

# Rôle de l'histone variante H2A.Z dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes de la peau

Lorrie Ramos

## ► To cite this version:

Lorrie Ramos. Rôle de l'histone variante H2A.Z dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes de la peau. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT: 2019GREAV022 . tel-02446894

## HAL Id: tel-02446894 https://theses.hal.science/tel-02446894

Submitted on 21 Jan2020

**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.

## Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

#### DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biologie cellulaire

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

## Lorrie RAMOS

Thèse dirigée par **Thierry GAUTIER**, **MCU**, **Université Grenoble Alpes**, et codirigée par **Kiran PADMANABHAN**, **CR1**, **INSERM** 

préparée au sein du Laboratoire CRI IAB - Centre de Recherche Oncologie/Développement - Institute for Advanced Biosciences

dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

## Rôle de l'histone variante H2A.Z dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes de la peau

Thèse soutenue publiquement le **19 septembre 2019** devant le jury composé de :

Pr. Catherine GHEZZI Professeur, Université Grenoble Alpes, Président Dr. Patricia ROUSSELLE Directeur de Recherche, CNRS, Lyon, Rapporteur Dr. Pierre JALINOT Directeur de Recherche, CNRS, Lyon, Rapporteur Dr. Frederic MICHON Chargé de recherche, INSERM, Montpellier, Examinateur Dr. Dimitrios SKOUFIAS Directeur de Recherche, CEA, Examinateur Dr. Stefan DIMITROV Directeur de Recherche Émérite, CNRS, Grenoble, Membre invité Pr. Danielle Dhouailly Professeur Émérite, Université Grenoble Alpes, Grenoble, Membre invité



# **TABLE DES MATIERES**

Table des matièn	fes	3
Remerciements.		7
Résumé		11
Abstract		13
Liste des abrévia	ations	15
Liste des figures		19
Liste des tableau	IX	22
Liste des figures	supplémentaires	23
I. Introductio	n	25
Chapitre I.1	La chromatine, une structure en constant remaniement	26
I.1.1	Un point sur l'histoire	
I.1.2	L'organisation structurale de la chromatine	
I.1.3	Organisation fonctionnelle de la chromatine	
I.1.4	La régulation épigénétique	
I.1.5	Les histones variantes	
I.1.6	La mitose	60
I.1.7	Lien entre les pathologies impliquant les histones variantes CENP-	-A,
H2A.Z et la	mitose	
Chapitre I.2	La peau : modèle choisi pour étudier le rôle de H2A.Z lors de l	la 🥫
proliferation	et de la différenciation des kératinocytes épidermiques	<b>6</b> 7
I.2.1	La peau, ses deux tissus et ses annexes	67
I.2.2	Les annexes cutanées	73
I.2.3	La composition de l'épiderme	77
I.2.4	L'embryogénèse de la peau et du follicule pileux	
I.2.5	Les cellules souches	
I.2.6	Identification des cellules souches	93
I.2.7	Les dermatoses	
I.2.8	Contrôle épigénétique du développement et de l'homéostasie de la	peau.99
I.2.9	Limites de l'utilisation du modèle souris pour l'étude de la peau et	de son
extrapolation	n à l'homme	

II.	Objectifs	
III.	Matériel et	Méthodes10
C	Chapitre III.1	Expérimentation animale10
	III.1.1 III.1.2 souris III.1.3 III.1.4 III.1.5	Élevage et création des lignées de souris transgéniques
0	Chapitre III.2	Génotypage des souris11
	III.2.1 III.2.2	Extraction d'ADN génomique
C	Chapitre III.3	Techniques in-situ11
	III.3.1 l'épiderme III.3.2 III.3.3 III.3.4 III.3.5 III.3.6 III.3.7 transmission	Préparation de la pancréatine 8% pour la séparation derme et de 114 Séparation du derme et de l'épiderme
IV.	Résultats	
C K	Chapitre IV.1 Knock-out	Préambule : La technique d'invalidation génique, aussi appelée 122
C v	Chapitre IV.2 alidité	Obtention des différentes lignées KO pour H2A.Z et des contrôles de 123
(	IV.2.1 H2A.Z-1 ; H IV.2.2 IV.2.3 H2afz et H2a Chapitre IV.3	Obtention des modèles de souris H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K14CreER <sup>T2</sup> et         2A.Z-2 ; K5Cre       12         Obtention de différentes lignées contrôle       12         Contrôle de la validité des modèles utilisés pour l'invalidation des gènes       12         Impact de l'invalidation des deux gènes H2A.Z sur l'homéostasie de l       12
р	eau de souris	adulte
	IV.3.1 IV.3.2 IV.3.3	Développement d'une alopécie localisée après le knock-out de H2A.Z . 13 Hyperplasie de l'épiderme KO pour H2A.Z

IV.3.4 l'épiderme IV.3.5 kératinocyte IV.3.6	Impact de l'invalidation des gènes H2afz et H2afv sur la différenciation de 142 Impact de l'invalidation des gènes H2afz et H2afv sur la prolifération des s basaux épidermiques
H2Afv, par IV.3.7 souche des c	la présence de l'histone H3Ser10P
Chapitre IV.4	Impact de la perte d'expression de H2A.Z sur la formation de la peau
au cours de l'	embryogénèse151
IV.4.1 de la CreER IV.4.2 la K5Cre co	Impact de l'invalidation des gènes H2afz et H2Afv, induite par l'activité <sup>T2</sup> , sur le développement de la peau embryonnaire
V. Discussion	et perspectives163
Chapitre V.1	Invalidation génique conditionnelle de H2A.Z dans la peau164
V.1.1 V.1.2 l'épiderme e V.1.3 CreER <sup>T2</sup> ind	Validation du choix de la Recombinase-Cre
Chapitre V.2	Suivant le stade de développement de la souris auquel est réalisée
l'invalidation	de H2A.Z, le phénotype développé au niveau de la peau est soit
« localisé » so	it « ubiquitaire »166
V.2.1 au KO de H	Caractéristiques du phénotype macroscopique « localisé » développé suite
V.2.2	Caractéristiques du phénotype macroscopique « ubiquitaire » chez
l'embryon, o	développé suite au KO de H2A.Z au cours de la formation embryonnaire de
la peau	168
Chapitre V.3	L'absence de H2A.Z induit une hyperplasie chez l'adulte et une
hypercornific	ation chez l'embryon168
V.3.1	Chez l'adulte, l'hyperplasie est la conséquence d'une hyperprolifération
due au stress	s causé par le KO de H2A.Z
V.3.2	L'invalidation de H2A.Z chez l'embryon n'induit pas une
hyperprolifé	ration
Chapitre V.4	L'invalidation des gènes H2afz et H2Afv n'impacte pas la
différenciatio	n des kératinocytes171
V.4.1	Chez les souris adultes, les nombre de cellules différenciées augmente en
conséquence	e de l'hyperprolifération cellulaire engendrée par la perte d'expression de
H2A.Z	171

V.4.2 L'invalidation des gènes H2afz et H2afv, induite entre E8.5-E12.5,
provoque une accumulation des cellules différenciées dans la couche cornée à 7 jours postnatal 172

Chapitre V.5 l'embryogénès	L'invalidation de H2afz et H2afv, chez l'adulte ou au cours de se, provoque le blocage de la mitose172
Chapitre V.6 réservoir de co	L'invalidation des gènes H2afz et H2afv impacte la maintenance du ellules souches174
V.6.1	L'absence de H2A.Z chez l'adulte provoquerait l'épuisement des HFSCs 175
V.6.2 l'épuisement	L'absence de H2A.Z au cours de l'embryogénèse provoquerait des SCs épidermiques
Chapitre V.7	Conclusion générale et perspectives178
VI. Figures sup	plémentaires181
VII. Bibliograp	hie187

## **REMERCIEMENTS**

Si je devais résumer en une phrase mon doctorat, je dirais que ces quatre années ont été une aventure extraordinaire... Une aventure tellement riche en tout point...

Je souhaite exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont accompagnée et soutenue, de près ou de loin, qui m'ont apporté de la joie et du bonheur, qui m'ont aidé à dépasser mes peurs et mes faiblesses et à surpasser chaque obstacle durant le doctorat.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord au **Dr. Stefan Dimitrov**. J'ai intégré votre équipe en tant que stagiaire de master 1, je suis restée pour mon stage de master 2 et je soutiens ma thèse dans cette même équipe. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir fait confiance en m'accordant toute la liberté pour mener à bien mon projet. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre soutien et pour nos discussions si intéressantes sur les voyages et la gastronomie. Je remercie le **Dr. Dimitrios Skoufias** et le **Dr. Fayçal Boussouar** pour leurs conseils et leur soutien dans le cadre du Comité de Suivi de Thèse.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail. Ainsi, je remercie le **Dr. Patricia Rousselle** et le **Dr. Pierre Jalinot** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi que le **Dr. Frederic Michon** et le **Dr. Dimitrios Skoufias** d'avoir accepté de l'examiner et enfin le **Pr. Catherine Guezzi** d'avoir accepté de présider la défense de cette thèse. Je voudrais également remercier les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la recherche et à l'obtention des financements de ma thèse, **Thierry Gautier, Kiran Padmanabhan, Jan Bednar, Stefan Dimitrov et Pierre Hainaut**.

Je souhaite adresser mes remerciements à mes collègues de l'équipe « Chromatine et Épigénétique » qui ont rendu mon quotidien et mon travail plus agréable et surmontable, dans les bons comme dans les mauvais moments. À tous les membres actuels et anciens membres de l'équipe, Geneviève Chevalier, Emeline Fontaine, Daniel Bouvard, Defne Dalkara, Mohamed Graiess, Thierry Gautier, Jan Bednar, Marc Block, Anne-Sophie Ribba, Kiran Padmanabhan, Véronique Gerson, merci d'avoir contribué, chacun à votre façon, à l'avancement de ma thèse. Un merci tout particulier à Geneviève qui m'a grandement aidé avec la gestion des animaux et l'expérimentation animale, avec qui j'ai beaucoup appris. Geneviève, j'ai énormément appris avec toi, que ce soit sur le plan personnel mais également sur le plan scientifique. Je te remercie pour les cafés du matin, les restaurants à midi et nos discussions sur nos vies. Tu as été mon petit rayon de soleil, ma confidente, ma deuxième « maman » comme je dis souvent et une vraie amie.

J'adresse un chaleureux remerciement au **Pr. Danielle Dhouailly.** Danielle, vous avez été d'un soutien scientifique incommensurable. Vous avez suivi mon projet depuis le début et je ne vous remercierai jamais assez pour tout le temps que vous m'avez accordé. Autre que l'aide scientifique, je vous remercie pour votre gentillesse, vos encouragements et pour nos discussions tellement intéressantes.

Je remercie également très chaleureusement mon mentor, mon « Maître Yoda », mon ami, le **Dr. Yohan Roulland**. Je te remercie de m'avoir encadré et formé pendant mes débuts, en master 1 et master 2, de m'avoir si bien préparé et encouragé pour pouvoir commencer cette nouvelle aventure de la thèse de la manière la plus autonome possible. Je profite également pour remercier tous mes amis rencontrés à l'institut, **Dr. Hiba, Dr. Aysegul, Noémie, Dr. Mathieu, Dr. Matteo, Dr. Alexander, Dr. Azadeh, Naghmeh, Dr. Anne-So, Dr. Lauralie, Dr. Chérine, <b>Dr. Adèle, Dr. Jonh, Dr. Sivan, Dr. Jess et tous les autres que j'ai oubliés**. Merci pour tous nos bons moments, les weekends de rando, les bbq, les soirées, les apéros, les cinés, les pauses café et les rêves partagés. Je vous souhaite à toutes et à tous le meilleur pour la suite.

Je remercie mes amis de La Rochelle, Anouck, Pierre, Nico, Skander et Joffrey ; à mon petit groupe des danseurs Grenoblois, Styv, Alice, Laora, Vincent, Charlotte, Allan, Alexandra, Stef, Brigitte, Anne-Claire, David, Sami, et Virginie ; mes amis lyonnais Lucas, Mathieu, Arnaud, Lycia, Sarah et Margot. Merci à tous de m'avoir soutenue, encouragée, remonté le moral, payé des verres, proposé une danse, partagé une bonne rigolade... Merci pour les bons moments partagés que ce soit en weekend, en vacances, en soirée, qui m'ont permis de m'évader et de souffler. Un remerciement des plus spéciaux à mes deux meilleures amies, le Dr. Marine et Anaïs, présentes dans ma vie depuis de nombreuses années maintenant. Je vous remercie de m'avoir donné la force pour continuer et d'être là, tout simplement, vous êtes les meilleures. Je remercie également mon chéri, Chris, sans qui cette dernière année n'aurait clairement pas eu le même goût. Je te remercie pour ta bonne humeur, ton calme, ta bienveillance, ta tendresse et ton amour.

Enfin, j'adresse mes remerciements à ma famille, à mon grand-père **Robert Bolcato et Marie-Jo Sugny**, à mon frère **Miguel Ramos** et plus particulièrement à mes parents **Florence Bolcato** et **Paulo Ramos** pour votre soutien infaillible. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre investissement et vos encouragements. Merci de m'avoir inculqué vos valeurs, de m'avoir toujours tiré vers le haut et d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

Merci pour tout,

Lorrie

## **RESUME**

L'histone variante H2A.Z, histone de la famille H2A est enrichie dans certaines régions non transcrites de la chromatine, telles que la chromatine péricentromérique, centromérique et télomérique. Elle existe sous la forme de deux isoformes, H2A.Z-1 et H2A.Z-2, qui diffèrent par seulement 3 acides aminés et sont codés par deux gènes distincts, H2afz et H2afv. L'histone H2A.Z apparait impliquée dans divers évènements cellulaires tels que la transcription, la réparation de l'ADN ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaire. La fonction de H2A.Z a été, jusqu'ici, analysée surtout grâce à la culture cellulaire *in-vitro*. Peu d'informations sont disponibles concernant le rôle de H2A.Z *in-vivo* dans différents organes, reflétant le manque de modèles animaux permettant l'invalidation génique de H2A.Z. Nous avons créé un modèle de souris transgénique permettant de réaliser *in-vivo* le double knock-out conditionnel (KI/cKO) des gènes H2afz et H2afv de manière tissu-spécifique dans les kératinocytes de la peau. Ce modèle d'étude *in-vivo* est unique car le seul à ce jour permettant d'éliminer complètement l'expression de H2A.Z. L'histone variante est physiologiquement présente dans toutes les cellules *wild-type*. Si les deux gènes codant pour H2A.Z sont délétés, la concentration de l'histone diminue au fur et à mesure des mitoses successives et finit par disparaître.

L'épiderme en constante prolifération (tissu mitotique) mais aussi en constante différenciation (tissu post-mitotique), ainsi que le follicule pileux où ces deux processus intervenent de manière cyclique lors de la formation du poil, constituent un excellent modèle afin de disséquer le rôle spécifique de H2A.Z dans les processus de prolifération et de différenciation.

L'induction par le tamoxifène du transgène K14CreER<sup>T2</sup> invalidant les gènes H2A.Z (H2afz et H2afv) dans les kératinocytes, a tout d'abord été réalisée chez la souris adulte âgée de 6-8 mois. Elle entraine progressivement la perte totale de l'histone variante H2A.Z dans les cellules d'amplification transitoire (TA) qui se multiplient activement : au niveau du follicule pileux en phase de croissance (anagène) et au niveau des cellules situées de place en place au niveau de l'assise basale de l'épiderme. Le blocage en phase G2/M de ces cellules, perturbe l'homéostasie de la peau et appelle en retour une migration des cellules souches du follicule pileux vers l'épiderme, entrainant un épaississement de l'épiderme et une alopécie dans la région ventrale thoracique.

Lors de la mise en place de la peau embryonnaire la délétion des deux gènes H2afz et H2afv, par l'induction du transgène K14CreER<sup>T2</sup> suite à l'injection de tamoxifène ou l'utilisation du

transgène K5Cre dont l'activité est constitutive, entraine la perte progressive de l'histone H2A.Z dans toutes les cellules épidermiques et les cellules des bourgeons pileux, qui toutes ont un fort indice de prolifération. La perte de H2A.Z entrainant le blocage des cellules en phase G2/M, ces cellules se différencient et s'accumulent dans la couche cornée.

En conclusion, les différents phénotypes développés après le knock-out de H2A.Z dans les kératinocytes chez l'adulte ainsi qu'au cours de l'embryogénèse de la peau, nous ont permis de montrer l'implication de H2A.Z dans la progression de la mitose, et par la même directement son implication dans la régulation de l'homéostasie de l'épiderme.

## **ABSTRACT**

Histone variant H2A.Z replaces the canonical histone H2A and is particularly enriched at non-transcribed chromatin regions as pericentromeric, centromeric and telomeric. Histone variant H2A.Z exists in two isoforms H2A.Z-1 and H2A.Z-2 coded by 2 distinct genes, H2afz and H2afv, that differ only by 3 amino acids. H2A.Z seems to be involved in several cellular events as transcription, DNA repair as well as proliferation and cellular differentiation. The function of H2A.Z has been, until now, mostly studied by the *in-vitro* cell culture. Few data are available concerning the role of H2A.Z *in-vivo*, regarding different organs, reflecting the lack of animal models to follow the genetic invalidation of H2A.Z are deleted, its concentration decreases progressively with succeeding mitosis until it disappeared.

We have created a new and unique transgenic mouse model enabling to achieve, *in-vivo*, a double conditional knock-out of H2afz and H2afv genes, in a specific tissue, the skin epidermis. Constantly proliferating (mitotic tissue) and differentiating (post-mitotic tissue), the epidermis and hair follicles are excellent models to address the role of H2A.Z in cell proliferation and differentiation.

In adult 6-8 months mice, the induction of the transgene K14CreER<sup>T2</sup> by tamoxifen invalidates H2A.Z genes (H2afz and H2afv) and leads to the progressive loss of H2A.Z in transient amplifying cells (TA) that actively proliferate: in growing hair follicles (anagen) and in epidermal basal layer. The blocking of cells in G2/M phase, affects skin homeostasis calling in return the migration of stem cells from the hair follicle and epidermis, resulting in further epidermis thickening and alopecia of ventral thoracic regions.

During skin embryogenesis, the deletion of both H2A.Z genes, activating K14CreER<sup>T2</sup> transgene by tamoxifen or by using the constitutively activated K5Cre transgene, leads to a progressive loss of histone variant H2A.Z in all epidermal cells and hair bud cells, which both have a high proliferation index. The loss of H2A.Z results in cell block in G2/M phase, leads to cell differentiation and finally a build-up of dead skin cells in corneum layer.

To conclude skin phenotypes obtained H2A.Z knock-out in the adult or during skin embryogenesis, show that H2A.Z plays an essential role in mitosis and appears directly involved in the regulation of epidermis homeostasis.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

ADN : Acide désoxyribonucléique	<b>CG</b> : Couche granuleuse
ARN: Acide ribonucléique	CG : Gaine conjonctive
ARNm : Acode ribonucléique messager	CHD: (Chromodomain-Helicase-DNA
ASF-1 : Facteur d'assemblage du	binding)
nucleosome (Anti-silencing factor 1)	cKO: Invalidation conditionnelle d'un
ASGs: Glande suroripare apocrine	gène
(apocrin sweat gland)	CTD: Domaine carboxy terminal
ATP : Adénosine-TriphosPhate	(Carboxy terminal domain)
ATPases : Adénosine-TriphosPhate	CTs: Territoires chromosomiques
hydrolase	(Chromosome territories)
<b>Bb</b> : Bulbe du follicule pileux	<b>D</b> : Derme
<b>Bg</b> : Bulge du follicule pileux	d : Desmosomes
<b>BM</b> : Membrane basale (Basal	DAXX : (Death-domain associated
membrane)	protein 6)
BMP : Protéine osseuse morphogénétique	<b>DP</b> : Papille dermique ( <i>dermal papilla</i> )
(bone morphogenetic protein)	E : Epiderme
C-ter : Domaine carboxy (COOH)-	<b>EBS</b> : Epidermoyse buleuse simple
terminal	EGF : Facteur de croissance épidermique
CAF-1 : Facteur-1 d'assemblage de la	(Epidermal growth factor)
chromatine (Chromatin Assembly Factor)	ESCs : Cellules souches embryonnaires
<b>CATD</b> : Domaine de ciblage de CENP-A	(Embryonnic Stem Cells)
(CENP-A targeting domain)	eSCs: Cellules souches epithéliales
<b>CB</b> : Couche basale	(Epithelial Stem Cells)
CC : Couche cornée	ESGs : Glande sudoripare eccrine (eccrin
CCAN : Réseau protéique constituant le	sweat gland)
centromère (Constitutive Centromere-	FACT (Facilitates Chromatin
Associated Network)	Transcription)
<b>CD</b> : Domaine central ( <i>Central domain</i> )	<b>Fb</b> : Fibroblastes
CE : Couche épineuse	FGF: Facteur de croissance de
CENP-A : Protéine A centromérique	fibroblaste (Fibroblast growth factor)
(Centromeric protein A)	

GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale	Kb : Kilobases
(Glial fibrillary acidic protein)	KDa : Kilo-Dalton
GTPases : Guanosine triphosphate	Kh : Granules de Kératohyaline
hydrolase	KI: knock-in, introduction d'une gène
HAT : histones acétyl-transférases	d'intérêt sur un locus par recombinaison
Hd : Hémidesmosomes	homologue
HDAC : Histones désacétylases	LIF : (Leukemia inhibitory factor)
<b>HF</b> : Follicule pileux	<b>m</b> : Mitochrondrie
HFD : Domaine de repliement du de	<b>MEC</b> : Matrice extracellulaire
l'histone (Histone fold domain)	MEFs: Fibroblastes embryonnaires de
HFSCs: Cellules souches du follicule	souris (Mouse embryonic fibroblastes)
pileux (Hair Follicule Stem Cells)	<b>mESCs</b> : Cellules souches embryonnaires
HIRA: (HIstone Regulator A)	de souris (mouse embryonic stem cells)
HJURP: (Holliday Junction Recognition	Mi-2/NuRD: (Nucleosome Remodeling
Protein)	Deacetylase)
HKE : Hyperkeratose épidermolitique	Mx : Matrice (Matrix)
HMT : Méthyltransférases	<b>n</b> : Noyau
<b>HP1</b> : (Heterochromatin protein 1)	N-ter : Domaine Amino (NH2) -terminal
HS : Tige du poil	NAP-1 : Protéine-1 d'assemblage du
<b>IFE</b> : Epiderme interfolliculaire	nucléosome (Nucleosome Assembly Protein 1)
(Interfollicular epidermis)	NCP : Particule de Coeur du nucleosome
IFs : Filaments intermédiaires	(Nucleosome core particle)
(Intermediate filaments)	<b>NF</b> : Neurofilaments
<b>IGF</b> : Facteur de croissance 1 ( <i>Insulin-like</i>	NFR : Régions sans nucléosomes
growth factor)	(Nucleosome free region)
<b>INCENP</b> : Protéine du centromère interne	NMF : Facteurs naturels d'hydratation
(Inner centromere protein)	(Natural moisturing factors)
INO80: (INOsitol requiering 80-SWItch	<b>ORS</b> : Gaine folliculaire externe
related complex 1)	<b>Pb</b> : Paires de bases
<b>IRS</b> : Gaine folliculaire interne	PC : Pachyonychie congénitale
<b>ISWI</b> : (Imitation SWItch)	<b>PCA</b> : Pyrrolidone carboxylique
JDE : Jonction dermo-épidermique	<b>PPK</b> : Kératodermie épidermolytique
K : Kératinocytes	palmo-plantaire
K ou Krt : fibre de kératine	

