquitination et UBP26, une seconde déubiquitinase d'H2Bub connue pour son implication dans la répression des gènes *PHERES1* et *FLC* par une activité *Polycomb* ainsi que de certains éléments transposables. Ces analyses ont permis de révéler une influence positive de UBP26 sur l'établissement d'un état répressif à la transcription sur des centaines de gènes et également dans certains contextes hétérochromatiniens. Collectivement, ce travail a permis de disséquer les spécificités et les redondances fonctionnelles de deux voies de déubiquitination de l'histone H2B portées par des complexes protéiques distincts.

Title: Functional characterization of histone H2B deubiquitination pathways in *Arabidopsis thaliana*

Keywords: H2Bub, deubiquitination, photomorphogenesis

Plants utilize rapid mechanisms to adapt their physiology and development to changing environments. Their triggering depends greatly on gene expression reprogramming leading to important changes in the epigenome. In numerous organisms, different pathways remove monoubiquitination of histone H2B (H2Bub) to facilitate gene transcription by RNA polymerase II, with H2Bub removal on repeated genomic regions, such as telomeres, prohibiting establishment of a transcription permissive state. This thesis aims to better characterize the pathways that regulate the chromatin mark H2Bub in plants. A new ubiquitin protease from *Arabidopsis thaliana* was identified as a potential homolog of Ubp8, a protein associated with transcription elongation within a deubiquitination module of the SAGA complex in *S. cerevisiae*. Identification and functional characterization of the three components of the deubiquitination module in *A. thaliana* reveals its action on thousands of genes, suggesting a role in basal transcription mechanism. Secondly, it was shown that the quantity of two subunits from this module is regulated during photomorphogenesis by DET1, a central protein involved in light signaling. This developmental transition allows adaptation of metabolism and morphology of the plant in response to the first light exposure, notably during photosynthesis establishment. The post-translational regulation of the histone H2Bub deubiquitination module may allow its adjustment to changes in cell transcription needs during this transition. A genetic approach identified a partial functional redundancy between the deubiquitination module activity and UBP26, a second H2Bub deubiquitinase known to repress the genes *PHERES1* and *FLC* by a *Polycomb* activity and certain transposable elements. These analyses revealed a positive influence from UBP26 on establishing a repressive transcriptional state on hundreds of genes and on some heterochromatinian contexts. Collectively, this work dissected specificities and functional redundancies of two H2Bub deubiquitination pathways driven by distinct protein complexes.