**PSU** : Unité pilo-sébacée (pilosebaceous unit)

PTMs :Modificationspost-traductionnelles(Post-Translational)

Modifications)

SCs : Cellules Souches (Stem Cells)

**SGs**: Glandes sébacées (Sebaceous Glands)

siRNA (Small interfering RNA)

SLBP: (Stem loop binding protein)

**TA** : Cellules d'Amplification Transitoire (Transit Amplifying Cells)

**TGF-β** : Facteur de croissance transformant (*Transforming growth factor*)

**TSS** : Site d'initiation de transcription (*Transcription Starting Sites*)

UCA : Acide urocanique

UTR: Régions non transcrites

(Untranslated regions)

UV : Rayons Ultra-Violets

Wnt : (wingless-type integration site familly)

# **LISTE DES FIGURES**

Figure I.1–1- Le nucléosome : unité structurale de base de la chromatine.	.28
Figure I.1–2- Structure générale des histones de cœur	.30
Figure I.1–3- Structure de la particule de cœur du nucléosome.	.31
Figure I.1–4- Étude de l'interaction des domaines globulaire et C-terminal de l'histone H1 (H1.0)	.31
Figure I.1–5 - Représentation schématique du nucléosome et des histones de cœur	.34
Figure I.1–6 - Représentation schématique des séquences protéiques des histones de cœur conventionnelles et variantes.	.34
Figure I.1–7 - Représentation des différentes sous-parties du nucléosome.	.36
Figure I.1–8 - Les différents niveaux de compaction de la molécule d'ADN	.37
Figure I.1–9 - Les différentes phases du cycle cellulaire.	.41
Figure I.1–10 - Les différentes phases de la mitose	.41
Figure I.1–11 - Phosphorylation de la Ser10 de l'histone H3 pendant la progression du cycle cellulaire.	e .43
Figure I.1–12 – Chaque chromosome est arrangé en territoires chromosomiques au sein du noyau.	.44
Figure I.1–13 - Structure générale de la sous-unité ATPase des quatre différentes classes de facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants	.47
Figure I.1–14 - Différences majeures structurales entre les nucléosomes H2A.Z et H2A	.56
Figure I.1–15 - Les deux isoformes de l'histone variante H2A.Z, H2A.Z-1 et H2A.Z-2	.58
Figure I.1–16 - Schéma de l'organisation générale de la chromatine centromérique et péricentromérique chez l'homme	.63
Figure I.1–17 – Modèle d'organisation structurale d'un kinétochore chez les vertébrés	.65
Figure I.2–1- Structure anatomique de la peau et de ses dérivés	.68
Figure I.2–2 - Principales différences entre l'épiderme dorsal humain (a) et l'épiderme dors murin (b,c) chez l'adulte	al .70
Figure I.2–3 - Composition cellulaire de l'épiderme.	.72
Figure I.2–4 – L'unité pilosébacée se compose d'un follicule pileux et de deux glandes sébacées.	.75
Figure I.2–5 - Peau de souris montrant un follicule pileux au stade anagène du cycle du poil	l. .76

Figure I.2–6- Les filaments intermédiaires de kératine sont impliqués dans le maintien des adhésions cellulaires
Figure I.2–7 - Caractérisation de la différenciation terminale de l'épiderme
Figure I.2–8 - Développement de la peau dorsale de l'embryon de souris (Liu et al., 2013)85
Figure I.2–9 - La formation du follicule pileux au cours de l'embryogénèse, de la placode jusqu'à l'unité pilosébacée
Figure I.2–10 – Après le développement du premier follicule pileux, au cours de l'embryogénèse, la croissance du poil, chez l'adulte, est cyclique
Figure I.2–11 – Les cellules souches résidentes et les cellules d'amplification transitoire (TA) de l'épiderme et du follicule pileux
Figure I.2–12 – Suivi de la propagation des vagues de régénération du follicule pileux sur la peau ventrale d'une souris adulte, pendant 93 jours (Plikus and Chuong, 2008)
Figure I.2–13 - Émergence des différentes populations de cellules souches au cours du développement de l'unité pilo-sébacée
Figure I.2–14 - Localisation de l'expression du marqueur membranaire CD34 et de la kératine 15 dans les follicules pileux murins
Figure I.2–15 - Caractéristiques moléculaires d'une peau humaine psoriasique
Figure III.1–1- Représentation schématique des constructions génétiques des souris génétiquement modifiées (H2afz <sup>fl/fl</sup> et H2afv <sup>fl/fl</sup> ). Les souris cKO pour les gènes H2afz et H2Afv ont été créées en insérant deux séquences loxP de part et d'autre des exons 2-4 et 4-5 des gènes H2afz et H2afv. L'invalidation génétique des gènes H2afz et H2afv est obtenue suite à l'expression de la Recombinase-Cre. Celle-ci reconnait ses sites spécifiques loxP et excise les séquences d'ADN flanquées
Figure III.3–1 - Méthode de séparation du derme et de l'épiderme d'une souris phénotypée de 8 jours
Figure IV.2–1- Représentation schématique de la construction génétique des lignées de souris génétiquement modifiées (H2afz <sup>fl/fl</sup> , H2afv <sup>fl/fl</sup> , K14Cre)
Figure IV.2–2 – Le modèle de souris contrôle H2A.Z-1, H2A.Z-2, K5Cre, mTmG
Figure IV.2–3 – Contrôle de la spécificité de l'activité de la Recombinase-Cre constitutive au niveau de la couche basale
Figure IV.3–1 – Résultat de l'invalidation génétique <i>in-vivo</i> des deux gènes, H2afz et H2afv, codant pour l'expression des histones variantes H2A.Z-1 et H2A.Z-2
Figure IV.3–2 – L'invalidation des gènes H2afz et H2afv provoque une hyperplasie de l'épiderme chez les souris KO
Figure IV.3–3 – Observation par microscopie électronique à transmission de l'épiderme hyperplasique des souris KO pour H2A.Z

Figure IV.3–4 – Observation par microscopie électronique de la structure de l'épiderme thoracique ventral et des kératinocytes basaux, 21 jours après la première injection de tamoxifène
Figure IV.3–5 – Les kératinocytes dépourvus de protéine H2A.Z se trouvent localisés dans quelques niches de l'épiderme interfolliculaire et sont principalement localisés au niveau des follicules pileux
Figure IV.3–6 – Expression des marqueurs de différenciation spécifiques des couches épineuse et granuleuse de l'épiderme dans la peau de souris témoin et de souris KO pour H2A.Z
Figure IV.3–7 – Expression des marqueurs d'hyperprolifération dans la peau de souris témoin et de souris KO pour H2A.Z
Figure IV.3–8- Impact de l'invalidation génétique de H2afz et H2afv sur la capacité mitotique des kératinocytes basaux de l'épiderme
Figure IV.3–9 – Expression de H2A.Z et de Sox9 dans l'épiderme de souris adulte après le KO de H2A.Z
Figure IV.3–10 – Comparaison de l'expression des marqueurs caractéristiques des cellules souches épidermiques et folliculaires, CD34 et K15, après le KO de H2A.Z150
Figure IV.4–1 – Confirmation du knock-out de H2A.Z dans les kératinocytes basaux embryonnaires à E.17.5
Figure IV.4–2 – Résultat de l'invalidation génétique <i>in-vivo</i> des deux gènes, H2afz et H2afv, chez souriceaux âgés de 8 et 12 jours
Figure IV.4–3 - Expression des marqueurs de différenciation spécifiques de la couche épineuse et de la couche granuleuse, chez les souriceaux témoins et les souriceaux KO pour H2A.Z effectué au cours de l'embryogénèse
Figure IV.4–4 – Impact de l'absence de H2A.Z sur la capacité des kératinocytes basaux à proliférer chez le souriceau
Figure IV.4–5 – L'invalidation de H2afz et H2afv réalisée au cours de l'embryogénèse persiste après la naissance
Figure IV.4–6 – L'invalidation de H2afz et H2afv, au cours du développement embryonnaire de la peau, n'affecte que très légèrement les cellules souches folliculaires chez le souriceau. 161
Figure IV.4–7 – L'invalidation de H2afz et H2afv, effectuée au cours du développement embryonnaire de la peau, conduit à la perte des cellules souches K15+ au niveau de l'épiderme interfolliculaire chez le souriceau

# **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I.2-1- Différences entre la peau et les glandes annexes de l'homme et la peau de souris adulte, d'après (Sundberg, 2004).	71
Tableau III.1-1- Lignées de souris utilisées en élevage afin de créer les lignées à expérime	nter . 109
Tableau III.2-1 - Liste des amorces utilisées pour le génotypage	.113
Tableau III.2-2 - Programme PCR pour les génotypages des gènes h2azf, H2afv, Cre et mTmG.	.114
Tableau III.3-1 - Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.	.119
Tableau III.3-2 – Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence.	.119

# LISTE DES FIGURES SUPPLEMENTAIRES

Figure S. 1- Spécificité de l'activité du transgène K5Cre au niveau des kératinocytes basaux épidermiques ainsi que des kératinocytes folliculaires chez le souriceau à J12 postnatal182
Figure S. 2 - Comparaison de l'histologie des glandes salivaires des souris témoins et des souris KO pour H2A.Z, 21 jours après la première injection de tamoxifène
Figure S. 3 – L'invalidation des gènes H2afz et H2afv ne perturbe pas le développement de la peau au cours de l'embryogénèse
Figure S. 4- La mise en place de la couche basale de l'épiderme au cours du développement de la peau embryonnaire n'est pas affecté par l'invalidation génique de H2afz et H2afv183
Figure S. 5– L'invalidation génique de H2afz et H2afv au cours du développement de la peau embryonnaire n'affecte pas la mise en place de la couche basale de l'épiderme chez l'embryon à 17.5 jours de gestation
Figure S. 6 – L'invalidation génique de H2afz et H2afv au cours du développement de la peau embryonnaire n'affecte pas la mise en place de la couche basale de l'épiderme chez le souriceau à J8 postnatal
Figure S. 7- L'invalidation génique de H2afz et H2afv au cours du développement de la peau embryonnaire n'affecte la prolifération des kératinocytes basaux ni la mise en place des strates chez le souriceau à J8 postnatal

# **I.Introduction**

# <u>Chapitre I.1</u> La chromatine, une structure en constant remaniement

#### I.1.1 Un point sur l'histoire

Depuis les années 40, les questions concernant la forme sous laquelle se présente le vecteur de l'information génétique et comment se fait la transmission des gènes au cours des générations suscitent un grand intérêt. En 1944, le médecin-chercheur Oswald Avery a identifié l'acide désoxyribonucléique (ADN) chez les bactéries, comme étant la composante des chromosomes et qui donc serait responsable de l'hérédité. À cette époque, la communauté scientifique pensait que les gènes étaient des protéines et que l'hérédité était transmise par cellesci. De ce fait, la constatation du docteur Avery a longtemps été controversée. En 1950 le biochimiste Erwin Chargaff a découvert que la molécule d'ADN était en fait une macromolécule constituée de la succession de quatre types de petites molécules, appelées nucléotides, et se distinguant par leur bases azotées (A : Adénine, T : thymine, C : Cytosine, G : Guanine). Selon le docteur Chargaff, les nucléotides sont connectés les uns aux autres par leur groupement phosphate formant un « collier de perles ». Cependant, la disposition de ces perles et donc la structure de l'ADN, restait encore inconnues.

L'étude de la structure de la molécule d'ADN a débuté grâce à l'utilisation des rayons X. Rosalind Franklin a obtenu en 1951 la première observation de l'ADN visualisé aux rayons X qui montrait une « structure » très régulière en forme de croix. En 1953, James Watson et Francis Crick découvrirent que la structure de la molécule d'ADN était bien plus complexe. Ils ont montré une structure d'ADN en double hélice, formée de deux brins identiques composés de phosphates et de sucres (désoxyriboses) et enroulés l'un autour de l'autre. Entre les deux brins, comme des « barreaux d'échelle », sont disposées les bases azotées A, T, G et C. La succession de ces bases le long de la molécule d'ADN défini l'information, le code génétique. Suite à cette découverte, Francis Crick, James Watson et Maurice Wilkins partageront en 1962 les honneurs du Prix Nobel de médecine.

#### I.1.2 L'organisation structurale de la chromatine

Chez la plupart des organismes et plus particulièrement chez les organismes eucaryotes, l'ADN est le support universel de l'information génétique, l'unité de base de la vie et il doit être fidèlement transmis à la descendance. En effet, notre survie, notre développement ainsi que nos caractéristiques phénotypiques dépendent étroitement de la manière dont l'ADN est organisé à l'intérieur des cellules. Notre héritage génétique est bien plus complexe qu'une simple séquence d'ADN.

La fibre de chromatine a été identifiée par Walther Flemming en 1881, à l'intérieur du noyau, visualisée grâce à la fixation d'un colorant basique, l'aniline. La fibre de chromatine est définie par l'ensemble des nucléotides (ADN, ARN), soit 1/3 des composants, et par un certain nombre de protéines, soit 2/3 des composants. Parmi les protéines constituant la chromatine, environ 50% sont des petites protéines basiques appelées histones et les 50% autres sont des protéines diverses appelées « protéines-non histones ».

L'organisation structurale et spatiale de l'ADN constitue la caractéristique principale de la fibre de chromatine. En effet, elle permet dans un premier temps la compaction de l'ADN dans un faible volume, contenu dans l'espace restreint du noyau ; dans un deuxième temps, sa structure et sa composition permettent de protéger l'ADN contre les dommages mais également de contrôler l'expression des gènes ainsi que la réplication de l'ADN.

## I.1.2.1 Le nucléosome, unité de base de la chromatine

Dans les années 70, des progrès majeurs en biophysique et en microscopie électronique ont conduit à la découverte de l'unité de base de la chromatine, baptisée « nucléosome » en 1975. La digestion partielle de la chromatine par des nucléases micrococcales engendre des petits fragments d'ADN d'environ 200 paires de bases, qui sont visibles par microscopie électronique (Figure I.1–1). Ces petits fragments caractérisent le nucléosome comme étant l'unité de répétition structurale composant la fibre de chromatine (Kornberg, 1974; Olins and Olins, 1974; Oudet et al., 1975). Le nucléosome se compose de deux parties distinctes : la particule de cœur (*Nucleosome Core Particle* ou NCP) autour de laquelle s'enroulent 147 pb d'ADN selon 1,67 tours, puis une région inter-nucléosomale reliant les particules de cœur adjacentes, constitué d'ADN non enroulé, appelé ADN de liaison, et pouvant comporter plus de 80 paires de bases (Figure I.1–7) (Luger et al., 1997).



Figure I.1-1- Le nucléosome : unité structurale de base de la chromatine.

(a) Chromatine isolée en condition ionique faible. Visualisation de la fibre de 10 nm également appelée fibre en « collier de perles ». (b) Mono-nucléosomes isolés après digestion de la chromatine par la nucléase microccocale.
(c) Chromatine isolée en condition ionique modérée, afin de maintenir la fibre de chromatine hautement compactée à 30 nm. Microscopie électronique (Olins and Olins, 2003).

#### I.1.2.2 Les histones

Parmi toutes les protéines composant la chromatine, environ 50% sont des histones. Ce sont des petites protéines basiques, riches en résidus lysine et arginine. La famille des histones se compose de deux types principaux répartis en 5 familles, les histones de cœur (H2A, H2B, H3 et H4) d'une taille comprise entre 11 et 16 KDa, et les histones de liaison (H1) d'environ 24 KDa.

### I.1.2.2.1 Les histones de cœur

Quatre histones de cœur (H2A, H2B, H3 et H4) composent l'octamère d'histones au centre de la particule de cœur du nucléosome (Figure I.1–3). Malgré la faible homologie de séquence entre les 4 histones de cœur (Figure I.1–6), elles possèdent des structures secondaires et tertiaires assez similaires. Elles ont globalement toutes une structure secondaire structurée, une longueur comprise entre 100 et 140 acides aminés et une masse molaire comprise entre 11 et 16 KDa (Figure I.1–2, a).

Elles possèdent un domaine central globulaire (*Central Domain* ou CD), flanqué à chaque extrémité par les queues amino-terminale et carboxy-terminale (Figure I.1–2, a). Contrairement au domaine globulaire, les queues N-terminale et C-terminale des histones de cœur sont très divergentes et non structurées (Figure I.1–6). La queue N-terminale est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles (*Post Translational Modifications* ou PTMs) jouant un rôle dans la régulation épigénétique. De façon générale, la queue N-terminale est flexible, est

relativement longue (15 à 45 acides aminés), et contient entre 30-40% de résidus chargés positivement, tels que la lysine et arginine, pour toutes les histones de cœur. La queue C-terminale n'est quant à elle souvent constituée que de quelques résidus (Luger et al., 1997). Les interactions électrostatiques entre les charges positives des queues N-terminales des histones et les charges négatives apportées par les groupements phosphates de l'ADN contribuent à l'organisation globale de l'ADN autour de l'octamère d'histones afin de former le nucléosome (Figure I.1–2, Figure I.1–3, Figure I.1–7) (Luger and Richmond, 1998).

La caractéristique essentielle des histones de cœur est la présence du domaine structuré dit *histone fold-domain* (HFD) (Figure I.1–2, a). Ce domaine est formé par une longue hélice  $\alpha 2$  centrale, puis par deux hélices  $\alpha$  plus petites ( $\alpha 1$  et  $\alpha 3$ ) de chaque côté, auxquelles elle est reliée par deux boucles courtes L1 et L2 (Figure I.1–2, a) (Wang et al., 1994; Luger et al., 1997). Le HFD permet la dimérisation des protéines qui le contiennent, grâce à l'interaction généralement requalifiée de « poignée de main » (Figure I.1–2, b, c). Retrouvé dans un très grand nombre de protéines, et plus particulièrement les histones, ce domaine en « poignée de main » se qualifie de motif *histone-like* (Arents et al., 1991; Arents and Moudrianakis, 1995).

#### I.1.2.2.2 Les histones de liaison

Les histones de la famille H1 ne présentent aucune homologie de séquence avec les histones de cœur. Elles ont une structure à 3 domaines : un domaine central globulaire, d'environ 80 acides aminés, très conservé et structuré par un motif dit *wing-helix*. Ce motif, positionné au centre au niveau de l'ADN entrant et sortant du nucléosome, n'interagit pas avec les histones de cœur. Puis aux extrémités, une queue N-terminale non structurée de 20-35 résidus, et enfin un domaine C-terminal (CTD ou *C-terminal domain*) d'une centaine de résidus (Allan et al., 1980; Zhou et al., 1998).

L'association d'une histone de liaison H1 à la particule de cœur forme le chromatosome (Figure I.1–7) (voir paragraphe I.1.2.3). Le domaine globulaire de l'histone de liaison H1 se lie au niveau des bras d'ADN entrant et sortant du nucléosome (Syed et al., 2010). À cet endroit, il induit le rapprochement des deux bras d'ADN sur une trentaine de paires de bases d'ADN au niveau de l'axe de la dyade du nucléosome. Ce rapprochement limite leur mouvement et verrouille le nucléosome dans une position fermée (Flanagan and Brown, 2016; Bednar et al., 2017). Il permet également d'augmenter le nombre de paires de bases d'ADN protégées de la digestion par la nucléase microccocale, à savoir environ 20 pb en plus des 147 pb déjà protégées par la particule de cœur du nucléosome. Enfin, Stefan Dimitrov et ses collègues ont démontré qu'en plus de la liaison du domaine globulaire de H1 à la dyade de nucléosome et aux deux bras

d'ADN de liaison (entrant et sortant), son domaine C-terminal (*C-terminal domain* ou CTD) s'associe à un seul des bras d'ADN de liaison (Figure I.1–3, Figure I.1–4) (Bednar et al., 2017). Cette dernière interaction perturbe l'axe de symétrie du nucléosome et influence l'assemblage et la conformation de la chromatine d'ordre supérieure.



Figure I.1–2- Structure générale des histones de cœur.

(a) Représentation schématique générale d'une histone de cœur. Les segments en gris indiquent les hélices  $\alpha$  du domaine *histone-fold* (HFD), l'hélice  $\alpha 2$  est séparée des deux autres hélices par les boucles L1 et L2. De part et d'autre du domaine *histone-fold* central se trouvent les queues N-terminale et C-terminale. (b) Structure tridimensionnelle du domaine *histone-fold* de l'histone H3 et H2A humains. (c) Les domaines *histone-fold* interagissent selon un motif de « poignée de main » qui permet la dimérisation des histones, ici est représenté le dimère H3-H4 et H2A-H2B. Structure obtenue à partir du fichier PDB ID : 1AOI.



Figure I.1–3- Structure de la particule de cœur du nucléosome.

Cette structure a été résolue par cristallographie aux rayons X(Luger et al., 1997). Le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> s'associe avec deux dimères (H2A-H2B) formant l'octamère d'histones, autour duquel s'enroulent 147 paires de bases d'ADN formant le nucléosome. Structure obtenue à partir du fichier PDB ID : 1AOI.



Figure I.1-4- Étude de l'interaction des domaines globulaire et C-terminal de l'histone H1 (H1.0).

(a) Microscopie cryo-électronique de la particule de cœur du nucléosome et de l'ADN de liaison superposés avec la reconstruction 3D du nucléosome 601-H1.0. Le domaine globulaire de H1 est localisé sur l'axe de la dyade (flèche rouge) et interagit avec l'ADN entourant la particule de cœur ainsi que l'ADN de liaison entrant et sortant du nucléosome. (b) Cartographie de la différence de densité entre le nucléosome avec H1 et le nucléosome sans H1 (en rouge) (Bednar et al., 2017).

## I.1.2.2.3 Les histones canoniques

Les histones peuvent également être classées en deux catégories, en fonction de la phase du cycle cellulaire au cours duquel elles vont être incorporées dans la chromatine. Leur incorporation peut se dérouler au cours de la réplication ou tout au long du cycle cellulaire.

Parmi toutes les histones, les histones dites « canoniques » ou « conventionnelles » sont majoritairement représentées. Par définition, l'expression et l'incorporation des histones canoniques sont couplées à la réplication. Celles-ci sont synthétisées en phase S (Figure I.1–9) et immédiatement incorporées dans la nouvelle molécule d'ADN synthétisée. Leur incorporation dans la chromatine est réalisée par l'intermédiaire de protéines spécialisées appelées chaperonnes (voir paragraphe I.1.4.2). De cette façon, l'assemblage de la chromatine se fait en grande partie lors de la réplication. Le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> s'associe d'abord à l'ADN, suivi ensuite de chacun des dimères (H2A-H2B) puis de l'histone de liaison H1 (Figure I.1–4).

Les gènes codant pour les histones canoniques ont une structure particulière : ils sont présents en multiples copies organisés en tandem. Chez l'homme, HIST1 est le plus long des tandems de gènes codant pour les histones. Situé sur le chromosome 6, il contient 55 gènes. Puis, deux tandems plus courts sur le chromosome 1, HIST2 et HIST3 qui codent pour 6 et 3 gènes respectivement. Enfin, le gène codant pour l'histone H4 se situe sur le chromosome 12. Ce mode d'organisation en tandem est retrouvé chez d'autres espèces, dont la souris (Marzluff et al., 2002). Chaque protéine histone est codée par 10 à 20 gènes différents et chacun de ces gènes code pour une séquence d'ARN messager (ARNm) unique. En effet, en plus de gènes particuliers, les histones canoniques possèdent également des ARNm particuliers. Tout d'abord, les ARNm transcrits depuis ces gènes ne possèdent pas d'introns. De plus, parmi tous les ARNm eucaryotes ils sont les seuls à ne pas posséder de queue poly-adénylée (poly-A) à l'extrémité 3'. Au lieu de cela, la séquence nucléotidique se termine par une structure en « tige-boucle » dont la séquence est fortement conservée entre les espèces. Cette structure en « tige-boucle » est reconnue par une protéine spécifique appelée Stem-Loop Binding Protein (SLBP) qui permet la régulation de la stabilité des ARNm en induisant une dégradation des histones canoniques dépendante du cycle cellulaire (Pandey and Marzluff, 1987). Cette différence majeure additionnée avec l'ensemble de régulations traductionnelles et post-traductionnelles spécifiques permet d'expliquer comment, lors de la réplication, la cellule est capable de produire une si grande quantité d'histones tout en évitant leur toxicité (Marzluff et al., 2002).

### I.1.2.2.4 Les histones variantes

En opposition aux histones canoniques, dépendantes du cycle cellulaire, il existe une autre classe d'histones appelée histones « variantes » ou histones de « remplacement ». Alors que l'incorporation des histones canoniques se fait seulement au cours de la phase S de réplication, les histones variantes sont synthétisées et incorporées tout au long du cycle cellulaire. Certaines histones variantes possèdent des chaperonnes qui leur sont spécifiques et permettent leur incorporation ou éviction du nucléosome. Ces évènements sont finement régulés au cours du développement et leur expression dépend du tissu et/ou du stade de développement dans lequel se trouve la cellule.

Contrairement aux histones canoniques, les gènes codant chaque histone variante sont présents en seulement une ou deux copies réparties dans l'ensemble du génome. De plus, ils possèdent tous au moins un intron, une queue poly-adénylée et ont souvent des régions non traduites 5' et 3'UTR (*UnTranslated Regions*) longues (Marzluff et al., 2002).

Les histones variantes sont capables de remplacer les histones canoniques correspondantes, dans la particule de cœur du nucléosome, ce qui confère au « nucléosome variant » de nouvelles propriétés structurales et fonctionnelles (Figure I.1–5). En effet, le remplacement d'une histone canonique par une de ses variantes va modifier la structure nucléoprotéique de la chromatine en altérant les interactions ADN-protéines ou protéines-protéines (Maze et al., 2014). Les propriétés structurales et fonctionnelles des histones variantes seront détaillées dans le paragraphe I.1.5.



Figure I.1-5 - Représentation schématique du nucléosome et des histones de cœur.

Les quatre familles d'histones sont représentées par un code couleur (H2A en jaune ; H2B en rouge, H3 en vert, H4 en bleu et H1 en violet). Chacune des histones conventionnelles possède des variantes, à l'exception de l'histone H4 qui ne possède pas de variante connue à ce jour.



Figure I.1-6 - Représentation schématique des séquences protéiques des histones de cœur conventionnelles et variantes.

Les quatre familles d'histones et leurs variantes sont classées par code couleur (H2A en jaune ; H2B en rouge, H3 bleu et H4 en vert). Les lignes noires représentent les queues N-terminales non structurées. Les acides aminés représentés montrent les différences majeures entre la séquence protéine de l'histone canonique et ses variantes. Plus la couleur est claire et plus l'histone variante diverge de son histone canonique (Maze et al., 2014).

#### I.1.2.3 La particule de cœur du nucléosome et le chromatosome

Comme mentionné en I.1.2.2.1, la particule de cœur du nucléosome est constituée par l'assemblage de 2 copies de chaque histone formant un octamère. Tout d'abord, par l'intermédiaire de leurs HFD les histones de cœur vont former deux dimères (H2A-H2B) et un tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> (Figure I.1–2, c, Figure I.1–3). Afin de former les dimères H3-H4, les boucles L1 de H3 et L2 de H4 vont s'associer de sorte à créer 3 liaisons hydrogène chacune en feuillets  $\beta$ . Le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> se forme par l'intermédiaire de l'interaction entre les deux hélices  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3 des deux histones H3, *four-helix bundle*, ainsi que par des liaisons hydrophobes. Puis chaque dimère H2A-H2B va s'associer séparément au tétramère via une interaction entre les deux hélices  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3, *four-helix bundle*, appartenant respectivement aux histones H2B et H4 (Figure I.1–3) (Luger et al., 1997; Andrews and Luger, 2011). Une deuxième interaction se forme entre le domaine d'ancrage de H2A (*docking domain*) et l'autre moitié du tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> (Figure I.1–3).

Les interactions en « poignée de main » entre chaque paire d'histones provoquent la formation de liaisons hydrogène  $\beta$  entre les boucles L1 et L2 (Figure I.1–3). Celles-ci constituent une partie des sites de liaison à l'ADN. L'interaction entre le nucléosome et l'ADN se fait majoritairement par l'intermédiaire de l'insertion des chaines latérales des résidus Arginine dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN. Les queues N-terminales des histones de cœurs dépassant de l'ensemble du nucléosome (Figure I.1–3) vont également pouvoir interagir avec l'ADN ou d'autres protéines en fonction de leurs caractéristiques électrostatiques.

L'ensemble constitué de la particule de cœur, de l'histone de liaison et de 166 pb d'ADN de liaison forme le chromatosome (Figure I.1–7) (van Holde and Zlatanova, 1999). Bien qu'il soit souvent utilisé pour désigner la particule de cœur, le nucléosome est bel et bien défini comme l'ensemble particule de cœur et ADN de liaison. Les histones de liaison de la famille H1 s'associent aux nucléosomes afin de promouvoir la formation d'une fibre de chromatine dont la compaction est d'ordre supérieure. Ils constituent un facteur clé de l'enchainement correcte des nucléosomes ainsi que du repliement et du maintien de la conformation hautement compactée de la fibre de 30 nm (Woodcock et al., 2006).


Figure I.1-7 - Représentation des différentes sous-parties du nucléosome.

La particule de cœur est formée par l'octamère d'histones (2x ([H2A (jaune), H2B (rouge), H3 (vert), H4 (bleu)]) autour duquel s'enroulent environ 147 paires de bases d'ADN. Le chromatosome est formé par l'association de la particule de cœur avec une histone de liaison (GH5) (rose) (PDB ID 4QLC) (Zhou et al., 1998, 2015).

# I.1.2.4 Organisation d'ordre supérieure de la chromatine

# I.1.2.4.1 La fibre de 10 nm

L'ADN s'associe aux histones de cœur pour former les nucléosomes puis la chromatine adopte différents niveaux d'organisation supérieure, du moins compactée au plus compactée : structure primaire, secondaire et tertiaire (Woodcock and Dimitrov, 2001). Lors du premier niveau d'organisation de la chromatine, les nucléosomes sont reliés les uns aux autres par des petits fragments d'ADN de liaison (15-80 pb). Cette compaction est 6 fois plus importante que celle de l'ADN nu et résulte en une fibre de 10 nm de diamètre, aussi appelée « collier de perles », également appelé « nucléofilament » (Figure I.1–1, a, Figure I.1–8) (Olins and Olins, 1974, 2003). Dans des conditions physiologiques, les nucléosomes se présentent rarement sous cette forme « relâchée » en nucléofilament. Ces derniers vont plutôt se compacter davantage de sorte à former des structures d'ordre supérieur.



Figure I.1-8 - Les différents niveaux de compaction de la molécule d'ADN.

La double hélice d'ADN s'enroule autour des nucléosomes afin de former le premier niveau de compaction de la fibre de chromatine qu'est le nucléofilament ou fibre de chromatine de 10 nm. Le surenroulement s'accentue en passant par la fibre de chromatine de 30nm jusqu'au niveau de compaction le plus élevé qu'est le chromosome mitotique. Adapté de (Felsenfeld and Groudine, 2003).

# I.1.2.4.2 La fibre de 30nm

Le second niveau de compaction consiste en un repliement hélicoïdal du nucléofilament qui aboutit à une structure de 30 nm de diamètre. Les histones de liaison H1 sont un facteur clé déterminant la succession de nucléosomes formant la fibre de 10 nm (Woodcock et al., 2006) et sont cruciaux également pour la maintenance de la fibre de 30 nm, ainsi que des structures de chromatine d'ordre supérieur. Les histones de liaison H1 stabilisent cette structure et multiplient d'environ 50 fois la compaction de la chromatine (Figure I.1–1, c, Figure I.1–8) (Carruthers et al., 1998; Robinson et al., 2006). Cependant, l'architecture de cette fibre de 30 nm est très irrégulière et différentes théories permettant de la décrire ont fait l'objet de nombreuses controverses pendant plus de 20 ans. Le débat n'était pas focalisé sur la structure de la particule de cœur du nucléosome, qui avait déjà été résolue (Moudrianakis and Arents, 1993; Luger et al., 1997), mais sur l'arrangement et les interactions tridimensionnelles entre la particule de cœur du nucléosome, l'ADN de liaison et l'histone de liaison H1 (Figure I.1–4) (Bednar et al., 1995; Tremethick, 2007). Par la suite, il a été démontré que différents modèles de liaisons entre les complexes « nucléosome-histone de liaison » coexistent en fonction de l'environnement nucléosomal. L'architecture de la chromatine est sensible à un grand nombre de facteurs internes

et externes comme la longueur de l'ADN de liaison (internucléosomal) (Zhou et al., 2016), le type d'histone de liaison (Zhou et al., 2013, 2015; Song et al., 2014), la présence d'histones variantes, la présence de modifications post-traductionnelles, les conditions ioniques ou d'interaction avec d'autres protéines chromatiniennes (Li and Reinberg, 2011).

Les derniers travaux publiés par Stefan Dimitrov et ses collègues ont porté sur la structure cristallographique d'une succession de 6 nucléosomes en présence des histones de liaison H1(Garcia-Saez et al., 2018). Les données de microscopie cryo-éléctronique confirment que l'enchainement de 6 nucléosomes adopte une conformation en « échelle ». Cependant, lors de changements de force ionique *in-vitro*, la structure de la chromatine change de conformation pour adopter une conformation torsadée plus compacte, c'est la fibre de 30 nm. Ces résultats confirment l'hypothèse de la diversité de structures formées par un enchainement de nucléosomes et donnent un aperçu de la plasticité de conformation que peut adopter la chromatine suivant le contexte dans lequel elle se trouve (Garcia-Saez et al., 2018).

Le repliement de la fibre de chromatine peut encore augmenter jusqu'à atteindre le niveau de compaction maximal de la chromatine en interphase, appelée euchromatine, avec un facteur de compaction de 1000, ou le chromosome mitotique qui atteint un facteur de compaction de 10,000. L'hétérochromatine maintient généralement un niveau de compaction de 10,000 pendant l'interphase et la mitose. La fibre de 30 nm forme de grandes boucles ancrées sur un squelette protéique. Des domaines sous-chromosomiques peuvent ainsi être détectés en interphase. Ces boucles de chromatine sont organisées par les protéines condensines pour atteindre, au cours de la mitose, le niveau maximal de compaction qui est représenté par le chromosome mitotique (Figure I.1–8).

## I.1.3 Organisation fonctionnelle de la chromatine

# I.1.3.1 Le chromosome mitotique eucaryote

Lors de la mitose, la chromatine se réorganise jusqu'à atteindre le degré maximal de compaction qui est le chromosome mitotique typiquement représenté par un « X ». À cet instant, le chromosome est formé de deux chromatides sœurs identiques réunies par le centromère. Afin que l'information génétique soit correctement transmise à la descendance, les chromosomes doivent être répliqués, et l'ADN doublé doit être équitablement séparé et réparti dans les deux nouvelles cellules tout en évitant les dommages. Ces différents processus sont finement contrôlés par trois éléments spécifiques du chromosome.

Tout d'abord, le chromosome possède de nombreuses origines de réplications. Celles-ci permettent à l'ADN d'être plus rapidement répliqué pendant la phase S du cycle cellulaire. Les deux chromatides sœurs sont maintenues à proximité l'une de l'autre par de petites protéines appelées cohésines. De plus, le centromère, est situé spécifiquement au site primaire de constriction du chromosome. Pendant la mitose, les centromères servent de plateforme d'assemblage des kinétochores. Ces derniers permettent de relier les microtubules aux chromatides sœurs et de les séparer en deux cellules filles.

Enfin, aux extrémités de chaque chromatide se trouvent les télomères. Ce sont des régions riches en séquences répétées (TTAGG) et non-codantes, dont le rôle est d'assurer la bonne réplication de l'ADN en protégeant les terminaisons chromosomiques.

Il est important de noter que la structure de la chromatine au sein du chromosome mitotique est un sujet controversé. Cependant, tous les modèles et leurs différentes variations sont basés sur des repliements de la chromatine à un niveau de compaction supérieure à la fibre de 30nm. La compaction de la chromatine sous la forme du chromosome mitotique met en évidence le fait que la chromatine n'est pas une structure figée dans le temps. La réorganisation de la chromatine lui confère des propriétés fonctionnelles permettant notamment la transcription, la réplication ou encore la réparation de l'ADN. Ce dynamisme est en partie dû à l'activité de facteurs de remodelage de la chromatine, à l'ajout de modifications post-traductionnelles (*Post-translational modifications* PTMs) sur les histones, mais également à l'incorporation de histones variantes au sein de la particule de cœur du nucléosome (voir section I.1.4).

#### I.1.3.2 Le cycle cellulaire

Deux évènements caractérisent le cycle cellulaire : la phase de croissance ou interphase, au cours de laquelle l'information génétique et les organites de la cellule mère sont répliqués, et la phase de division cellulaire ou mitose, pendant laquelle le matériel génétique se sépare et est transmis aux cellules de la descendance. Ces évènements se déroulent en différentes étapes coordonnées dans le temps (Figure I.1–9).

Au cours de l'interphase, différents évènements sont observés : la phase G1, la phase S et la phase G2 (Figure I.1–9). La <u>phase G1</u> est une phase de préparation à la division cellulaire, mais également une phase de contrôle de toutes les conditions favorables à une progression correcte du cycle (*checkpoints* ou points de contrôle). Il en existe trois au total. Le premier est le « point de restriction ». Si toutes les conditions ne sont pas favorables à la poursuite du cycle, les cellules peuvent soit rester bloquées en phase G1 afin de réparer les erreurs, soit entrer en phase de quiescence (G0) et reprendre le cycle plus tard, soit mourir par apoptose. La phase S est une

phase de synthèse et correspond à la phase de croissance de la taille de la cellule. Pendant cette phase, l'ADN et les différents organites sont dupliqués. Suite à la phase S, la cellule entre en <u>phase G2</u>, qui se résume à un temps d'attente et de préparation avant la mitose. Le passage de la phase G2 à la mitose correspond au deuxième point de contrôle du cycle, et il permet de vérifier que l'ADN n'est pas endommagé avant la division cellulaire. Si ce point de contrôle est franchi, la cellule entre en mitose ou phase M.

La mitose, phase M, consiste en un enchainement de 5 étapes (Figure I.1-10). La première étape consiste en la prophase. Pendant celle-ci la chromatine interphasique se condense jusqu'à la formation de chromosomes individualisés. Lorsque la chromatine est condensée au stade maximal du chromosome mitotique, la transcription est quasiment à l'arrêt. Au même moment, les deux centrosomes migrent chacun vers un pôle de la cellule et émettent des microtubules dans toutes les directions. Enfin, l'enveloppe nucléaire se désintègre. Pendant la prométaphase, des fuseaux mitotiques, composés de microtubules, relient les centrosomes aux centromères de chaque chromosome. Les chromosomes, totalement condensés à ce stade, vont migrer au centre de la cellule puis s'aligner et se placer sur la plaque métaphasique. C'est le mouvement congressionnel des chromosomes. Ce mouvement est réalisé grâce au fuseau mitotique, qui correspond à l'ensemble des microtubules reliant le centromère de chaque chromosome et le centrosome. Le troisième et dernier point de contrôle du cycle cellulaire a lieu au cours de la métaphase. Les chromosomes restent sur la plaque métaphasique et la cellule s'assure qu'ils sont bien orientés et que chaque chromatide est correctement attachée au fuseau mitotique par son centromère. Si toutes les conditions sont favorables, la mitose se poursuit en anaphase où les chromatides sœurs sont séparées et amenées aux deux pôles opposés de la cellule. Au cours de la télophase, la migration de chaque chromatide vers son pôle est terminée. À ce moment l'enveloppe nucléaire se reforme, les microtubules se détachent des centromères, puis les chromosomes se décondensent. De manière concomitante à la télophase vient la cytokinèse. Cette étape consiste en la division physique du cytoplasme de la cellule mère en deux cellules filles distinctes qui vont se fermer progressivement grâce à la formation d'un anneau de contraction. Les cellules filles sont alors reliées par le corps résiduel et sa disparition marque la sortie de la cellule de la mitose et la fin du cycle de division cellulaire.



Figure I.1–9 - Les différentes phases du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire consiste en une succession de phases et débute par la phase S, au cours de laquelle l'ADN est répliqué, et se termine par la division de la cellule mère en deux cellules filles identiques. Entre ses deux phases, deux étapes de croissance cellulaire ont lieu, la phase G1, avant la phase S, et la phase G2, après la phase S et avant la mitose. Pendant la phase G1 et G2, la cellule se prépare respectivement à la réplication du matériel génétique et à la séparation du matériel génétique. Pour cela, il existe, pour chacune de ses phases, des points de contrôles. Si les conditions ne sont pas favorables à la poursuite du cycle, la cellule peut rester bloquée en G1 ou alors entre en quiescence (G0) en attendant de réparer les erreurs.



Figure I.1–10 - Les différentes phases de la mitose.

La mitose commence tout d'abord par la disparition de l'enveloppe nucléaire. Lors de la prophase la chromatine se condense jusqu'au stade de chromosomes mitotiques. En prométaphase et métaphase, le fuseau mitotique se met en place à partir des deux centrosomes et permet le mouvement des chromosomes jusqu'à leur alignement complet sur la plaque métaphasique. En anaphase, les chromatides sœurs se séparent et ségrégent vers chacun des pôles opposés. En télophase, la membrane nucléaire et le Golgi se reforment puis les chromosomes se décondensent. Puis pendant la cytokinèse, le cytoplasme de la cellule mère se divise pour donner lieu à deux cellules filles.

Une mauvaise répartition des chromatides sœurs pourrait entrainer la perte (aneuploïdie), d'information génétique pour l'une des deux cellules filles et causer des dommages irréparables de l'ADN. L'ensemble des étapes mitotiques est finement contrôlé en régulant la disponibilité des effecteurs protéiques nécessaires à la mitose. Deux principaux mécanismes agissant sur la synthèse et la dégradation des effecteurs mitotiques sont mis en jeu. Tout d'abord la dégradation par protéolyse, puis l'action de nombreuses kinases qui agissent comme des « interrupteurs » et vont phosphoryler ou déphosphoryler les résidus des protéines en question en vue de leur dégradation (Dephoure et al., 2008). Pour ce dernier mécanisme, on trouve les kinases de la famille CDK (les kinases cycline dépendantes), les kinases Aurora (Andrews et al., 2003) et les kinases de la famille PLK (les kinases polo-like) (Santamaria et al., 2011).

#### I.1.3.3 Identification des cellules mitotiques

Il existe plusieurs façons de détecter les cellules en prolifération, l'une d'entre elles utilise l'immunohistochimie ou l'immunofluorescence *in-situ* pour détecter des protéines impliquées dans la compaction de la chromatine. Les cellules en prolifération peuvent être marquées à l'aide d'une multitude d'anticorps, entre autres, l'anticorps dirigé contre l'histone H3 phosphorylé sur la sérine en position 10 (H3Ser10P). Cette modification post-traductionnelle est impliquée dans deux processus complexes, la régulation de l'expression génique et la condensation/ségrégation des chromosomes (Cerutti and Casas-Mollano, 2009).

Ces processus requièrent un niveau de compaction de la chromatine différent. Au cours de l'interphase, la phosphorylation de H3 est corrélée à un état décondensé de la chromatine. Cette phosphorylation n'est pas pangénomique, car elle n'affecte pas la totalité du génome, mais est corrélée à l'activation de la transcription d'un groupe de gènes (Prigent and Dimitrov, 2003).

L'induction de la phosphorylation de H3 en fin d'interphase est corrélée à la condensation chromosomique précédant la mitose (Ajiro et al., 1996a, 1996b).

Le développement d'un anticorps spécifique anti-H3P, reconnaissant la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3, a permis de confirmer la corrélation entre la phosphorylation et la condensation chromosomique au cours de la division cellulaire (Hendzel et al., 1997; Van Hooser et al., 1998). La phosphorylation sur la sérine 10 de l'histone H3 débute en fin de phase G2 du cycle cellulaire, sur l'hétérochromatine péricentromérique, se propage à l'ensemble de la chromatine pendant la condensation chromosomique au cours de la prophase, puis diminue lors de la sortie de la cellule de la mitose (Figure I.1–11) (Prigent and Dimitrov, 2003).



Figure I.1–11 - Phosphorylation de la Ser10 de l'histone H3 pendant la progression du cycle cellulaire.

#### I.1.3.4 Les territoires chromosomiques

La structure du chromosome mitotique n'est pas conservée dans le noyau d'une cellule en interphase. Deux états fonctionnels différents de la chromatine peuvent être distingués de par leur intensité de coloration : l'euchromatine et l'hétérochromatine. En effet, le marquage de l'euchromatine est plus clair alors que celui de l'hétérochromatine est plus intense suggérant une densité et une compaction plus forte de la chromatine.

L'euchromatine comprend les régions où la chromatine est peu compactée. Décondensée, cette chromatine est généralement associée à des régions du génome transcriptionnellement actives pendant l'interphase. Elle présente des modifications post-traductionnelles sur les histones (voir section I.1.4.3), caractéristiques d'une transcription active, telles que la méthylation sur la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me), la méthylation sur la lysine 4 de l'histone H3, l'hyperacétylation des histones H3 et H4 (Rosenfeld et al., 2009). À l'opposé, du fait de la forte compaction de l'hétérochromatine, l'ADN y est peu transcrit. Des marques caractéristiques d'une transcription inactive sont déposées sur les histones comme la triméthylation sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3), ainsi que la présence de la protéine HP1 (*Heterochromatine Protein I*) (Lachner et al., 2001).

Deux formes d'hétérochromatine peuvent être observées : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative. L'hétérochromatine constitutive est toujours hautement condensée, contient peu de gènes et est enrichie en séquences d'ADN moyennement ou fortement répétées, telles que les régions satellites qui sont considérées comme étant transcriptionnellement

La chromatine phosphorylée ou non sur la Ser10 de H3 est indiquée en rouge ou gris respectivement. Les microtubules sont indiqués en vert et les centrosomes en bleu. La phosphorylation de la Ser10 débute au cours de la phase G2 sur la chromatine péricentromérique, puis est complétée en prophase et diminue lors de la sortie de la cellule de la mitose (Prigent and Dimitrov, 2003).

inactives (Lohe et al., 1993). Ces régions satellites se trouvent localisées dans les régions centromériques, péri-centromériques et sous-télomériques (Grewal and Elgin, 2007). L'hétérochromatine constitutive est stable, irréversible et est transmise à la descendance entre chaque division cellulaire ce qui en fait une marque de mémoire épigénétique (Grewal and Elgin, 2007). L'hétérochromatine facultative contient des séquences codantes et est plus flexible car elle alterne entre des états de condensation et de décondensation. La décondensation se passe en dehors de la phase de réplication (phase S) et la chromatine devient alors transcriptionnellement active.

La caractéristique majeure de la chromatine est son organisation structurelle et spatiale. En général, chez l'homme, l'hétérochromatine des noyaux en interphase se trouve en périphérie du noyau, proche de la membrane nucléaire. Il existe également une organisation fonctionnelle des chromosomes interphasiques. En effet, chaque chromosome en interphase est régionalisé dans le noyau et forme des territoires chromosomiques (CTs ou *chromosome territories*) (Cremer and Cremer, 2001, 2010). L'agencement des territoires chromosomiques les uns par rapport aux autres n'est pas aléatoire, les petits chromosomes étant préférentiellement localisés à l'intérieur du noyau et les plus grands à la périphérie. De plus, le contenu génique peut également jouer sur la localisation chromosomique. En effet, à taille égale, un chromosome pauvre en gènes est plutôt situé à la périphérie alors qu'un chromosome riche en gènes sera plutôt localisé à l'intérieur. Enfin, au sein d'un territoire chromosomique, la localisation des gènes semble être liée à l'expression : les gènes transcriptionnellement actifs sont préférentiellement localisés en périphérie du CT (Cremer and Cremer, 2010).



Figure I.1–12 – Chaque chromosome est arrangé en territoires chromosomiques au sein du noyau.

(a) Chromosomes diploïdes de poulet en métaphase. (b) Coloration de chaque chromosome avec des anticorps spécifiques (c) grâce à la technique de FISH. (d) Section d'un noyau de fibroblaste de poulet et territoires chromosomiques visualisés par différentes couleurs. Chaque chromosome a une localisation unique, et les chromosomes homologues sont localisés séparément dans le noyau (Cremer and Cremer, 2001).

# I.1.3.5 La transcription

La transcription est le processus biologique permettant de passer d'une séquence génique à la protéine correspondante. La première étape de ce processus nécessite en premier la production d'une molécule d'ARN, à partir de la séquence d'ADN qui lui est complémentaire, et ensuite cette séquence d'ARN sera traduite en protéine.

La transcription est un processus doté d'une grande complexité et qui implique différents niveaux de contrôle. Sa régulation est essentielle au développement et à l'homéostasie cellulaire ; celle-ci permet l'expression de gènes spécifiques d'un type cellulaire, d'un stade du cycle cellulaire, et aussi d'un certain stade du développement. Ainsi, une dérégulation de la transcription impacte sévèrement différentes fonctions cellulaires et est la cause de l'occurrence d'un grand nombre de pathologies. Pour cette raison, le processus de transcription est un des processus cellulaires les plus étudiés, mais un grand nombre de mécanismes reste à découvrir.

La transcription est un processus cyclique. Brièvement, au cours de l'initiation de la transcription, les activateurs de la transcription se lient sur des séquences d'ADN qui leur sont spécifiques, en aval du promoteur du gène. Le promoteur lie un certain nombre d'effecteurs, tels que des facteurs de transcription, qui vont positionner l'ARN Polymérase II (Pol II) au site d'initiation de la transcription (*Transcription Starting Site* ou TSS) afin de former le complexe d'initiation de la transcription. Chez les eucaryotes supérieurs, l'ARN Pol II est à l'arrêt dans la région proximale du promoteur. Afin d'initier l'étape d'élongation, son extrémité carboxy-terminale (COOH-) doit impérativement être phosphorylée. Lors de l'élongation, l'ARN Pol II écarte les deux brins d'ADN et se déplace du site d'initiation jusqu'au site de terminaison de la transcription. Au site de terminaison, cette dernière va relâcher l'ARN messager (ARNm) transcrit, et va se détacher de l'ADN.

Dans un noyau interphasique, l'euchromatine et hétérochromatine définissent différents états de transcription basés sur l'état de condensation de la chromatine. Cependant, même si l'euchromatine est moins compacte que l'hétérochromatine, elle reste tout de même dense du point de vue de sa structure nucléosomale.

# I.1.4 La régulation épigénétique

Le terme « épigénétique » se définit par l'ensemble des modifications réversibles, qui agissent sur les mécanismes de régulation de l'expression des gènes sans pour autant changer leur séquence d'ADN. Ces modifications sont vues comme des marques épigénétiques sur le génome et sont associées à des changements de structure de la chromatine afin de la réorganiser en domaines fonctionnels.

Les nucléosomes, plus particulièrement leur composition ainsi que leur positionnement sur la séquence d'ADN, confèrent à la chromatine une structure hiérarchique et dynamique. Cette organisation structurale et spatiale variable de la chromatine lui donne de nouvelles propriétés fonctionnelles. Celles-ci vont permettre l'accès aux machineries moléculaires nécessaires à la transcription, à la réplication ou à la réparation des dommages de l'ADN. Ces propriétés varient avec le cycle cellulaire, ce qui montre que la chromatine n'est pas une structure figée dans le temps. A l'échelle du nucléosome, il existe trois mécanismes principaux capables de jouer le rôle de régulateur chromatinien structural : les facteurs de remodelage de la chromatine; les mécanismes d'assemblage/désassemblage des nucléosomes; et la composition des nucléosomes en histones canoniques et en histones variantes au sein de la particule de cœur (Jin et al., 2005; Workman, 2006).

## I.1.4.1 Les facteurs de remodelage

Le remodelage de la chromatine se fait par le biais de l'action de plusieurs protéines appelées facteurs de remodelage qui s'associent en complexes. Ces complexes de remodelage ont pour fonction de remodeler la structure de la chromatine en provoquant le déplacement des nucléosomes, leur éjection ou la modification de leur composition. Ces complexes de remodelage sont ATP-dépendants, ce qui signifie que leur sous-unité catalytique est une ATPase, qui utilise l'énergie produite par l'hydrolyse de la molécule d'ATP pour induire des changements de conformation des nucléosomes et altérer les liaisons ADN-protéine. Ainsi, les complexes de remodelage permettent le contrôle de l'expression génique.

Il existe quatre familles de complexes de remodelage qui se classent selon la similarité de leur sous-unité ATPase (Figure I.1–13). La famille ISWI (*Imitation SWItch*) possède des domaines SANT (SWI3, ADA2, NCoR, TFIIIB) qui sont capables de se lier aux queues des histones et à l'ADN. La famille SWI/SNF (Switching defective/Sucrose Non-Fermenting) possède un domaine BROMO lui permettant d'interagir avec les lysines acétylées. La famille INO80 (*INOsitol requiering 80-SWItch related complex 1*) dispose d'un domaine ATPase

fractionné en deux. Enfin, la famille CHD (*Chromodomain-Helicase-DNA binding*) contient un domaine CHROMO capable de lier les lysines méthylées. Ces quatre familles sont associées à une chromatine relâchée et à une activation de la transcription. Il existe une dernière famille, le complexe Mi-2/NuRD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*), formé d'une histone désacétylase et d'un facteur de remodelage. Mi-2/NuRD agit comme un répresseur de la transcription.



Figure I.1–13 - Structure générale de la sous-unité ATPase des quatre différentes classes de facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants.

En rouge sont indiqués les domaines ATPase, en violet le bromodomaine, en rose le chromodomaine, en bleu le domaine SANT et enfin en vert le domaine de liaison à l'ADN (Tsukiyama, 2002).

#### I.1.4.2 Les chaperonnes des histones

Les histones étant de petites protéines chargées positivement et l'ADN étant chargé négativement, ils interagissent ensemble naturellement par des liaisons électrostatiques. Les chaperonnes reconnaissent spécifiquement les structures des histones et les escortent depuis leur synthèse jusqu'à leur incorporation et leur assemblage dans les nucléosomes. Les chaperonnes escortent à nouveau les histones après leur éviction des nucléosomes par les facteurs de remodelage (Burgess and Zhang, 2013; Gurard-Levin et al., 2014). Ainsi, les histones libres sont fondamentalement inexistantes dans le contexte cellulaire.

Les chaperonnes se distinguent selon la fonction qu'elles occupent. L'interaction entre une histone et une chaperonne n'est pas exclusive. Plusieurs chaperonnes sont capables de lier un même dimère H2A-H2B comme NAP1 (*Nucleosome Assembly Protein 1*) ou FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*) (Winkler and Luger, 2011). D'autres chaperonnes peuvent reconnaître et lier à la fois le dimère H2A-H2B ou le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> comme NAP1 (McBryant et al., 2003; Andrews et al., 2010; D'Arcy et al., 2013). À l'inverse, certaines chaperonnes comme CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor*) ne peuvent lier que les dimères H3-H4 afin de former le

tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> (Winkler et al., 2012). Il existe également des chaperonnes qui ne se lient qu'aux dimères contenant des histones variantes. C'est le cas de HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*) qui est impliquée dans la déposition du variant CENP-A (Foltz et al., 2009), ou la chaperonne HIRA (*HIstone Regulator A*) et DAXX (*Death-domain associated protein*) qui ne reconnaissent que le variant H3.3 (Goldberg et al., 2010; Loppin et al., 2005).

La redondance de ces interactions s'explique par la façon dont les chaperonnes lient les histones. Certaines chaperonnes, comme NAP1, se lient aux histones par le domaine *histone fold*, commun à toutes les histones de cœur canoniques, et ne peuvent donc pas faire la distinction entre le dimère H2A-H2B ou le dimère H3-H4 (McBryant et al., 2003; Andrews et al., 2010; D'Arcy et al., 2013). D'autres chaperonnes sont capables de reconnaître des régions spécifiques des dimères, comme par exemple ASF-1 qui interagit avec le domaine de tétramérisation entre H3 et H4 ainsi qu'entre H3.3 et H4 car ils sont identiques. Enfin, les chaperonnes qui reconnaissent spécifiquement les histones variantes se lient à une région présente seulement sur ces dernières. C'est le cas par exemple de la chaperonne HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*) qui reconnaît spécifiquement le CATD (*CENP-A targeting domain*) présent uniquement dans l'histone CENP-A (Foltz et al., 2009) et permet sa déposition dans les nucléosomes centromériques. Les chaperonnes ANP32e et YL1 reconnaissent spécifiquement l'hélice  $\alpha$ C de l'histone variante H2A.Z et sont responsables respectivement de son éviction et de son incorporation (Obri et al., 2014; Latrick et al., 2016).

## I.1.4.3 Les modifications post-traductionnelles

Tout comme les complexes de remodelage, les modifications post-traductionnelles (PTMs) des histones, plus particulièrement des extrémités amino-terminales des histones, sont des acteurs de la régulation épigénétique. En effet, les queues N-terminales des histones non-structurées se projettent en dehors du nucléosome et sont la cible de nombreuses PTMs. Ces modifications sont responsables d'altérations au niveau des interactions ADN-histone ou histone-histone qui modifient la stabilité et la dynamique des nucléosomes. Les PTMs les plus étudiées sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la sumoylation, et l'ubiquitinylation. Une multitude d'autres PTMs ont été récemment identifiées. Parmi ces modifications, l'acétylation et la méthylation sont les plus fréquentes ; elles seront donc abordées plus en détail dans cette section.

Les modifications covalentes des queues des histones peuvent agir de deux manières nonexclusives : elles peuvent modifier les propriétés des nucléosomes et marquer la chromatine de sorte à recruter certains complexes. Les modifications post-traductionnelles peuvent être nombreuses sur une même histone, la diversité des différentes combinaisons possibles forme un véritable langage nommé « code d'histones ». Ce code est lu et interprété par des protéines régulatrices qui vont ensuite le traduire en un état chromatinien (actif, permissif, restrictif ou inactif). Une modification peut en influencer une autre de manière synergique ou antagoniste, comme par exemple l'acétylation et la méthylation.

L'acétylation consiste en l'ajout du groupement acétyl sur des résidus lysine par des enzymes nommées histones acétyl-transférases (HAT). L'acétylation entraine un relâchement de la chromatine lui permettant une meilleure accessibilité aux facteurs de transcription et la rendant transcriptionnellement active (euchromatine). Ceci est observé lors de l'acétylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27ac) (Rosenfeld et al., 2009). Les enzymes histones désacétylases (HDAC) permettent à la chromatine de retourner vers un état transcriptionnellement inactif.

La méthylation consiste en l'ajoute d'un et jusqu'à trois groupements méthyl sur des résidus lysines ou arginines par des méthyltransférases (HMT). Le nombre de résidus méthylés ainsi que le nombre de groupements méthyl ajoutés peuvent mener à différents types de réponses. En effet, les marques H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3 sont associées avec la répression de l'expression génique et la formation d'une structure d'hétérochromatine (Sims et al., 2003). À l'inverse les marques H3K4me ou H3K4me3 sont associées avec des gènes actifs et un état ouvert de la chromatine, l'euchromatine (Barski et al., 2007).

# I.1.4.4 L'incorporation des histones variantes

En plus des facteurs de remodelage de la chromatine et des modifications posttraductionnelles des histones, l'incorporation d'histones variantes fait partie des trois principaux mécanismes responsables des changements de caractéristiques structurales essentielles à la spécification de l'état de la chromatine.

#### I.1.5 Les histones variantes

Les histones variantes sont des isoformes non-alléliques des histones conventionnelles avec lesquelles elles partagent un certain pourcentage d'homologie. Elles remplacent les histones canoniques dans la particule de cœur du nucléosome et modifient leurs propriétés structurales et fonctionnelles.

Il en existe pour chacune des familles d'histones (H1, H2A, H2B, H3) à l'exception de l'histone H4 (Figure I.1–5 et Figure I.1–6). Malgré le fait que les histones variantes soient codées par des gènes distincts des histones canoniques, leur séquence protéique présente des degrés de

similarité variables et parfois assez importants (Figure I.1–6). C'est le cas par exemple de l'histone H3.1 et de sa variante H3.3 qui présentent une homologie de séquence d'environ 96% alors que CENP-A n'en présente que 47% (Szenker et al., 2011). Un autre exemple est celui de la variante H2A.Z qui présente seulement 60% de similarité avec son histone canonique H2A (Bönisch and Hake, 2012).

Des expériences d'invalidation génétique d'histones variantes, dans divers systèmes cellulaires, ainsi que l'étude de mutations dans les cellules cancéreuses, suggèrent un rôle crucial des histones variantes dans la régulation de processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation au cours du vieillissement, ou le développement de maladies. Cependant, malgré les nombreuses études effectuées jusqu'à présent, il reste beaucoup à découvrir en ce qui concerne le rôle structural et fonctionnel des histones variantes au sein de la chromatine. Dans le paragraphe qui suit, je décrirai brièvement l'histone variante CENP-A, variante de la famille de l'histone H3, connue pour être essentielle à la prolifération cellulaire et je poursuivrai ensuite par une description détaillée de l'histone variante H2A.Z, mes travaux de thèse se focalisant essentiellement sur l'étude du rôle de l'histone variante H2A.Z, variante de la famille de l'histone H2A, dans la prolifération et différenciation au cours du processus d'homéostasie et de développement de la peau.

#### I.1.5.1 Les histones variantes de la famille H3

Les histones variantes de la famille H3 diffèrent par plusieurs paramètres, dont leur séquence primaire d'acides aminés, leur localisation sur la chromatine, les protéines composant leur machinerie de déposition, le moment de leur déposition et leur fonction au sein de la structure chromatinienne. À ce jour, huit membres ont été identifiés comme appartenant à la classe de la famille des histones H3. Tout d'abord H3.1 et H3.2 qui sont les histones les plus abondantes dans les cellules et sont reportées comme étant des histones « conventionnelles » ou « canoniques ». Il existe ensuite quatre variantes de H3: H3.3, H3.4 (aussi appelé TH3, H3.1t ou encore H3.t), H3.5, H3.X, H3.Y et CENP-A reportées chez l'homme (Figure I.1–5, Figure I.1–6) (Tachiwana et al., 2011). Alors que les histones variantes sont exprimées et incorporées dans la chromatine de manière ubiquitaire, les histones variantes sont exprimées de manière spécifique dans un organisme, dans un tissu ou à un stade de développement particulier. C'est le cas, par exemple, des histones H3.X et H3.Y qui sont spécifiques des primates, et aussi des histones H3.4 et H3.5 qui sont exprimés spécifiquement au niveau des testicules.

# I.1.5.2 L'histone variante CENP-A

#### I.1.5.2.1 La structure du nucléosome CENP-A

La protéine CENP-A (Centromeric protein A) est une variante de l'histone canonique H3.1 (Sullivan et al., 1994). Comme toutes les histones, l'histone variante CENP-A est composée de deux domaines distincts : une extrémité amino-terminale (NH2) flexible et non structurée et un domaine carboxy-terminal (COOH) globulaire et structuré. L'histone variante CENP-A diffère fortement de l'histone canonique H3.1. Les différences se localisent surtout sur la queue flexible N-terminale (résidus 1 à 47) qui partage la caractéristique flexible et basique de celle de H3.1 mais qui n'ont aucune similarité de séquence. La plus forte homologie de séquence (62% d'identité) entre l'histone variante CENP-A et H3.1 est observée au niveau du domaine globulaire (histone fold domain ou HFD) (Maze et al., 2014), plus précisément au niveau des régions de la boucle L1 et de l'hélice αN qui interagissent avec l'histone H4 pour former le nucléosome (Tachiwana et al., 2011). L'hélice αN de CENP-A est un tour d'hélice plus courte que celle de l'histone canonique H3.1. Ces différences structurales reflètent la capacité de l'octamère CENP-A à enrouler seulement 121 pb d'ADN autour de lui-même au lieu de 147 pb pour l'octamère canonique (Tachiwana et al., 2011). L'hélice αN de l'histone variante CENP-A augmente la flexibilité des bras d'ADN entrant et sortant du nucléosome CENP-A. Ceci empêche l'interaction des nucléosomes centromériques avec l'histone de liaison H1 (Roulland et al., 2016) qui est donc absente de la chromatine centromérique. La délétion de l'hélice aN de CENP-A empêche également la formation du complexe CCAN (Constitutive Centromere-Associated Network) et donc la formation du kinétochore fonctionnel. Ceci affecte sévèrement la ségrégation des chromosomes (Roulland et al., 2016). La boucle L1 possède deux résidus Arginine (Arg80) et Glycine (Gly81) supplémentaires qui vont former une boucle plus longue qui dépasse du nucléosome (Tachiwana et al., 2011). Ces deux résidus sont essentiels au maintien de CENP-A dans le nucléosome centromérique. De plus, la région de la boucle L1 de CENP-A contient le CATD (Cenp-A Targeting Domain), site de reconnaissance spécifique par la chaperonne HJRUP (Foltz et al., 2009), permettant sa déposition dans la chromatine centromérique (Tachiwana et al., 2011; Panchenko et al., 2011).

Les régions de l'extrémité N-terminale, de la boucle L1 et de l'extrémité C-terminale contiennent des sites de liaison spécifiques pour certains facteurs, tels que CENP-C et CENP-N, membres du CCAN (*Constitutive Centromere Associated Network*), nécessaires à la formation et au maintien et de la fonction du centromère.

# I.1.5.2.2 Localisation et fonction du nucléosome CENP-A

Chez les mammifères, l'ADN centromérique est caractérisé par l'incorporation de nucléosomes sur lesquels l'histone conventionnelle H3 a été remplacée par son histone variante CENP-A (voir paragraphe I.1.5.1).

Au cours de la phase de réplication de l'ADN centromérique (phase S), les nucléosomes CENP-A sont équitablement distribués entre les deux molécules d'ADN naissantes. À cet instant, le manque de nucléosomes CENP-A laissant des « trous », ce dernier est remplacé par des nucléosomes H3. Pendant la phase G2, de nouvelles protéines CENP-A sont synthétisées et sont reconnues par la chaperonne HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*), strictement spécifique de l'histone variante CENP-A, au niveau du domaine CATD (*Centromere Targeting Domain*) de CENP-A (Foltz et al., 2009; Ray-Gallet and Almouzni, 2010). Le chargement des protéines CENP-A dans la chromatine centromérique semble avoir lieu pendant les phases M et G1.

Le processus de dépôt de CENP-A sur la chromatine fait tout d'abord intervenir les protéines Mis18 $\alpha$ , Mis18 $\beta$ , RbAp46, RbAp48 et M18BP1. Ces protéines sont transitoirement associées à la chromatine centromérique entre la télophase et le début de G1 et sont indispensables au dépôt de CENP-A sur la chromatine. En revanche, ces protéines ne sont jamais en contact direct avec CENP-A, ce qui suggère que leur fonction est seulement de préparer la chromatine centromérique à recevoir ultérieurement le chargement de CENP-A. La déposition effective de CENP-A sur la chromatine centromérique s'étend lors des premières heures de la phase G1 et nécessite l'intervention de HJURP, de la marque H3K4me2, ainsi que des complexes de remodelage de la chromatine (Perpelescu et al., 2009; Bergmann et al., 2011). La dernière étape, en fin de phase G1, consiste en la stabilisation des nucléosomes nouvellement incorporés, et implique les GTPases, Cdc42 et Rac, ainsi que leurs facteurs associés (Lagana et al., 2010).

*In-vivo*, les nucléosomes contenant CENP-A alternent avec les nucléosomes contenant l'histone canonique H3. Cette organisation permet de créer une structure chromatinienne avec les nucléosomes CENP-A orientés vers l'extérieur afin recruter les protéines formant le kinétochore qui servira de plateforme d'attachement aux microtubules (Sullivan and Karpen, 2004) (voir section I.1.6.2). L'incorporation de cette variante confère à la chromatine centromérique des propriétés uniques (Tachiwana et al., 2011; Goutte-Gattat et al., 2013). La surexpression de CENP-A mène à la formation de nouvelles unités centromériques partielles, appelées néocentromères, qui recrutent certaines protéines constituant le kinétochore telles que CENP-C. Cependant, le néocentromère n'est pas fonctionnel (Beh et al., 2016).

Chez tous les eucaryotes, cette histone variante est considérée comme la marque épigénétique du centromère, elle est spécifiquement incorporée au niveau de la chromatine centromérique où elle remplace l'histone H3 sur un grand nombre de nucléosomes (Palmer et al., 1987; Black et al., 2004). CENP-A a deux fonctions majeures. Premièrement, elle est nécessaire à la formation ainsi qu'à la maintenance du centromère (Warburton, 2004; Black et al., 2007). Deuxièmement, elle permet de créer la plateforme sur laquelle s'assemble le kinétochore, permet l'accrochage des microtubules et par conséquent la ségrégation des chromosomes en mitose.

L'histone variante CENP-A est essentielle à la survie. En effet, la délétion génétique constitutive de CENP-A *in-vivo* chez la souris provoque de sévères défauts mitotiques engendrant le décès des embryons à 6.5 jours de gestation (Howman et al., 2000). Des études *in-vitro* d'invalidation génique conditionnelle (*conditional knock-out* ou cKO) de l'histone variante CENP-A dans des cellules embryonnaires de souris (*Mouse Embryonic Fibroblasts* ou MEFs) provoque également de sévères défauts mitotiques engendrant des cellules aneuploïdes. Ces défauts mitotiques se traduisent par l'apparition de chromosomes retardataires (*lagging chromosomes*) au cours de la métaphase, correspondant à un mauvais alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique, ainsi de ponts chromosomiques (*chromosome bridges*) au cours de l'anaphase, correspondant à une ségrégation défectueuse des chromatides sœurs. Ces défauts sont visibles ensuite durant l'interphase par l'apparition de noyaux polylobées ou de micronoyaux (Goutte-Gattat et al., 2013; Roulland et al., 2016).

#### I.1.5.3 Les histones variantes de la famille H2A

Il existe cinq variantes de l'histone canonique H2A : H2A.Z, H2A.X, H2ABbd, macroH2A et TH2A, cette dernière étant spécifique du testicule. Les variantes H2A.Z et H2A.X, sont parmi les histones variantes les plus étudiées et se retrouvent chez tous les eucaryotes. En revanche, les histones H2ABbd et macroH2A sont spécifiques des vertébrés. Le grand nombre de variantes souligne l'importance de la position unique occupée par l'histone canonique H2A dans le nucléosome. En effet, comme mentionné précédemment, H2A est essentiel à la cohésion de la particule cœur du nucléosome et crée, avec l'histone H2B, la poche acidique (*acidic patch*) permettant au nucléosome de pouvoir interagir avec d'autres protéines (Kalashnikova et al., 2013).

# I.1.5.3.1 L'histone variante H2A.Z

# I.1.5.3.1.1La structure du nucléosome H2A.Z

L'histone variante H2A.Z est l'une des histones variantes les plus conservées au cours de l'évolution (Iouzalen et al., 1996). Elle partage environ 90% de similarité de séquence entre espèces telles que la levure et l'homme.

Cependant, H2A.Z ne partage qu'environ 60% d'homologie avec sa contrepartie canonique H2A (Jackson and Gorovsky, 2000; Suto et al., 2000). La région de l'histone variante H2A.Z qui lui confère ses propriétés uniques se trouve enfouie à l'intérieur du nucléosome, suggérant un rôle essentiel de H2A.Z dans la compaction et le maintien de la stabilité de la chromatine (Clarkson et al., 1999). En 2000, Suto et ses collaborateurs ont publié la structure cristallographique du nucléosome contenant H2A.Z avec une résolution de 2.6 Å (Suto et al., 2000). Cette structure est très similaire à la structure de 2.8 Å du nucléosome canonique (Luger et al., 1997), à quelques différences près. L'alignement des séquences d'acides aminés de H2A et H2A.Z met en évidence cinq régions qui divergent considérablement. Trois régions divergentes sont situées dans le domaine globulaire structuré : la boucle L1, la boucle L2 et le domaine d'ancrage (docking domain) (Figure I.1-14). Les deux autres régions divergentes sont localisées au niveau des queues N- et C-terminales (Figure I.1-14). Puisque l'histone variante possède environ 60% de similarité de séquence avec celle de l'histone H2A, elle est capable de se substituer à l'histone canonique H2A, sans perturber l'arrangement de l'octamère, ni modifier l'enroulement de l'ADN autour de la particule de cœur (Figure I.1-14b). Les quelques différences entre H2A et H2A.Z soumettent le nucléosome à des contraintes structurales suggérant que la variante H2A.Z est apparue afin d'assurer des fonctions bien spécifiques.

L'analyse cristallographique du nucléosome H2A.Z par le laboratoire du Dr. Luger (Suto et al., 2000) a révélé que l'échange de H2A par H2A.Z aboutit à une différence fondamentale dans l'interaction entre les deux dimères (H2A-H2B) et (H2A.Z-H2B). Cette interaction a lieu grâce au contact des deux boucles L1 entre H2A/H2A' ou H2A.Z/H2A.Z' de chaque dimère et permet de maintenir les deux gyres de la super-hélice d'ADN ensemble (Figure I.1–14, d). Ces changements dans la boucle L1 permettent un parfait alignement des hélices α1 de H2A.Z et H2A.Z' alors qu'elles sont dans une conformation parallèle pour H2A et H2A'(Figure I.1–14, d). Cette conformation rend défavorable la coexistence de dimères H2A-H2B et H2A.Z-H2B dans un nucléosome hybride H2A/H2A.Z par souci d'encombrement stérique (Suto et al., 2000).

La deuxième différence structurale se trouve au niveau de la poche acidique (ou *acidic patch*) située à la surface du nucléosome (Figure I.1–14, e). Cette zone, riche en résidus chargés

négativement (H2A (D9, E94, E95) et H2A.Z (D90, E91, E92) (Suto et al., 2000)), crée une poche acidique élargie sur la surface du nucléosome afin de lier d'autres protéines telles que des facteurs de remodelage de la chromatine, ainsi que la queue N-terminale de H4 d'autres nucléosomes environnants.

Enfin, la dernière différence structurale se trouve au niveau du domaine d'ancrage (*docking domain*) à l'extrémité C-terminale. Ce domaine d'ancrage est nécessaire à l'amarrage du dimère (H2A-H2B) au tétramère (H3-H4)<sub>2</sub>, et concerne les résidus 81 à 119 de H2A (Figure I.1–14, a). La substitution du résidu Glu104 d'H2A par le résidu Gly106 de H2A.Z résulte en la perte de 3 ponts hydrogène et donc dans la déstabilisation de l'interaction H2A.Z/H3. De cette façon l'interaction entre le dimère H2A.Z-H2B avec le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> est fragilisée (Thakar et al., 2009).



Figure I.1–14 - Différences majeures structurales entre les nucléosomes H2A.Z et H2A.

(a) Alignement des séquences protéiques de H2A (xénope) et H2A.Z (souris). Les différences entre les deux séquences sont indiquées en rouge et les régions essentielles aux fonctions de H2A.Z sont encadrées. (b) Superposition des structures nucléosomales H2A-NCP et H2A.Z-NCP. (c) Superposition de la structure tertiaire de H2A et de H2A.Z. Le cadre indique le domaine d'ancrage (*docking domain*). (d) Superposition des hélices  $\alpha$  et des boucles L1 des deux copies H2A (H2A et H2A', en orange et jaune) et des deux copies de H2A.Z (H2A.Z et H2A.Z', en bleu clair et gris). (e) Potentiel électrostatique de la surface du nucléosome H2A.Z et du nucléosome H2A. La flèche indique la poche acidique (Suto et al., 2000).

# I.1.5.3.1.2Les deux isoformes de H2A.Z : H2A.Z-1 et H2A.Z-2

H2A.Z possède deux isoformes protéiques H2A.Z-1 et H2A.Z-2, différant par 3 résidus (Thr14/Ala14, Ser38/Thr38, Val127/Ala127 respectivement (Figure I.1–15, a)) et codées par deux gènes distincts (*H2afz* et *H2afv*). Les acides aminés en position 14 et 127 sont localisés sur les régions non-structurées des extrémités N-terminale et C-terminale respectivement. L'acide aminé en position 38 est quant à lui localisé sur le domaine *histone-fold* (Figure I.1–15, a) (Luger et al., 1997; Suto et al., 2000). La région de la boucle L1, résidus 39-48, des nucléosomes H2A, H2A.Z-1 et H2A.Z-2, présente une particularité (Figure I.1–15, b). Cette différence structurale est due au remplacement de l'acide aminé en position 38, situé sur l'extrémité C-terminale de l'hélice  $\alpha$ 1 et juste avant la boucle L1. Elle affecte la structure de cette dernière en la rendant plus flexible que celle de H2A (Horikoshi et al., 2013).

Malgré leur grande similitude de séquence, leur profil phylogénétique a fortement évolué au cours de l'évolution des vertébrés (Eirín-López et al., 2009). Chez l'homme, ces deux isoformes sont toutes deux exprimées dans un grand nombre de tissus. Cependant la distribution des protéines H2A.Z-1 et H2A.Z-2 déposées dans la chromatine, ainsi que l'association avec l'histone H3K4me3 différent (Dryhurst et al., 2009). De plus, malgré une séquence protéique très similaire entre les deux isoformes, ceux-ci possèdent des séquences promotrices très différentes, ce qui résulte en une expression temporelle, ainsi que tissu-spécifique différentes (Dryhurst et al., 2009). Ces informations laissent penser que les deux isoformes ont des fonctions cellulaires différentes. L'isoforme H2A.Z.-1 est la seule indispensable à la survie de la drosophile et de la souris (Faast et al., 2001). Après la délétion du gène H2afz, H2afv est incapable de compenser la perte de H2afz chez la souris (Vardabasso et al., 2014). L'étude *in-vivo* du rôle des isoformes H2A.Z-1 et H2A.Z-2 a cependant été ralentie par l'inexistence de modèles animaux génétiquement modifiés. Au cours de mon projet de thèse, j'ai créé une lignée de souris transgéniques à partir de laquelle il est possible d'invalider à la fois le gène H2afz, codant pour l'isoforme H2A.Z-1, et le gène H2afv, codant pour l'isoforme H2A.Z-2.



Figure I.1-15 - Les deux isoformes de l'histone variante H2A.Z, H2A.Z-1 et H2A.Z-2.

(a) Alignement des séquences protéiques humaines de l'histone canonique H2A et des deux isoformes de l'histone variante H2A.Z, H2A.Z-1 et H2A.Z-2. La structure secondaire est représentée en haut. Les résidus différant sont représentés sur fond blanc. (b) Structure cristallographique des nucléosomes contenant les isoformes H2A.Z-1 (bleu) et H2A.Z-2 (violet) avec deux angles de vue différents. La région de la boucle L1 est encadrée. Adapté de (Horikoshi et al., 2013).

# I.1.5.3.1.3Localisation et fonctions connues de H2A.Z

Ces particularités suggèrent que H2A.Z a une fonction cruciale et distincte des autres variantes (Suto et al., 2000). Peu d'informations sont disponibles concernant le rôle de H2A.Z *in-vivo*, mais il est connu que H2A.Z est essentielle à la survie de plusieurs organismes. Les levures *S. pombe*, privées du gène H2A.Z, croissent lentement et présentent des défauts de ségrégation des chromosomes mitotiques. Le rôle essentiel du gène H2A.Z a été également montré chez *Tetrahymena thermophila*, chez la drosophile et chez la souris, organismes pour lesquels l'invalidation du gène est létale (Carr et al., 1994; Jackson and Gorovsky, 2000; Faast et al., 2001; Zlatanova and Thakar, 2008).

L'histone variante H2A.Z a été rapidement associée à la transcription des gènes. Cependant, son rôle dans l'activation ou la répression de la transcription est flou et parfois contradictoire. Des études chez le *Tetrahymena thermophila* ont montré que le variant d'histone H2A.Z était présent dans le macronoyau transcriptionnellement actif mais absent dans le micronoyau

transcriptionnellement inactif, et donc qu'il était impliqué dans l'activation de la transcription (Allis et al., 1980; Faast et al., 2001). Chez la levure, les premiers travaux ont montré la présence du nucléosome contenant H2A.Z sur une vaste majorité de promoteurs de gènes, comme GAL1 et PHO5, au niveau desquels il réprimerait la transcription. Lors de l'activation de la transcription, le variant H2A.Z disparaitrait après remodelage de la chromatine (Santisteban et al., 2000; Adam et al., 2001).

En 2003, une étude réalisée par le groupe de Madhani a identifié chez la levure approximativement 200 gènes, dont l'expression est diminuée lorsque l'histone variante H2A.Z est délétée. En conditions normales, ces gènes sont enrichis en nucléosomes H2A.Z au niveau des régions sous-télomériques ainsi qu'à la frontière entre des régions d'euchromatine (zone de transcription active) et des régions d'hétérochromatine (zone dite silencieuse). Les nucléosomes H2A.Z permettraient de définir la frontière entre ces deux domaines chromatiniens en délimitant les zones d'euchromatine et d'hétérochromatine (Meneghini et al., 2003).

En 2005, plusieurs groupes ont réalisé des études pangénomiques chez la levure et la drosophile afin de déterminer la distribution des nucléosomes contenant H2A.Z. Chez la levure, la localisation de la variante est restreinte, pour une grande majorité des gènes, à une zone d'un à deux nucléosomes bordant le NFR (*Nucleosome Free Region*) sur les nucléosomes -1 et +1 (Guillemette et al., 2005; Raisner et al., 2005). En revanche, chez la drosophile la localisation de H2A.Z aux promoteurs se limite au nucléosome +1 (Mavrich et al., 2008). En plus des promoteurs, le variant d'histone H2A.Z est également présent au niveau des éléments de régulation comme les amplificateurs (ou *enhancers*) et les isolateurs de gènes (Barski et al., 2007). À l'opposé, H2A.Z se trouve également enrichie dans certaines régions non transcrites à savoir l'hétérochromatine péricentromérique, centromérique et télomérique (voir paragraphe 1.1.6.1) (Meneghini et al., 2003; Rangasamy et al., 2003; Greaves et al., 2007).

Les localisations très variées de l'histone variante H2A.Z suggèrent que celle-ci présente une grande diversité de fonctions en ce qui concerne l'activation ou la répression de la transcription, mais également dans le maintien de la structure du centromère. H2A.Z se trouve impliquée dans la différenciation des cellules souches (Li et al., 2012), dans la réparation de l'ADN, ainsi que dans le processus de senescence.

# I.1.5.3.1.4Le mécanisme de déposition de H2A.Z

Le complexe SWR1 a été le premier facteur de remodelage ATP-dépendant identifié chez la levure. Ce complexe reconnaît la poche acidique crée par le dimère H2A.Z-H2B afin de le déposer sur la chromatine. En fait, la chaperonne Nap1 permet l'import des dimères H2A.Z-H2B du cytoplasme vers le noyau et ensuite la chaperonne Chz1 s'associe au dimère H2A.Z-H2B et le présente au complexe SWR1 afin qu'il procède à l'échange avec le dimère H2A-H2B (Dronamraju et al., 2017).

Chez l'homme, le complexe p400-TIP60 et le complexe SRCAP montrent des similitudes avec le complexe SWR1 en ce qui concerne sa composition et son mode de fonctionnement. La chaperonne ANP32e est un membre du complexe P400-TIP60 et facilite l'éviction de H2A.Z (Obri et al., 2014). Elle reconnaît spécifiquement le variant d'histone H2A.Z parmi toute la famille H2A grâce à la présence d'un résidu glycine sur l'hélice αC spécifique de H2A.Z. La délétion de la chaperonne ANP32e résulte en une augmentation significative de la quantité d'H2A.Z au niveau des promoteurs ainsi qu'à l'apparition de nouveaux pics d'H2A.Z au niveau des amplificateurs et des isolateurs de gènes. Ces résultats montrent que cette chaperonne permet le retrait de H2A.Z des nucléosomes (Obri et al., 2014). De plus, il existe une autre chaperonne appelée YL1 qui reconnaît spécifiquement le variant d'histone H2A.Z et qui est responsable de sa déposition dans le nucléosome. L'extrémité N-terminale de la chaperonne YL1 (YL1 ZID) s'associe avec le dimère H2A.Z-H2B et permet une extension de l'hélice aC de H2A.Z de 2 tours supplémentaires. Cependant, contrairement à la chaperonne ANP32e, YL1 ne se lie pas avec l'extension de  $\alpha C$  de H2A.Z, mais crée plusieurs extensions avec le dimère H2A.Z-H2B en suivant le sillon d'ADN (Latrick et al., 2016). De plus, l'extrémité N-terminale de YL1 se lie à la poche acidique de H2A.Z, mais pas à celle de H2A, par l'intermédiaire d'une ancre Arginine ou « arginine anchor mechanism » (Latrick et al., 2016).

# I.1.6 La mitose

# I.1.6.1 Le centromère

Le centromère est une région du chromosome mitotique hautement spécialisée et essentielle à la séparation des chromosomes afin de répartir le matériel génétique à part égale pendant la mitose et la méiose. Tout d'abord, il forme une plateforme d'attache entre les microtubules et la chromatine chromosomique. Plus spécifiquement, le centromère permet l'assemblage du kinétochore qui à son tour est nécessaire à la capture, la fixation et l'orientation des fuseaux mitotiques. De plus, le centromère est nécessaire pour réguler les forces de cohésion entre les chromatines sœurs. Pour finir, il est aussi considéré comme une étape contrôle de la mitose (*mitotic checkpoint*) (Figure I.1–9).

On distingue deux types de centromères, qui eux-mêmes définissent deux types de chromosomes : les chromosomes holocentriques dont le centromère est réparti sur l'ensemble de sa longueur et les chromosomes monocentriques dont le centromère se concentre en un seul site de constriction du chromosome.

La région centromérique se divise en deux sous-régions : le cœur du centromère et le péricentromère (Figure I.1–16).

#### I.1.6.1.1 Le cœur du centromère et la chromatine centromérique

La chromatine centromérique présente des caractéristiques qui la distingue de l'hétérochromatine et de l'euchromatine et en font une chromatine unique et spécialisée.

Chez l'homme, les séquences centromériques sont toutes composées de séquences  $\alpha$ satellites. La présence de ces séquences répétées ne semble pas être un prérequis à la formation du centromère, mais favorise sa stabilisation. Par conséquent, en absence d'une séquence d'ADN universelle, il existe une autre caractéristique déterminante dans la définition du centromère : la présence spécifique de l'histone variante CENP-A. On parle de détermination épigénétique du centromère.

Par définition, le cœur du centromère est spécifiquement caractérisé par l'incorporation du variant d'histone CENP-A (*Centromeric protein-A*) dans les nucléosomes de la chromatine centromérique (Sullivan and Karpen, 2004). La présence de cette variante est cruciale à la formation du complexe macro-protéique qu'est le kinétochore, donc au déroulement correct de la mitose.

Pendant de nombreuses années, la chromatine centromérique a été associée à l'hétérochromatine et a donc été considérée comme une région dont la transcription était inexistante. Cette idée a été longtemps confortée par le fait que cette région contenait peu de gènes dans ses séquences. Cependant, lorsque des séquences codantes sont présentes, il a été démontré qu'elles pouvaient être transcrites (Saffery et al., 2003; Yan et al., 2006).

Des analyses quantitatives ont montré que les nucléosomes CENP-A ne constituent que 4% de tous les nucléosomes composant la chromatine centromérique, et qu'ils s'intercalent entre les nucléosomes H3 (Bodor et al., 2014). Lorsque des gènes sont présents, ils se trouvent généralement dans des régions contenant des nucléosomes H3 plutôt que des nucléosomes CENP-A. Afin de comprendre la distribution tridimensionnelle des nucléosomes H3 et des

nucléosomes CENP-A dans la chromatine centromérique, des analyses de chromosomes mitotiques par microscopie électronique ont été réalisées. Il s'est avéré que les domaines contenant des nucléosomes CENP-A occupaient environ les 2/3 de la longueur, 1/3 de la hauteur et 1/3 de la largeur du site primaire de constriction du chromosome mitotique (Marshall et al., 2008). Des analyses de microscopie corrélative et de microscopie électronique à balayage (MEB) ont également montré que dans ces domaines les nucléosomes CENP-A sont exposés en surface des centromères, alors que les nucléosomes conventionnels sont plutôt placés en profondeur (Figure I.1–16).

Il s'avère que les marques H3K4me2 sont trouvées sur les nucléosomes H3 intercalés avec les nucléosomes CENP-A (Sullivan and Karpen, 2004). Cette marque est fréquemment associée à des régions promotrices. De plus, ces nucléosomes H3K4me2 sont souvent hypoacétylés et sont également enrichis avec l'histone variante H2A.Z (Greaves et al., 2007; Boyarchuk et al., 2014) (Figure I.1–16). L'enrichissement de l'histone variante H2A.Z au niveau de la chromatine centromérique varie selon les espèces et est très controversée. Chez les mammifères, H2A.Z se trouve déposée au niveau de la chromatine centromérique et péricentromérique, où elle joue un rôle clé dans l'organisation et la fonction du centromère (Greaves et al., 2007). La présence de la marque épigénétique H3K4me2 est importante pour le recrutement de la chaperonne HJURP au centromère et pour la maintenance de l'histone variante CENP-A au centromère pendant plusieurs divisions successives (Bergmann et al., 2011).

# I.1.6.1.2 Le péricentromère et la chromatine péricentromerique

La chromatine centromérique ne représente, chez l'homme, qu'entre 500 et 1500 kb (kilobases) d'ADN, alors que les séquences  $\alpha$ -satellites peuvent s'étendre sur plusieurs mégabases. La chromatine située de part et d'autre de la chromatine centromérique est désignée comme la chromatine péricentromérique.

Les péricentromères jouent un rôle important dans le contrôle de la ségrégation des chromosomes. Ensemble, les molécules de cohésine, de condensine ainsi que la chromatine péricentromérique apportent élasticité et résistance mécanique permettant la cohésion des deux chromatides sœurs (Labbé, 2005; Ribeiro et al., 2009). Au cours de la réplication cellulaire, les protéines cohésines se stabilisent et vont coller ensemble les deux chromatides sœurs sur toute leur longueur (Nasmyth and Haering, 2009). Une fois en anaphase, la résistance mécanique diminue rapidement par clivage protéolytique permettant à chacune des chromatides de migrer vers les deux pôles opposés de la cellule.

À la différence de la chromatine centromérique, caractérisée par la présence des nucléosomes CENP-A, la chromatine péricentromérique ne contient pas de CENP-A et présente un grand nombre de caractéristiques de l'hétérochromatine comme l'accumulation de la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), ainsi que la présence de marques épigénétiques telles H3K9me3, retrouvées sur les chromosomes murins et humains (Sullivan and Karpen, 2004). Au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique, l'histone variante H2A.Z colocalise avec la protéine HP1 ainsi qu'avec la protéine INCENP (*Inner centromere protein*) (Rangasamy et al., 2003; Fan et al., 2004).



Figure I.1–16 - Schéma de l'organisation générale de la chromatine centromérique et péricentromérique chez l'homme.

L'hétérochromatine centromérique est composée de blocs intercalés de nucléosomes CENP-A et de nucléosomes H3K4me2. La marque épigénétique H3K9me2 est présente sur le kinétochore interne, entre les deux chromatides sœurs ainsi que sur les régions entourant la chromatine CENP-A. De cette façon l'ensemble des nucléosomes CENP-A se retrouvent orientés vers la face externe des chromosomes mitotiques afin de pouvoir recruter les protéines du kinétochore externe (Sullivan and Karpen, 2004). De la même manière, les nucléosomes H2A.Z/H3K4me2 se retrouvent positionnés sur la face interne, au niveau de la jonction entre les deux chromatides sœurs (Greaves et al., 2007).

# I.1.6.2 Composants structuraux mis en place au cours de la mitose

Le kinétochore est une structure macroprotéique, constituée d'environ 200 protéines, qui s'assemblent au niveau du centromère lors de la mitose. Son but est de former une plateforme d'interface entre l'ADN contenu dans la chromatine centromérique et les microtubules du fuseau mitotique (Figure I.1–17).

La première caractérisation des kinétochores et l'étude de leur structure par microscopie électronique ont été réalisées dès la fin des années 60 (Jokelainen, 1967). Ces études ont montré que le kinétochore présente une morphologie trilamellaire révélant 3 régions : le kinétochore interne, externe et central. Le kinétochore interne s'assemble à la surface de la chromatine. À l'interface entre le centromère et la couche interne du kinétochore se trouve le complexe CCAN (*Constitutive Complex Associated Protein*). Il est constitué de 16 protéines au total (CENP-C, CENP-T-W-S-X, CENP-H-I-K-M, CENP-N-L, et CENP-O-P-Q-R-U), qui reconnaissent la chromatine centromérique et forment la plateforme d'assemblage du kinétochore (Figure I.1–17). Le kinétochore externe, d'une épaisseur de 50-60 nm, se compose de protéines situées du côté extérieur du kinétochore et qui sont donc impliquées dans l'attachement aux microtubules. Ces protéines forment le réseau KMN, réseau formé par les complexes Knl1, Mis12 et Ndc80 (Figure I.1–17). Enfin, le kinétochore central est une région dense aux électrons qui sépare les deux précédentes régions. A ce niveau se trouvent des protéines responsables du contrôle de l'attachement spatio-temporel des microtubules (Figure I.1–17). Cette interface est extrêmement dynamique et repose sur différentes interactions à différents stades du cycle cellulaire.



Figure I.1–17 – Modèle d'organisation structurale d'un kinétochore chez les vertébrés.

Le kinétochore est assemblé au niveau de la chromatine centromérique contenant des nucléosomes CENP-A. (a) Représentation schématique simplifiée des interactions protéiques entre les composants majeurs du kinétochore. Le kinétochore est formé en trois couches : interne, centrale et externe. Le nucléosome CENP-A recrute les composants du complexe du CCAN, constitué de 16 protéines (CENP-C, CENP-T-W-S-X, CENP-H-I-K-M, CENP-N-L, et CENP-O-P-Q-R-U). Les protéines CENP-C et CENP-N interagissent directement avec CENP-A. Les protéines CENP-T-W-S-X se lient à l'ADN via l'extrémité C-terminale de leur domaine *histone-fold* (HFD). Les protéines CENP-N-L et CENP-H-I-K-M permettent de réguler la fonction et la structure du centromère. CENP-I et CENP-C sont impliqués dans la l'incorporation de CENP-A dans la chromatine centromérique. CENP-H-I-K-M-L-N aident au recrutement de CENP-C et CENP-T, principalement dans les cellules en interphase. Les protéines CENP-C et CENP-T constituent de voies de secours au recrutement du kinétochore externe essentiel à l'attachement des microtubules. L'extrémité N-terminale de CENP-C lie le complexe Mis12, qui à son tour interagit avec le complexe protéique de liaison aux microtubules (Knl1 et Ndc80). (b) Liste de tous les composants du kinétochore fonctionnel (Nagpal and Fukagawa, 2016).

# I.1.7 Lien entre les pathologies impliquant les histones variantes CENP-A, H2A.Z et la mitose

Comme mentionné précédemment, l'histones variante CENP-A joue un rôle majeur dans la ségrégation chromosomique lors de la division cellulaire. Une perturbation de l'expression de CENP-A, ou son incorporation à un mauvais endroit de la chromatine, sont susceptibles de provoquer une ségrégation chromosomique défectueuse causant une aneuploïdie cellulaire. Ce phénomène d'aneuploïdie chromosomique est une caractéristique souvent rencontrée dans les cellules cancéreuses. L'histone variante CENP-A est présumée directement impliquée dans le

développement de certaines tumeurs où elle est surexprimée. Ceci a été démontré dans le cas du cancer colorectal, où l'histone variante CENP-A est surexprimée et par conséquent est incorporée de manière incorrecte au niveau des bras chromosomiques, ailleurs que sur les centromères (Tomonaga et al., 2003). La surexpression de l'histone variante CENP-A semble être la cause de la perte de la protéine du rétinoblastome (pRb) engendrant une instabilité génomique favorable au développement tumoral (Amato et al., 2009). L'analyse de cellules germinales prélevées sur des tumeurs testiculaires a mis en évidence CENP-A comme un des principaux marqueurs du développement de ce type de cancers, avec une augmentation de son expression d'un facteur 20 par rapport à un tissu testiculaire sain (Biermann et al., 2007).

L'histone variante H2A.Z semble être également impliquée dans la ségrégation chromosomique ainsi que lors de la progression du cycle cellulaire. Tout comme dans le cas de CENP-A, l'analyse de biopsies de cancer chez certains patients a montré une surexpression de l'histone variante H2A.Z, en particulier au stade métastasique. C'est le cas du cancer du sein, des poumons, de la prostate, de la vessie et du cancer colorectal (Vardabasso et al., 2014). De même, il a été reporté que l'isoforme H2AZ-2 pourrait être un vecteur du mélanome, dans lequel elle est surexprimée (Vardabasso et al., 2015, 2016).

De manière générale, les derniers résultats indiquent que les histones variantes, telles que CENP-A et H2A.Z, sont des acteurs potentiels de l'initiation et/ou de la progression des cancers. Depuis plusieurs années, un grand nombre de projets de recherche sont mis en place afin de disséquer le lien entre la structure et la fonction de chacune de ses histones variantes. En effet, cibler leur déposition ainsi que la machinerie de remodelage de la chromatine pourrait être une alternative thérapeutique dans un grand nombre de cancers.

# <u>Chapitre I.2</u> La peau : modèle choisi pour étudier le rôle de H2A.Z lors de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes épidermiques

# I.2.1 La peau, ses deux tissus et ses annexes

La peau est le plus grand des organes. Recouvrant la totalité du corps, sa superficie chez l'homme correspond à environ 2 m<sup>2</sup>. Son épaisseur variant de 1,5 à 4 mm, en fonction de la région anatomique, la peau représente 15% du poids corporel.

La peau crée une barrière de protection naturelle qui protège le milieu intérieur de l'organisme des agressions pouvant être causées par l'environnement. Elle protège l'organisme contre l'invasion par des agents infectieux tels que les microorganismes (bactéries, champignons, virus), évite les dommages dus à des agents environnementaux qui pourraient altérer l'intégrité du patrimoine génétique des cellules (UV, produits chimiques), et aussi protège de la déshydratation. La peau se compose de deux tissus, le derme et l'épiderme. Dans le derme, se trouvent les vaisseaux sanguins. L'épiderme repose sur le derme par l'intermédiaire de la lame basale et l'ensemble est supporté par l'hypoderme (Figure I.2–1). Constamment soumise à des contraintes physiques et chimiques, l'épiderme est composé de cellules appelées kératinocytes qui font l'objet d'un perpétuel renouvellement, les cellules mortes, totalement différenciées étant exfoliées. Ce phénomène est appelé « l'homéostasie » de l'épiderme.

Les mammifères sont caractérisés par la présence de poils à la surface de la peau. La peau des mammifères comporte des annexes, notamment les follicule pileux associés aux glandes sébacées, ainsi que des glandes sudorales, permettant la régulation thermique et l'excrétion des déchets (Figure I.2–1). Leur nombre ainsi que leurs caractéristiques varient en fonction de la région anatomique et du rôle qu'ils y jouent. Le muscle horripilateur du poil s'insère dans le tiers supérieur du follicule pileux (Figure I.2–1). Pour éviter les pertes de chaleur le muscle se contracte et permet au poil de se redresser. L'air qui se retrouve entre les poils est réchauffé par le corps et sert de couche tampon. Ce phénomène est retrouvé lors du frissonnement.



Figure I.2-1- Structure anatomique de la peau et de ses dérivés.

La peau est composée de 2 tissus qui sont, de la profondeur vers la surface le derme et l'épiderme, et repose sur un hypoderme. L'unité pilosébacée, constituée d'un follicule pileux et de deux glandes sébacées, s'invagine dans le derme. Le follicule pileux est divisé en 3 parties différentes de par leurs caractéristiques de prolifération (a), différenciation (b) et cornification (c). Les 2/3 inférieurs du follicule sont constamment renouvelés et constituent la zone de prolifération et de différenciation, au niveau du bulbe et au-dessus du bulbe respectivement. Les 1/3 supérieurs du follicule, comprenant le bulge, constituent la zone permanente du follicule pileux.

# I.2.1.1 L'hypoderme

Le compartiment le plus profond de la peau, situé sous le derme, est appelé hypoderme et consiste en un tissu adipeux lâche. Le tissu adipeux est divisé en lobules adipeux. Ces lobules adipeux contiennent les adipocytes, cellules spécialisées dans l'accumulation et le stockage des graisses, et sont séparés par des cloisons conjonctives par lesquelles passent un grand nombre de terminaisons nerveuses et de vaisseaux sanguins qui s'invaginent dans le derme (Figure I.2–1). Ainsi, l'hypoderme a un rôle de réserve énergétique et d'organe endocrinien. De par le coté isolant de la graisse, il joue un rôle essentiel dans la thermorégulation, mais également dans la protection contre les chocs mécaniques.

# I.2.1.2 Le derme

Le derme adhère fortement à l'épiderme par l'intermédiaire de la lame basale (Figure I.2– 3). Il provient des crêtes neurales, au niveau de la tête, et du mésoderme embryonnaire pour le reste du corps. Il est majoritairement composé de fibroblastes, mais abrite également des cellules immunitaires, entre autres, les macrophages, les lymphocytes et les cellules dendritiques. Le derme est un tissu conjonctif de soutien. Il est caractérisé par plusieurs types de fibres, les fibres de collagène, les fibres d'élastine ainsi que par des protéoglycanes. L'ensemble de ces protéines forment la matrice extracellulaire (MEC). Les fibres de collagène confèrent au derme sa résistance aux tractions, les fibres du système élastique lui donnent ses propriétés élastiques et les protéoglycanes sont responsables de sa résistance à la compression.

À la différence de l'épiderme, le derme est vascularisé (Figure I.2–1), ce qui lui permet non seulement d'apporter à l'épiderme l'énergie et les nutriments, mais aussi de jouer un rôle primordial dans la thermorégulation et la cicatrisation. Il est également pourvu d'un important réseau de terminaisons nerveuses. Les annexes de la peau (glandes sébacées, glandes sudoripares et follicules pileux) proviennent de l'épiderme, mais sont profondément ancrées dans le derme. Ce dernier est requis pour leur formation au cours de l'embryogénèse ainsi que pour leur renouvellement chez l'adulte.

Outre son épaisseur, il existe peu de différences anatomiques entre les dermes humain et murin, le premier étant le plus épais (Figure I.2–2)(Tableau I.2-1). Chez l'homme, des invaginations d'épiderme (*rete ridges*) s'intercalent avec des extensions du derme, dans le cas du derme papillaire. Ces structures permettent d'augmenter la surface d'interaction entre le derme et l'épiderme et par conséquent de renforcer l'attachement entre les deux tissus. Lorsque la peau est de fine épaisseur, au niveau du tronc, ces invaginations dermo-épidermiques sont peu nombreuses car ce sont des zones peu soumises aux frictions. Chez la souris, au niveau de ces mêmes régions il n'existe pas de *rete ridges* proéminentes. Cependant des structures similaires (*rete ridges-like*) se mettent en place lors du processus de cicatrisation après ulcération (Sundberg, 2004). Le pelage chez la souris protège leur peau du stress lié aux forces de friction, ce qui rend inutile la présence de *rete ridges*. En revanche, au niveau des coussinets plantaires, où la peau est plus épaisse et dépourvue de poils, on peut observer la formation de quelques-unes de ces structures (Sundberg, 2004).

La vascularisation ainsi que la densité du poil sont deux autres caractéristiques qui différent entre l'homme et la souris. Le derme humain est hautement vascularisé. Ce réseau vasculaire pénètre dans le derme profond et est particulièrement riche au niveau du derme papillaire. A l'opposé, le derme de souris est faiblement vascularisé et les vaisseaux les plus prédominants sont associés aux bulbes folliculaires (Sundberg et al., 2012).

# I.2.1.3 L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé, qui provient de l'ectoderme embryonnaire. Chez l'homme, son épaisseur varie entre 50 à 100 µm (peau fine) et 1 à 4 mm (peau épaisse) selon la localisation anatomique (Figure I.2–2). Chez la souris,

l'épiderme est moins épais et varie entre 10 à 15 μm (peau fine) et 70 à 80 μm (peau épaisse des coussinets plantaires) (Figure I.2–2)(Tableau I.2-1).



Figure I.2–2 - Principales différences entre l'épiderme dorsal humain (a) et l'épiderme dorsal murin (b,c) chez l'adulte.

Quatre types de cellules différentes composent l'épiderme. La grande majorité des cellules (90-95%) sont des cellules épithéliales nommées kératinocytes, mais il contient aussi des mélanocytes, ainsi que les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Chacun de ses quatre types cellulaires possède des fonctions qui leur sont propres. Les kératinocytes de la couche basale prolifèrent et se différencient progressivement pour former cinq couches différentes (Figure I.2–3). Cette prolifération permet l'homéostasie de la peau. Situés au niveau de la couche basale de l'épiderme, et envoyant des prolongements entre les kératinocytes, les mélanocytes synthétisent le pigment responsable de la couleur de la peau (la mélanine, contenu dans des mélanosomes) et protègent les kératinocytes des rayons ultra-violets. Les cellules de Langerhans sont des éléments essentiels du système de défense de l'organisme. Enfin, les cellules de Merkel jouent un rôle de mécanorécepteur et sont impliquées dans la fonction du toucher. Contrairement au derme, l'épiderme ne contient aucun vaisseau sanguin ni lymphatique. Il est strictement

L'épaisseur plus fine de l'épiderme de souris est notable (environ 10  $\mu$ m pour la souris et 150  $\mu$ m pour l'homme). Chez l'homme, l'épiderme (E) est épais et on visualise les différentes couches : couche basale (CB), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), couche cornée (CC). Chez la souris, noter la présence de nombreux follicules pileux (HF) et des glandes sébacées (SGs). Derme(D). Coloration HE (**a**) et HES (**b**, **c**).

dépendant du derme pour s'alimenter en oxygène et autres nutriments. Par ailleurs, il renferme de nombreuses terminaisons nerveuses libres.

Feature	Mouse	Human
Epidermal thickness of body (thin) skin Epidermal thickness of thick skin	Thin (10–15μm) Tail (70–80μm), footpad (150–400μm), muzzle (20–30μm), eyelid (50–60μm)	Thicker (50–100μm) Thicker (300–400μm) Palms of hands, soles of feet
Hair types: body	Guard Auschene Zigzag Awl	Vellus Terminal
Hair types: other	Cilia (eyelashes) Facial/muzzle (vibrissae, specialized somatosensory organ with blood-filled sinus) Perianal Distal limbs (vibrissae, specialized somatosensory organ with blood-filled sinus) Tail Ear	Cilia (eyelashes) Eyebrow Pubic Facial (beard, mustache) Axillary
Emergence of hair Hair cycle Tail and tail hairs	5 days postpartum Wave pattern with zones in adults Yes	19–21 weeks of gestation Mosaic pattern No
Sebaceous glands Modified sebaceous glands	Yes Meibomian glands Zymbal's gland Preputial gland Clitoral gland Perianal gland	Yes Meibomian glands Ceruminous glands
Eccrine glands Apocrine sweat glands	Yes; footpads Mammary glands; mice do not have ceruminous sweat glands.	Yes; entire body, including soles and palms Yes; axilla, genitoanal region, ceruminous glands, mammary glands

Tableau I.2-1- Différences entre la peau et les glandes annexes de l'homme et la peau de souris adulte, d'après (Sundberg, 2004).

# I.2.1.3.1 Couche basale

La couche basale constitue la strate la plus profonde de l'épiderme, au contact de la lame basale. Elle se compose d'une seule assise de kératinocytes de forme cubique ou cylindrique et dont le noyau de forme allongée est perpendiculaire à la jonction dermo-épidermique (JDE) (Figure I.2–3, b). Elle participe à la formation de la jonction dermo-épidermique par des hémidesmosomes (Figure I.2–6, b, c), ainsi que par la sécrétion entre autres de la laminine. Elle contient les cellules souches de l'épiderme. Par division asymétrique une cellule souche donne une cellule souche de remplacement et une cellule transiente qui va migrer et proliférer. Les kératinocytes basaux sont les seules cellules de l'épiderme mitotiquement actives. Cette caractéristique leur permet d'assurer, par des mitoses successives, le renouvellement de l'épiderme. En effet, afin d'être perpétuellement renouvelé l'épiderme doit maintenir un nombre relativement constant de cellules. Pour cela, les kératinocytes subissent un cycle cellulaire en 3 phases distinctes : la mitose, la différenciation et l'exfoliation.


Figure I.2-3 - Composition cellulaire de l'épiderme.

(a) L'épiderme est formé de cinq couches cellulaires successives qui sont, de la plus profonde à la plus superficielle, la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche de transition (qui existe seulement dans la peau épaisse) puis la couche cornée. (b) Composition de la jonction dermo-épidermique (JDE).

# I.2.1.3.2 Couche épineuse

Alors que la couche basale se compose seulement d'une seule assise de cellules, la couche épineuse est constituée chez l'homme de 3 à 4 assises de kératinocytes, dans les zones de peau fine, à 5 à 6 assises, dans les zones de peau épaisse (Figure I.2–2). Chez la souris la couche épineuse de la peau du corps ne compte qu'une seule assise de cellules (Figure I.2–2) (Sundberg et al., 2012) et 5 à 7 assises de cellules au niveau des coussinets plantaires. Les kératinocytes de la couche épineuse ont une forme polyédrique et un noyau arrondi. Les membranes cytoplasmiques des kératinocytes voisins sont plissées et fortement imbriquées les unes aux autres, d'où le nom de couche « épineuse ». Au niveau de cette couche se trouvent plusieurs types cellulaires autres que les kératinocytes, les mélanocytes, les macrophagocytes et les cellules de Langerhans.

### I.2.1.3.3 Couche granuleuse

La couche granuleuse est considérée comme une couche de transition. Elle sépare les couches épidermiques plus profondes « vivantes ou actives » de la couche cornée, la plus superficielle, dite « morte ». Chez l'homme, elle est composée de 3 à 5 strates de kératinocytes aplatis, avec un noyau parallèle à la jonction dermo-épidermique et un cytoplasme rempli de

granulations de kératohyaline. Les constituants de la cellule granuleuse sont profondément remodelés, pour finalement aboutir à la formation des cornéocytes de la couche cornée.

# I.2.1.3.4 Couche cornée

Chez l'homme, la couche cornée constituée en moyenne de 5 à 15 assises de kératinocytes anucléés et aplatis, nommés cornéocytes. Les cornéocytes sont éliminés en continu et remplacés par des cellules provenant des couches profondes. Chez l'homme et la souris ce processus dure approximativement 3 semaines (Houben et al., 2007).

Les cornéocytes sont des kératinocytes apoptotiques ayant subi un processus de maturation et de différenciation, nommé abusivement « kératinisation ». À la fin de ce processus, aussi appelé « différenciation terminale ». Les cellules vont perdre leur noyau et leurs organites intracellulaires. La résistance et la cohésion de la couche cornée est assurée par des structures spécialisées dérivées des desmosomes et appelées cornéodesmosomes.

# I.2.2 Les annexes cutanées

#### I.2.2.1 L'unité pilosébacée

# I.2.2.1.1 Le follicule pileux

Le follicule pileux est « l'usine » de fabrication du poil. Il s'accompagne en permanence de deux glandes sébacées et d'un muscle horripilateur. L'unité constituée de deux glandes sébacées et du follicule pileux se nomme unité pilosébacée (*PiloSebaceous Unit* ou PSU) (Nowak et al., 2008) (Figure I.2–4, a, b). Les glandes sébacées ne peuvent être dissociées des follicules pileux car le bon fonctionnement de ce dernier en dépend.

Le follicule pileux est implanté obliquement dans le derme par invagination de l'épiderme (Figure I.2–5). Les principales parties du follicule pileux sont la tige du poil (*Hair Shaft* ou HS), partie devenant visible à la surface de la peau et constituée de kératinocytes cornifiés, et la racine, partie enchâssée dans le derme et dont l'extrémité (le bulbe pileux) reçoit la papille vasculaire nourricière appelée papille dermique (*Dermal Papilla* ou DP) (Figure I.2–4, a, Figure I.2–5). Autour du bulbe pileux s'enchevêtrent des terminaisons nerveuses formant le plexus de la racine du poil (Figure I.2–1).

Observé longitudinalement, le follicule pileux est principalement divisé en trois compartiments du bas vers le haut du follicule (Figure I.2–1, a, b, c) qui sont respectivement les

compartiments de prolifération, de différenciation et de cornification. La zone de prolifération cellulaire si situe au 1/3 inférieur du follicule pileux et constitue le bulbe (Figure I.2–1, a). Audessus de ce compartiment et jusqu'à l'insertion du muscle horripilateur, se trouve la zone de différenciation cellulaire (Figure I.2–1, b). Dans le dernier compartiment les cellules entrent en phase de différenciation terminale, ou cornification (Figure I.2–1, c). La tige du poil va être poussée vers l'extérieur par la multiplication des cellules provenant du 1/3 inférieur. Ceci se passe au niveau de l'isthme, portion courte entre l'insertion du muscle horripilateur et le conduit des glandes sébacées. L'infundibulum est la région la plus superficielle et s'étend de l'entrée du conduit des glandes sébacées à l'épiderme interfolliculaire. C'est à ce niveau que la tige du poil, débarrassée de la gaine interne, fait irruption.

Le follicule pileux est essentiellement constitué de six à sept couches de kératinocytes organisés de manière concentrique. On trouve, de l'extérieur vers l'intérieur, la gaine externe (*Outer Root Sheath* ou ORS) formée d'une seule couche de cellules, en continuité avec la couche basale de l'épiderme. La gaine folliculaire externe contient les cellules souches dans sa partie supérieure (*Hair Follicle Stem Cells* ou HFSCs). La gaine folliculaire interne (*Inner Root Sheath* ou IRS) formée de trois couches de cellules, accompagne la croissance de la tige du poil et sera dissoute lors de son passage au niveau des glandes sébacées. Enfin, la tige du poil est formée de deux à trois couches de cellules composant la cuticule et le cortex accompagné ou non de la medulla (Figure I.2–4, a, e) (Coulombe et al., 1989; Sundberg et al., 2012). Les kératines et les protéines associées exprimées au niveau des différentes couches du follicule pileux diffèrent de celles exprimées dans l'épiderme interfolliculaire.

# I.2.2.1.2 La glande sébacée

Les glandes sébacées (*Sebaceous Glands* ou SGs) sont présentes sur tout le corps, à l'exception des paumes de mains et des plantes de pieds où il n'y a pas de poils. Souvent au nombre de deux, les glandes sébacées sont toujours annexées au poil et proviennent d'une seule formation embryonnaire, la placode (Figure I.2–9). Elles débouchent sur la partie supérieure de l'infundibulum du follicule pileux (Dhouailly and Oftedal, 2016).

Les glandes sébacées sont tapissées de cellules transientes (*Transit Amplifying Cells* ou TA) qui constituent une réserve de cellules pouvant se différencier en sébocytes. Les glandes sébacées sont des glandes exocrines. Elles sécrètent le sébum par mode holocrine (apoptose des sébocytes) dans l'infundibulum folliculaire. Composé de lipides et de débris cellulaires, le sébum joue le rôle de bactéricide, lubrifie le poil et imperméabilise la peau afin d'éviter son dessèchement. Le sébum est également riche en enzymes protéolytiques qui, lorsqu'elles sont déversées dans

l'infundibulum, « décortiquent » la tige pilaire de la gaine interne (IRS) et permettent la progression du poil vers la surface (Figure I.2–5) (Sundberg et al., 2012; Dhouailly and Oftedal, 2016). Un déficit dans les glandes sébacées provoque une alopécie cicatricielle progressive, c'està-dire une destruction du follicule pileux et son remplacement par des tissus cicatriciels menant à la perte permanente des poils.



Figure I.2-4 - L'unité pilosébacée se compose d'un follicule pileux et de deux glandes sébacées.

(a) Représentation schématique (à gauche) et coupe longitudinale d'un follicule pileux humain au stade anagène (à droite) (Coulombe et al., 1989). (b) Les deux glandes sébacées, SG (flèches) entourent la partie supérieure du follicule (infundibulum ; I). Le muscle horripilateur du poil, APM s'attache en dessous des glandes sébacées. Les sébocytes en prolifération (en périphérie) et en cours de différenciation (au centre) de la glande sébacée sont visibles dans l'encadrement. (c) Le bulbe du poil (HB) d'un follicule pileux humain au stade anagène. Au niveau de la papille dermique, les cellules de la matrice (de coloration bleu foncé) sont entourées par des mélanocytes (flèches). (d) Le muscle horripilateur du poil (APM) s'insère au niveau du bulge du follicule. Le site d'insertion est encadré. (e) Section transversale du follicule pileux (ligne en pointillés en (a)), tige du poil (HS). Adapté de (Sundberg et al., 2012).



Figure I.2-5 - Peau de souris montrant un follicule pileux au stade anagène du cycle du poil.

(a) Épiderme (E), derme (D), follicule pileux (HF) (encadrements), hypoderme (HD), muscle pannicule charnu (PCM). L'encadrement supérieur et inférieur du follicule sont respectivement élargis en (b) et (c). Sont représentés la coiffe de cellules de la papille dermique (C), la papille dermique (DP), la matrice (M), la ligne d'Auber (A), séparant les cellules non différenciées des cellules différenciées du bulbe, la membrane basale (BM) et le feuillet de la gaine externe (ORS). Adapté de (Sundberg et al., 2012).

# I.2.2.1.3 Les glandes sudoripares : eccrine et apocrine

Les glandes sudoripares sont des glandes exocrines. Implantées dans le derme profond (Figure I.2–1) elles proviennent d'une invagination de l'épiderme. De forme tubuleuse, elles conduisent de l'eau, des sels minéraux et des toxines jusqu'à l'extérieur de la peau. Leur rôle est de réguler la température du corps par l'intermédiaire de la transpiration. La production de sueur humidifie la surface de la peau et des poils, ce qui via l'évaporation abaisse la température corporelle. Chez l'homme il existe deux types de glandes sudoripares : les glandes « eccrines » et les glandes « apocrines ». Leurs localisations, leurs fonctions et la composition de la sueur qu'elles sécrètent sont différentes (Tableau I.2-1).

Les glandes eccrines (« eccrine sweat glands » ou ESGs) se situent majoritairement sur la paume des mains, sur la plante des pieds et sur le front. Leur canal excréteur débouche, dans le derme supérieur, par un canal intra-épidermique étroit et en spirale à la surface de la peau. Les glandes eccrines sont constituées d'un canal formé de deux couches de cellules, qui se poursuit par une portion sécrétrice tubulaire et super-enroulée dans le derme inférieur. La portion sécrétrice est constituée d'une couche externe de cellules myoépithéliales reposant sur une lame

basale et d'une couche interne de cellules sécrétrices luminales (Lu and Fuchs, 2014; Dhouailly and Oftedal, 2016).

Les glandes apocrines (« apocrine sweat glands » ou ASGs) sont localisées sous les aisselles, autour de l'anus et des mamelons, elles sont généralement plus grosses que les glandes eccrines et leurs conduits débouchent dans l'infundibulum du follicule pileux. Alors qu'elles sont très nombreuses chez l'homme, elles sont absentes chez la souris, qui ne possèdent que des glandes eccrines. Ces dernières débouchent sur les pelotes plantaires. Les secrétions de sueur interviennent dans le marquage de territoire ; elles contiennent en effet des substances chimiques propres à l'individu, chaque animal laissant une trace sur le sol, reconnaissable par tous les autres.

# I.2.3 La composition de l'épiderme

# I.2.3.1 Les filaments intermédiaires : les kératines

Le cytosquelette des cellules est constitué de polymères de protéines classés en trois catégories : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires (*Intermediate Filaments* ou IFs). Ces derniers mesurent 8 à 10 nm de diamètre les classant entre les microfilaments d'actine et les microtubules. Ce sont les éléments les moins dynamiques et les plus résistants du cytosquelette de la cellule. Ces propriétés leurs confèrent un rôle primordial dans le maintien de l'architecture des cellules épithéliales et plus particulièrement dans le maintien du noyau et l'ancrage des organites cellulaires.

Les filaments intermédiaires font partie d'une grande famille de protéines, très conservées au cours de l'évolution. La régulation des gènes correspondants se fait de manière spécifique en fonction du tissu et du stade de différenciation cellulaire. Il existe 5 sous-types de filaments intermédiaires (type I-V), qui diffèrent par le type de protéines fibrillaires: les filaments de type I et II (kératines), les filaments de type III (vimentine, protéines fibrillaires des cellules gliales (GFAP), desmine), les filaments de type IV (neurofilaments (NF)) ainsi que les filaments de type V (lamines) (Fuchs and Weber, 1994). Les lamines constituent le cytosquelette soutenant la membrane nucléaire et s'expriment de manière ubiquitaire dans tous les types cellulaires. La nature des filaments intermédiaires est variable d'un type de cellule à l'autre, la vimentine étant typique des fibroblastes, les neurofilaments des neurones et les cytokératines des cellules épithéliales.

Les kératines font partie du plus grand et du plus complexe sous-groupe des filaments intermédiaire (Moll et al., 2008). On les trouve dans les différents types de cellules épithéliales et plus spécifiquement dans les cellules épidermiques ainsi que les annexes épidermiques,

glandes, cheveux, poils et ongles. On distingue les kératines de type I, relativement petites (40-56,6 KDa) et acides (pKi=4.5-5.5), et les kératines de type II, plus lourdes (52-67 KDa) et plus basiques (pKi=5.5-7.5). Il existe 54 gènes codant pour les kératines, hautement conservés au cours de l'évolution, dont 28 de type I et 26 de type II. Parmi les 28 gènes codant pour les kératines de type I, 17 sont des kératines épithéliales et 11 sont des kératines du cheveu. De la même façon, parmi les 26 gènes codant pour les kératines de type II, 20 sont des kératines épithéliales et 6 sont des kératines du cheveu (Schweizer et al., 2006).

Les gènes codant pour les kératines de type I et II sont regroupés sur les chromosomes 17q21.1 et 12q13.13 respectivement à l'exception du gène codant pour la kératine 18 de type I qui est localisée à côté du gène *Krt8* sur le cluster du type II (Hesse et al., 2004).

Les kératines sont exprimées par paires formant des hétérodimères de chaînes polypeptidiques acides (type I) et basiques (type II) (Fuchs and Weber, 1994), suivant un rapport de 1/1. Un seul type de kératine ne permet pas de former de filament de kératines. Le passage des kératinocytes de la couche basale à la couche épineuse est caractérisé par un changement d'expression des kératines de la couche basale (K5, K14, K15) vers celle les kératines épidermiques des couches suprabasales (K1, K10).

Des mutations des gènes des kératines sont susceptibles de diminuer considérablement la résistance des filaments ou d'annihiler la formation de ces dernières, selon la région du polypeptide concernée. Ces mutations provoquent la fragilité des cellules et par conséquent des tissus. Il existe trois principaux exemples de troubles cutanés impliquant des mutations des gènes codant pour les kératines, ou kératinopathies : l'épidermolyse bulleuse simple (EBS), l'hyperkeratose épidermolitique (HKE) et la kératodermie épidermolytique palmo-plantaire (PPK), ainsi que la pachyonychie congénitale (PC) qui se traduisent par l'apparition de cloques cutanées (Fuchs and Weber, 1994; Knöbel et al., 2015).

#### • Épidermolyse bulleuse simple (EBS) :

Les kératinocytes composant la couche basale d'un épiderme squameux stratifié et kératinisé sont liés les uns aux autres par des desmosomes qui eux-mêmes sont attachés aux filaments intermédiaires de kératine K5 et K14 (Figure I.2–6, a, c). Des mutations sur les gènes codant pour les kératines 5 ou 14 sont responsables de l'apparition de divers sous-types d'épidermolyse bulleuse simple (EBS) se caractérisant par une fragilité mécanique des cellules basales qui vont se décoller les unes des autres et créer des cloques. Les maladies bulleuses peuvent également être dues à des mutations portant sur l'un des constituants de la jonction dermo-épidermique (Figure I.2–6, c).

• Hyperkératose épidermolytique (HKE) :

Des mutations sur les gènes codant pour les kératines K1 et K10, exprimées par les cellules suprabasales de l'épiderme, causent l'hyperkératose épidermolytique. Ce trouble cutané se caractérise par un érythroderme, une hyperkératose et un détachement des couches suprabasales de l'épiderme. Une hyperprolifération des kératinocytes résulte en des lésions ichtyosiformes particulièrement visibles sur des zones de flexion.

• Kératodermie épidermolytique palmo-plantaire (EPPK) :

La kératine 9 est caractéristique des cellules suprabasales de l'épiderme palmo-plantaire. Des mutations touchant cette kératine entrainent une peau hyperkératotique au niveau des plantes et des palmes.

• Pachyonichie congénitale (PC) :

C'est un groupe de génodermatoses causées par des mutations des kéraines : K6, de K16 et de K17. Les individus affectés développent un kératoderme plantaire douloureux, une hypertrophie dystrophique des ongles, une leukokératose orale et des cystes épidermiques.



Figure I.2-6- Les filaments intermédiaires de kératine sont impliqués dans le maintien des adhésions cellulaires.

(a-b) Les desmosomes. (a) Représentation schématique d'un desmosome. (b) Microscopie électronique de l'adhésion de deux portions de cellules de la couche épineuse de l'épithélium de la joue d'hamster caractérisé par la présence de desmosomes (J.T. Albright and M.A. Listgarten). (c-d) Les hémidesmosomes. (c) Représentation schématique d'un hémidesmosome. (d) Adhésion d'une portion de cellule basale de l'épithélium de larve *salamander Ambystoma punctatum* caractérisée par la présence d'hémidesmosomes régulièrement espacés (E. Hay). Adapté de ('The Cell, 2nd Ed.' by Don W. Fawcett M.D.).

# I.2.3.2 Les kératinocytes de la couche basale

Deux populations de kératinocytes différentes ont été identifiées au niveau de la couche basale de l'épiderme : les cellules souches (*Stem Cells* ou SCs) et les cellules d'amplification transitoires (*Transit Amplifying Cells* ou TA). Afin de maintenir un nombre de cellules constant dans leur réservoir, les cellules souches vont se diviser de manière symétrique ou asymétrique.

Lors de la division symétrique, la cellule mère se divise en deux cellules filles identiques qui adoptent le même destin. Ainsi, soit la cellule souche mère donne deux nouvelles cellules souches, processus d'auto-renouvèlement des cellules souches, soit la cellule souche mère donne deux cellules qui vont se différencier (Moore and Lemischka, 2006).

Le maintien du nombre de cellules souches constant est préférentiellement expliqué par la division asymétrique, selon laquelle la cellule souche mère se divise et donne une cellule souche et une cellule d'amplification transitoire (TA). Il existe deux types de divisions asymétriques. Le fuseau mitotique peut être perpendiculaire ou parallèle à la lame basale. Au cours du développement embryonnaire de la peau, les cellules souches se divisent de manière asymétrique avec un plan de division perpendiculaire à la lame basale (Blanpain and Fuchs, 2009). Lorsque les cellules épidermiques se divisent perpendiculairement, une des deux cellules filles reste attachée à la lame basale et l'autre éloignée, débute la différenciation terminale. En revanche chez l'adulte, les cellules souches se divisent encore de manière asymétrique, mais selon un plan de division parallèle à la lame basale, donnant deux cellules filles qui restent transitoirement sur la couche basale (Blanpain and Fuchs, 2009). Une des deux cellules est maintenue dans le réservoir de cellules souches alors que l'autre se détache de la lame basale et initie un programme de différenciation, appelé abusivement « kératinisation » ou mieux différenciation terminale (Lechler and Fuchs, 2005; Blanpain and Fuchs, 2009).

# I.2.3.3 La différenciation terminale

### I.2.3.3.1 Changements structuraux

L'expression des kératines est caractéristique du type d'épithélium ainsi que du stade de différenciation des cellules épithéliales et en font des marqueurs de choix pour distinguer les différentes sous-populations cellulaires (Fuchs, 2008a). Elle peut être hautement modulée par les phénomènes de cicatrisation, d'infection ou de maladie cutanée (Toivola et al., 2015).

Les kératinocytes situés au niveau de la couche basale expriment la paire de kératines K5 (type II), K14 (type I) ainsi qu'une faible quantité de K15 (type I) (Fuchs and Green, 1980). Ces kératines s'expriment spécifiquement dans les kératinocytes des couches basales des épithéliums stratifiés et des follicules pileux humains et murins, ainsi que dans la langue, la cornée et l'œsophage. La paire K5/K14 est considérée comme le marqueur biochimique de référence de la couche basale des épithéliums squameux stratifiés.

Lors de l'initiation de la stratification de l'épiderme, les kératinocytes arrêtent de proliférer, se détachent de la lame basale et entament le processus de différenciation. Les cellules vont subir des changements morphologiques et modifient l'expression de marqueurs spécifiques tout en migrant au travers du compartiment suprabasal. L'expression des kératines K5 et K14 diminue au dépend de l'expression de la paire de kératines K1(type II) et K10 (type I) qui elles sont spécifiques de la couche épineuse (Figure I.2–7) (Fuchs and Green, 1980; Byrne et al., 1994; Houben et al., 2007). Les kératinocytes vont perdre l'expression de récepteurs tyrosine kinase, tels que les récepteurs à l'EGF, à l'IGF, au TGF- $\beta$ , mais également celle de marqueurs de prolifération tels que p63 (Blanpain and Fuchs, 2007; Fuchs, 2008). Les kératinocytes de la couche épineuse expriment la protéine involucrine. Lors du passage des kératinocytes de la couche épineuse vers la couche granuleuse, les kératinocytes subissent un fort aplatissement, l'expression d'involucrine (Figure I.2–7) diminue et des granules de kératohyaline commencent à s'accumuler (Figure I.2–7) (Matoltsy, 1975). Les granules de kératohyaline contiennent de la profilaggrine et de la loricrine. La profilaggrine est un polymère qui se scindera ensuite en filaggrine (Figure I.2–7), permettant l'agrégation des filaments de kératine en câbles macrofibrillaires, rendant le cytosquelette plus rigide et résistant. La loricrine se retrouvera ensuite attachée sous la membrane plasmique, formant une couche de protection de 10 mm d'épaisseur (Figure I.2–7) (Steven et al., 1990).

Au niveau de la couche cornée, les kératinocytes apparaissent aplatis. Ils perdent leur noyau et leurs organites, laissant place à une enveloppe cornée très rigide, résistante et imperméable. Celle-ci est formée grâce à la libération d'enzymes protéolytiques (transglutaminases) qui catalysent les liaisons isopeptidiques à partir de différents précurseurs protéiques, entre autres l'involucrine et la loricrine. La filaggrine est également protéolysée en acides aminés polaires libres, en acide urocanique, en acide pyrrolidone carboxylique (PCA), qui constituent des composants hydratants naturels en surface de la couche cornée, aussi appelés « natural moisturing factors » ou NMF (Fuchs, 2008). Au niveau du pôle apical des cellules granulaires, les corps lamellaires fusionnent avec la membrane plasmique et vont libérer leur contenu lipidique dans l'espace inter-cornéocytaire. Ces lipides vont s'associer en lamelles qui vont se superposer de façon parallèle aux cornéocytes afin de former un « ciment » qui rend la peau imperméable (Madison et al., 1987).



Figure I.2–7 - Caractérisation de la différenciation terminale de l'épiderme.

Coupes de peau de queue de souris après immuno-marquage, montrant la distribution des marqueurs protéiques caractéristiques des différentes couches de l'épiderme. HF : follicule pileux, E : épiderme, D : derme, CB : couche basale, CE : couche épineuse, CG : couche granuleuse, CC : couche cornée. Adapté de (Sundberg et al., 2012).

# I.2.3.3.2 Changements morphologiques

Le processus de différenciation terminale s'accompagne d'une activation ou d'une abolition de l'expression de certains groupes de gènes. De plus, ce processus montre des différences dans l'organisation micro-anatomique du noyau, en comparaison avec les cellules de la couche basale. Lors de la différenciation terminale se produit une diminution du volume nucléaire, une internalisation et une diminution du nombre de nucléoles, ainsi qu'une augmentation du nombre de clusters d'hétérochromatine péricentromérique.

# I.2.4 L'embryogénèse de la peau et du follicule pileux

# I.2.4.1 Le développement de l'épiderme inter-folliculaire et son maintien chez l'adulte

L'embryogénèse de la peau est un processus divisé en plusieurs étapes: la spécification, l'engagement, la stratification, la différenciation terminale de l'épiderme, ainsi que la morphogénèse de ses annexes, follicule pileux, glandes sébacées et sudoripares (Liu et al., 2013). Les différentes étapes ont été étudiées chez l'embryon de souris (Figure I.2–7 et Figure I.2–8).

#### a. La spécification de l'ectoderme

La première étape du développement de l'épiderme est la spécification de l'ectoderme embryonnaire à partir du neuroectoderme. Les cellules mésenchymateuses envoient des signaux (Wnt, FGF et BMP) au neurectoderme afin d'orienter cette spécification en neuroderme ou en ectoderme. En absence de signaux Wnt, la voie BMP est inhibée et les cellules s'orientent vers la formation du neuroderme, alors qu'en présence de signaux Wnt, le neurectoderme répond aux signaux BMP et les cellules s'orientent vers la formation d'ectoderme. L'ectoderme embryonnaire consiste en un épithélium simple composé d'une seule couche de cellules aplaties exprimant le couple de cytokératines 8 et 18 (K8/K18). L'ectoderme est à l'origine du futur épiderme, ainsi que des annexes cutanées, dont les follicules pileux, les glandes, dont les glandes sébacées, les glandes sudoripares, les glandes mammaires et de l'épithélium cornéen des glandes lacrymales. À 8.5 jours de gestation (E8.5) la surface ectodermique est recouverte par le périderme qui exprime également K8 et K18 (Figure I.2–8) (Byrne et al., 1994). Son rôle est de créer une barrière de protection pendant la stratification initiale de l'épiderme. Il sera dégradé à environ 17.5 jours de gestation.

#### b. L'engagement de l'ectoderme en épiderme

Les dates données ci-après correspondent au développement de la région dorsale, qui se déroule en avance sur la région ventrale. A E9.5, les cellules ectodermiquess remplacent l'expression du couple de cytokératines K8/K18 par l'expression du couple K5/K14 (Byrne et al., 1994). Ce remplacement est à l'origine de l'engagement des cellules ectodermiques dans la lignée de cellules épidermiques. L'épiderme embryonnaire primitif est une monocouche de cellules cubiques qui persiste jusqu'à 12.5 jours de gestation (E12.5) (Figure I.2–8) (Byrne et al., 1994). Celle-ci donnera, les jours suivants, naissance à toutes les structures de l'épiderme adulte, tandis qu'une lame basale sous-jacente se mettra en place.

#### c. La stratification de l'épiderme

Le processus de stratification de l'épiderme commence à 12.5 jours de gestation (E12.5). À E14.5, les cellules de la couche basale, ont proliféré et formé une couche intermédiaire, située entre la couche basale et le périderme. Puis la maturation de l'épiderme se fait entre E15.5 et E19.5 (Figure I.2–8). À E17.5 la stratification est pratiquement terminée, la couche intermédiaire comprend deux à trois assises de cellules qui se différencient, formant la couche épineuse, qui

exprime le couple de cytokératines K1/K10 (Byrne et al., 1994). Les cellules épineuses vont continuer de se différencier et vont migrer en surface afin de former la couche granuleuse. A partir de E18, l'épiderme consiste en une couche de cellules basales capables de proliférer, ainsi qu'en plusieurs couches de cellules suprabasales en cours de différenciation ou différenciées, formant successivement la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (Figure I.2–8) (Liu et al., 2013). La couche granuleuse exprime l'involucrine et les transglutaminases et la couche cornée exprime la filaggrine et la loricrine (Jetten and Harvat, 1997). La couche cornée est constituée de cellules mortes, aplaties, anuclées, permettant de créer la barrière qui caractérise l'épiderme. Notons qu'à la naissance de la souris, l'épiderme est relativement épais sur l'ensemble du corps. Chez l'embryon de souris à E17,5, l'épaisseur de l'épiderme est composée de 4 à 5 cellules (Figure IV.4–1). Lorsque le pelage commence à se développer, l'épiderme s'amincit rapidement pendant les deux premières semaines après la naissance (Sundberg et al., 2012). Chez la souris adulte, l'épiaseur de l'épiderme se compose de 1 à 2 cellules (10 à 15 μm) et reste constante tout au long de la vie de la souris (Figure IV.3–4, Figure IV.3–6) (Sundberg et al., 2012).



Figure I.2-8 - Développement de la peau dorsale de l'embryon de souris (Liu et al., 2013).

Le facteur de transcription p63 est un membre de la famille des gènes p53 (p53, p63 et p73). Il existe deux isoformes majeurs de p63 : ΔNp63 et TAp63 (Yang et al., 1998). Chez l'embryon à 8.5 jours de gestation, l'expression de p63 est détectée en aval de K5/K14, deux des premiers marqueurs de différenciation épithéliaux. P63 est un facteur de transcription essentiel au développement et à la stratification de l'épiderme. En effet, les nouveau-nés p63<sup>-/-</sup> ne développement pas un épiderme stratifié mais un épiderme formé d'une seule couche (Yang et al., 1999). P63 continue d'être exprimé au cours du développement embryonnaire de la peau, mais au fur et à mesure de la maturation de l'épiderme son expression se restreint au compartiment basal. Chez l'adulte l'expression du facteur de transcription p63 est prédominante au niveau basal où il participe à la maintenance du compartiment basal, où il est majoritairement exprimé (Yang et al., 1998; Truong and Khavari, 2007). Il a été démontré par la suite que le facteur p63 est un facteur clé du maintien du réservoir des cellules souches (Pellegrini et al., 2001). Il a été démontré que l'expression de p63 est reliée à la capacité proliférative des cellules, la région où l'expression de p63 est la plus forte correspond à la localisation des cellules TA jeunes, puis son expression diminue dans les cellules TA âgées, ce qui permet à ces dernières de s'engager dans le processus de différenciation terminale jusqu'à la mort des cellules (Pellegrini et al., 2001; Koster and Roop, 2004).

# I.2.4.2 Le follicule pileux

Les cellules permettant le développement du follicule pileux ainsi que le développement des deux glandes sébacées qui l'accompagnent pour former l'unité pilosébacée (PSU), proviennent de la couche basale de l'épiderme embryonnaire. La morphogénèse du follicule pileux débute à environ 14.5 jours de gestation et fait l'objet de plusieurs étapes successives (Figure I.2–9).

#### a. Placode et condensation dermique

Les cellules de la couche basale sont à l'origine de la placode, formant un épaississement de l'épiderme. Les kératinocytes basaux sont verticalement polarisés avec la partie proximale dirigée vers la couche cornée et la partie distale dirigée vers le derme. Rapidement, les cellules mésenchymateuses vont s'accumuler sous la placode et forment une condensation, à l'origine de la papille dermique (*dermal papilla* ou DP) (Figure I.2–9) (Dhouailly and Oftedal, 2016).

## b. Germe du poil (*Hair Peg* ou HP)

Les interactions epithélio-mesenchymateuses stimulent les cellules épithéliales afin de former un bourgeon qui va s'allonger et pénétrer dans le derme, c'est le germe du poil (*Hair Germ* ou HG). Il se caractérise par une forme plus allongée, avec la partie distale arrondie et protégée par la condensation dermique.

### c. Cône du poil (Hair Cone ou HC)

Le germe du poil comprend ensuite un cône du poil (*Hair Peg* ou HP) dont l'extrémité proximale élargie est concave alors que les cellules qui sont situées au-dessus dégénèrent et sont repoussées vers la surface (Figure I.2–9) (Dhouailly and Oftedal, 2016). Dans le creux du follicule naissant, la condensation dermique forme la papille dermique qui s'entoure de kératinocytes de la matrice. Au même moment, un épaississement de la partie proximale du follicule donne naissance au bulbe.

# d. L'unité pilo-sébacée

Les kératinocytes centraux sont disposés en colonnes concentriques entourant l'axe vertical du follicule. Les kératinocytes basaux de l'épiderme sont à l'origine de la gaine folliculaire externe (*Outer Root Sheath* ou ORS), ainsi que de la matrice du poil. À la base du follicule pileux, dans le bulbe, les kératinocytes de la matrice (TA) prolifèrent et forment la gaine folliculaire interne (*Inner Root Sheath* ou IRS) ainsi que la tige du poil (*Hair Shaft* ou HS).

A ce stade, les glandes sébacées sont complètement formées et se composent de sébocytes. L'IRS, contenant la tige du poil, se dirige vers le canal du poil en direction de la surface de l'épiderme. Les enzymes protéolytiques secrétées par les sébocytes digèrent l'IRS et permettent au poil de sortir dans le canal du poil et d'émerger.



Figure I.2-9 - La formation du follicule pileux au cours de l'embryogénèse, de la placode jusqu'à l'unité pilosébacée.

# I.2.5 Les cellules souches

# I.2.5.1 Les cellules souches de l'épiderme

L'épiderme interfolliculaire contient des cellules souches résidant dans la couche basale et adhérant à la membrane basale. Elles permettent le renouvellement continu des cellules suprabasales en cours de différenciation terminale et des cellules mortes de la couche cornée qui sont éliminées à la surface. Chez l'adulte, deux populations de kératinocytes différentes ont été identifiées au niveau de la couche basale de l'épiderme : les cellules souches (*Stem Cells* ou SCs) et les cellules d'amplification transitoires (*Transit Amplifying Cells* ou TA).

Les cellules souches (SCs) sont peu nombreuses et ne représentent que 1% des kératinocytes basaux. Elles sont dotées d'un fort potentiel de prolifération et d'une capacité à régénérer l'ensemble des couches de l'épiderme, mais les TA sont celles qui prolifèrent. La vitesse de prolifération des SCs et des cellules TA est différente. Les cellules souches sont quiescentes, bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire elles se divisent rarement, alors que le cycle de division des cellules TA est fréquent (Mascré et al., 2012). Cependant, le nombre de divisions des cellules TA est limité puis elles s'engagent dans un programme de différenciation terminale (Mascré et al., 2012).

Les cellules souches génèrent, à chaque division, soit deux cellules souches filles identiques (division symétrique) soit une cellule souche fille et une cellule fille TA, qui après quelques divisions s'engagera dans le processus de différenciation (division asymétrique).

Alors que les SCs sont multipotentes, pouvant donner différents types cellulaires, les cellules TA sont unipotentes et ne sont capables de proliférer et de se différencier qu'en un seul type cellulaire, le kératinocyte des couches suprabasales. Les études pionnières réalisées ont montré que les cellules souches se situent à la base d'unités prolifératives épidermiques (EPU) (Allen and Potten, 1974).

# **I.2.5.2** Le cycle du poil et les cellules souches folliculaires

Lors de la vie postnatale, la croissance du follicule pileux se déroule en 3 phases cycliques successives : la phase anagène, la phase catagène, et la phase télogène (Figure I.2-10). La portion inférieure du follicule (2/3 inférieurs) est celle qui subit le plus de transformations lors de ce cycle. La phase anagène correspond à la phase de croissance continue du poil et est caractérisée par une activité mitotique intense au niveau du bulbe. Les cellules matricielles (Transient Amplifying Cells ou TA), prolifèrent et se différencient afin de former l'IRS ainsi que la tige du poil. Cette phase est également associée à la production de la mélanine. En moyenne, cette phase dure environ 2 à 3 semaines, la durée de ce cycle variant en fonction de l'espèce et de la région anatomique étudiée (Müller-Röver et al., 2001). Les follicules pileux de souris ne restent pas longtemps dans cette phase, le temps nécessaire à la production d'un poil d'une longueur définie par la région anatomique où il se situe. Une fois la capacité de différenciation des cellules matricielles épuisée, arrive la phase catagène de transition, pendant laquelle la prolifération s'arrête. Cette phase dure environ 2 semaines chez l'homme et 2-4 jours chez la souris (Müller-Röver et al., 2001; Sundberg et al., 2012). Au cours de cette phase, les 2/3 inférieurs du poil (bulbe et IRS) subissent une apoptose massive. Le follicule pileux va régresser et se raccourcir ce qui permet de ramener la papille dermique au plus près du bulge. La phase télogène correspond à une phase de repos où les cellules de la matrice (TA) sont inactives et le follicule s'atrophie. La plupart des follicules pileux murins adultes demeurent en phase télogène pour de très longues périodes (1-2 jours et 3 semaines pour la première et deuxième phase télogène respectivement) ce qui explique la longueur constante des poils de souris adulte (Müller-Röver et al., 2001). En revanche, chez l'homme à l'âge adulte, le follicule se trouve le plus souvent en phase anagène (phase de croissance). Chez l'homme, les cheveux poussent continuellement durant une période qui varie entre 3 et 7 ans selon le sexe et les individus. En moyenne le cycle de vie du cheveu chez l'homme serait en général de 3 ans, alors que les femmes ont des cycles plus longs (entre 4 et 7 ans).

La régénération de la portion cyclique du poil, après la phase catagène, nécessite un réservoir de cellules souches. Ces cellules souches résident dans le 1/3 supérieur de l'unité pilosébacée mature, où se trouve la portion non-cyclique du poil, et précisément dans la gaine folliculaire externe (ORS). Celle-ci héberge deux types cellulaires : les cellules souches du follicule (Hair Follicle Stem Cells ou HFSCs) et les cellules souches de la glande sébacée. Elles sont localisées dans le bulge du follicule pileux ainsi que dans une niche particulière du bulge, le germe du poil (Hair Germ HG). Dans les années 2000, des expériences ont démontré que les cellules du bulge étaient multipotentes, pouvant être à l'origine de la formation des glandes sébacées, de l'épiderme et des nouveaux follicules pileux. Ce sont des cellules quiescentes qui se divisent très lentement, mais lorsqu'un nouveau cycle de régénération du poil débute les HFSCs et plus particulièrement les cellules du germe du poil vont être activées afin de proliférer. Les cellules du germe sont les premières activées car pendant la phase télogène ce sont les plus proches de la papille dermique, elles perçoivent les signaux mésenchymateux déclenchant la nouvelle phase anagène. Ces cellules, à la base du bulge, vont générer les cellules d'amplification transitoires (TA) qui alimentent la matrice du poil dans le bulbe. Après plusieurs cycles de divisions, les TA se différencient en direction de la surface afin de former la tige et la gaine interne (IRS), et ainsi régénérer la portion cyclique du follicule pileux (Blanpain and Fuchs, 2009; Fuchs, 2016).



Figure I.2–10 – Après le développement du premier follicule pileux, au cours de l'embryogénèse, la croissance du poil, chez l'adulte, est cyclique.

Le cycle du follicule pileux se déroule en 3 phases : anagène, catagène et télogène. Adapté de (Blanpain and Fuchs, 2009).





Les HFSCs situées dans le bulge sont multipotentes et résident dans la portion permanente du follicule. Les cellules souches de l'épiderme interfolliculaire sont multipotentes et résident dans la couche basale de l'épiderme. Les cellules TA résidentes de l'isthme et des glandes sébacées se localisent dans la gaine folliculaire externe (ORS). Les cellules d'amplification transitoire (TA) résident dans la matrice et sont alimentées par les HFSCs du bulge.

Chez l'homme la croissance du poil se fait par vagues *in-utero* et les premiers poils émergent à la surface de la peau à environ 24 semaines de gestation, puis les cycles chez l'adulte se produisent en mosaïque à la surface du corps (Sundberg et al., 2012). Chez la souris les premiers poils émergent 5 jours après la naissance (Müller-Röver et al., 2001). Le premier cycle du poil postnatal commence aux alentours de la 2<sup>ème</sup> semaine après naissance où la croissance du follicule pileux suit le cycle folliculaire composé d'une phase anagène (croissance), d'une phase de régression (catagène) ainsi que d'une phase de repos (télogène) (Figure I.2–10, b). Chez la souris, les cycles folliculaires se synchronisent et se déroulent par vagues définies comme une progression ordonnée dans le temps et dans l'espace, des follicules pileux entrant dans la phase anagène. Les différentes vagues de croissance adoptent une configuration cyclique régionale s'étendant de la région antérieure vers la région postérieure et de la région ventrale vers la région dorsale (Figure I.2–12) (Chase and Eaton, 1959; Müller-Röver et al., 2001).



Figure I.2–12 – Suivi de la propagation des vagues de régénération du follicule pileux sur la peau ventrale d'une souris adulte, pendant 93 jours (Plikus and Chuong, 2008).

# I.2.6 Identification des cellules souches

# I.2.6.1 Technique de rétention cellulaire (*Label-retaining cells* ou LRCs)

Plusieurs techniques ont été développées dans le but de pouvoir identifier et étudier les cellules souches de l'épiderme adulte comme, entre autres, la technique de rétention cellulaire (label-retaining cells ou LRCs) utilisée par C.S Potten lors de ses travaux pionniers (Potten et al., 1974). Ces cellules sont visualisées grâce à la technique du « pulse-chase ». La phase de pulse consiste en l'administration continue d'analogues de nucléotides (BrdU, bromodésoxyuridine, 3H-thymidine, thymidine tritiée) qui s'intègrent dans l'ADN en phase de réplication. Cette phase permet de marquer l'ensemble des cellules ayant traversé la phase S du cycle cellulaire. La période d'attente (chase) est plus ou moins longue et consiste une incubation dans un milieu dit froid, contenant le même précurseur, mais cette fois-ci non radio-marqué. La plupart des cellules en phase active de prolifération perdent leur marquage par dilution. Les cellules d'amplification

transitoire (TA) se divisent rapidement et vont donc diluer le marquage alors que les souches adultes se divisent plus lentement et retiennent le marquage. C'est la raison pour laquelle les cellules souches sont appelées *Label-Retaining Cells* (ou LRCs). Elles ont été identifiées, chez la souris au niveau de la région permanente du follicule pileux (bulge), par Cotsarelis et ses collaborateurs (Cotsarelis et al., 1990). Fuchs et ses collaborateurs ont adapté cette dernière technique afin de visualiser l'histone H2B couplé au fluorochrome GFP (H2BGFP) (Tumbar, 2004).

# I.2.6.2 Détection et isolation des HFSCs

Depuis plusieurs années, différentes populations de cellules souches ont été identifiées dans différentes niches. Malgré leur localisation différente, les cellules souches de l'épiderme et de l'unité pilosébacée partagent un certain nombre de caractéristiques. Tout d'abord elles résident toutes au niveau de la couche basale de l'épiderme, interagissent avec la lame basale et expriment fortement les kératines K14, K5 et les intégrines ( $\alpha$ 6 $\beta$ 4 et  $\alpha$ 3 $\beta$ 1) (Figure I.2–13), ainsi que p63 (Fuchs, 2008).

Depuis plusieurs années différents autres marqueurs ont été identifiés dans le bulge mais également dans le germe du poil tels que Sox9 (Nowak et al., 2008), K15 (Morris et al., 2004)(Troy et al., 2011), K19 (Youssef et al., 2010), Lgr5 (Jaks et al., 2008), gli1 (Liu et al., 2013) (Figure I.2–13).

Au cours du développement embryonnaire de la peau, à E12, toutes les cellules de la couche basale sont prolifératives. Lors de la formation des placodes, les cellules qui gardent leur caractère embryonnaire ségrégent pour donner lieu aux différentes populations de cellules souches « adultes », localisées dans le bulge (HFSCs). Ces cellules permettront de renouveler le poil, ainsi que les glandes sébacées. Noter que les HFSCs « adultes » expriment Sox9, cependant leur cycle cellulaire est lent et elles sont quiescentes, alors que les SCs embryonnaires, à l'origine du bourgeon du poil, expriment Sox9 mais sont hautement prolifératives (Yi, 2017). Selon leur localisation, ces cellules souches « adultes » expriment des marqueurs spécifiques. Les HFSCs du bulge peuvent être identifiées par l'expression, entre autres, des marqueurs K15, de CD34, Sox9. Les HFSCs du second germe du poil, permettant la pousse du nouveau poil, expriment également la K15 (Plikus et al., 2012). Les SCs du germe de poil sont Lgr5+, les SCs des glandes sébacées sont Lrig1+ et les SCs de l'épiderme sont Lgr6+ (Figure I.2–13) (Plikus et al., 2012; Schepeler et al., 2014).

Les HFSCs peuvent également contribuer au renouvellement de l'IFE en cas de besoin de cicatrisation rapide (Plikus et al., 2012). Autour de la zone de cicatrisation, les cellules souches

de l'infundibulum et de l'isthme (Lrig1+ et Lgr6+), ainsi que les cellules du bulge (K15+) vont s'activer et générer des cellules d'amplification transitoire (TA) qui migrent du follicule et participent à la re-épithéalisation de l'épiderme. Cependant, alors que les cellules souches du bulge (K15+) ne permettent de donner que des cellules TA, qui ne vivront pas longtemps, les cellules souches de l'isthme et de l'infundibulum (Lrig1+ et Lgr6+) génèrent des clones de cellules souches. Ceci a pour conséquence la perte progressive des HFSCs du bulge si le besoin de cicatrisation s'avère être long (Plikus et al., 2012).

Après la mise au point de la technique des LCRs par Cotsarelis et ses collaborateurs (Cotsarelis et al., 1990), de nouvelles méthodes ont été développées afin d'isoler spécifiquement les cellules souches du follicule pileux (HFSCs) en couplant l'utilisation de marqueurs spécifiques avec la technologie du FACS (cytrométrie en flux). Le *Cluster de différentiation 34* (CD34) est l'une des premières protéines identifiées qui est exprimée à la surface membranaire des cellules souches hématopoïétiques. C'est une protéine transmembranaire impliquée dans la localisation et l'adhérence des progéniteurs hématopoïétiques dans leur niche, la moelle osseuse. Lors de la différentiation, l'expression de CD34 est perdue. Jusqu'à présent, CD34 reste le marqueur le plus fiable et le plus utilisé afin d'enrichir les cellules souches du bulge (Figure I.2–13 et Figure I.2–14) (Schepeler et al., 2014). Par la suite, Morris et ses collaborateurs ont créé une lignée de souris qui exprimaient la protéine GFP sous le promoteur de la kératine 15 (Figure I.2–14) (Morris et al., 2004). Il a par la suite été démontré que les HFSCs positives pour la kératine 15 dans le bulge et dans le germe du poil fluoresçaient en vert et qu'elles co-localisaient avec l'expression du marqueur membranaire CD34. Les autres populations de cellules souches et de cellules TA du follicule pileux peuvent également être isolées et triées par la même méthode.



Figure I.2–13 - Émergence des différentes populations de cellules souches au cours du développement de l'unité pilo-sébacée.

(a) Les cellules souches initiales expriment différents marqueurs de manière concomitante (Lrig1, Lgr6, Sox9). Au cours des différents stades du développement de l'unité pilo-sébacé et de la ségrégation des différentes lignées de cellules, l'expression de certains marqueurs devient de plus en plus spécifique d'une région. Les cellules de plusieurs couleurs expriment des marqueurs multiples. (b) Le follicule pileux adulte (télogène) est constitué de différentes populations de cellules souches. Chacun des compartiments est caractérisé par l'expression de marqueurs spécifiques. Adapté de (Schepeler et al., 2014)).



Figure I.2–14 - Localisation de l'expression du marqueur membranaire CD34 et de la kératine 15 dans les follicules pileux murins.

(a) Marquage avec un anticorps anti-CD34 de peau de souris dorsale. Le follicule en en phase telogène. La flèche indique les cellules exprimant CD34. (b) Marquage avec un anticorps anti-K15 de peau de souris dorsale. La flèche indique les kératinocytes du bulge exprimant K15. Barre d'échelle : 100µm. Adapté de (Schepeler et al., 2014).

# I.2.7 Les dermatoses

Une dérégulation du contrôle de la prolifération, de la différenciation ou de l'apoptose peut entrainer une perturbation de l'homéostasie de l'épiderme, et aboutir à l'apparition de plusieurs troubles cutanés (Jetten and Harvat, 1997). Je détaillerai ci-après deux d'entre eux, le psoriasis et le mélanome.

# I.2.7.1 Psoriasis et l'hyperprolifération de l'épiderme

Le psoriasis est une maladie inflammatoire systémique et chronique due à une dérégulation immunitaire. La prévalence de cette maladie est grande puisqu'elle affecte entre 3 à 5% de la population européenne. Du fait de ses origines multifactorielles cette affection est d'aspect clinique polymorphe et possède une grande variété de localisations corporelles. Un grand nombre d'organes sont touchés et plus particulièrement la peau, les articulations, le système cardiovasculaire et les muqueuses, se traduisant par une inflammation du derme et de l'épiderme ainsi que par un renouvellement excessif des cellules de l'épiderme. Cette maladie non contagieuse, ne se guérit pas et les traitements connus permettant seulement de freiner ou de résorber l'inflammation associée.

Les kératines K6 (type II) et les kératines K16, K17 et K19 (toutes de type I) ont une expression limitée dans l'épithélium sain. Par contraste, les kératines K6, K16 et K17 sont fortement induites dans les maladies chroniques impliquant une hyperprolifération de l'épiderme (Navarro et al., 1995; Leigh et al., 1995). La prolifération excessive des cellules d'amplification transitoire (TA) est une des caractéristiques morphologiques du psoriasis.

L'analyse phénotypique de l'expression de marqueurs caractéristiques de la prolifération et de la différenciation cellulaire, tels que la K15, l'intégrine  $\beta$ 1 et le Ki67, dans des modèles de souris mimant des conditions d'hyperprolifération telles que le psoriasis, a montré qu'en général « l'activation » des kératinocytes résulte d'une diminution de la transcription du gène codant pour la kératine 15 (Bose et al., 2013; Jia et al., 2016).

Le niveau d'expression de l'intégrine  $\beta$ 1 à la surface des cellules de la couche basale est impliqué dans le contrôle de la transition des cellules basales vers les cellules suprabasales. Les cellules souches de la couche basale expriment très fortement l'intégrine  $\beta$ 1 et adhérent fortement à la lame basale. Les cellules TA, au contraire, ont une expression de l'intégrine  $\beta$ 1 moindre, perdent leur adhésion à la lame basale, migrent dans le compartiment suprabasal et vont entamer le programme de différenciation terminale, qui s'accompagne d'une diminution de la transcription de K15 et une augmentation de celle de K10 (Figure I.2–15) (Jia et al., 2016). Ces derniers résultats montrent que la kératine 15 ne reflète pas seulement la présence de cellules souches ou de cellules TA dans la couche basale, mais reflète également la réponse de cellules basales à une perte d'homéostasie et à une entrée dans un programme de différenciation terminale. Pour cette raison, l'utilisation du marquage de la K15 seul afin de caractériser et d'isoler les cellules souches est controversé, et il est préférable de l'utiliser en concomitance avec le marquage CD34. Dans les tissus psorasiques on observe un déséquilibre entre les divisions cellulaires perpendiculaires et parallèles à la lame basale. Le pourcentage de ségrégations asymétriques perpendiculaires est significativement accru, en comparaison avec les ségrégations parallèles (Jia et al., 2016). L'inhibition des cellules souches hyperactives présente une cible thérapeutique potentielle afin de combattre l'hyperplasie épidermique psoriasique.



Figure I.2-15 - Caractéristiques moléculaires d'une peau humaine psoriasique.

Les coupes histologiques montrent une hyperplasie de l'épiderme et un élargissement flagrant du compartiment des cellules TA dans l'épiderme psoriasique (K15-/K10 +/ intégrine  $\beta$ 1 faible/ Ki67+) accompagné d'une diminution du nombre de cellules souches (K15+/K10 -/ int $\beta$ 1+/Ki67+). Adapté de (Jia et al., 2016).

# I.2.7.2 Le mélanome et l'implication des histones H2A.Z

Le mélanome, ou tumeur mélanocytaire, est le plus souvent un cancer de la peau et des muqueuses qui se développe à partir des mélanocytes. Chaque année, l'incidence de ce cancer augmente de plus de 2%, mais dans certains pays ce pourcentage tend à se stabiliser du fait des changement d'habitude d'exposition au soleil. La mortalité liée aux mélanomes cutanés a tendance à diminuer du fait que la plupart des mélanomes détectés sont de petite taille et de meilleur pronostic. Malgré leur faible incidence, les mélanomes cutanés sont plus dangereux que les carcinomes car ils ont un potentiel métastatique élevé.

De nombreuses études ont été réalisées dans le but de caractériser et de cibler des mutations génétiques dans le mélanome et ainsi de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces études ont montré une implication particulière de la régulation épigénétique, tels que celle des histones, dans la pathogénicité du mélanome (Vardabasso et al., 2014)(Vardabasso et al., 2016). L'histone variante macroH2A est, entre autres, un suppresseur de tumeurs dans le mélanome par l'intermédiaire de la régulation de la CDK8 (*cyclin-dependent kinase 8*) (Kapoor et al., 2010). De plus, les histones variantes H2A.Z-1 et H2A.Z-2 sont été mentionnées comme étant fortement

exprimées dans un certain nombre de cancers dont le mélanome, et cette forte expression de H2A.Z-1 et H2A.Z-2 est corrélée avec un très faible taux de survie des patients. Cependant des analyses plus poussées d'invalidation génique ont permis de faire la distinction entre les rôles de chacune des isoformes, H2A.Z-1 et H2A.Z-2. L'invalidation génique de H2A.Z-2 provoque l'arrêt des cellules du mélanome en phase G1/S, alors que celle de H2A.Z-1 non. Ainsi, H2A.Z-2 est la seule de ces deux isoformes directement impliquée dans le mélanome. H2A.Z-2 est donc essentiel à la prolifération cellulaire (Vardabasso et al., 2015).

La protéine BRD2 (*bromodomain-containing protein* 2) est également surexprimée dans le mélanome. Elle forme un complexe avec H2A.Z-2. Il semblerait que H2A.Z-2 recrute BRD2 ainsi que deux facteurs de transcription, E2F1 et E2F4, connus pour être essentiels à la progression du mélanome et des métastases (Alla et al., 2010; Vardabasso et al., 2015). Les cibles des facteurs de transcription E2Fs sont surtout des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et donc dans la prolifération. Ainsi, l'axe H2A.Z-2-BRD2-E2Fs conduit à la progression du mélanome (Vardabasso et al., 2015).

La structure cristallographique de la chaperonne ANP32E, permettant l'éviction de H2A.Z, complexée avec le dimère H2A.Z-H2B est connue depuis quelques années (Obri et al., 2014). Il serait intéressant de synthétiser des médicaments qui permettraient d'inhiber la formation de ce complexe et de dégrader ensuite l'histone variante H2A.Z soluble. Ceci pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique permettant d'éviter la progression du mélanome ainsi que la résistance éventuelle à des chimiothérapies existantes.

# I.2.8 Contrôle épigénétique du développement et de l'homéostasie de la peau

Comme mentionné précédemment, l'organisation structurale de la chromatine joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique. Ainsi, pendant que les cellules souches (SCs) prolifèrent et se différencient, la structure de la chromatine subit un processus de remodelage dynamique afin de réguler l'expression génique. Pendant le remodelage de la chromatine, l'ADN ainsi que les histones subissent un certain nombre de modifications qui donnent à la chromatine un profil épigénétique caractéristique. Parmi ces modifications on trouve la méthylation de l'ADN, mais aussi des modifications post-traductionnelles des queues d'histones (méthylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation) et l'incorporation de histones variantes. Celles-ci vont contribuer à la régulation de la transcription lors de l'engagement des cellules souches dans un programme de différenciation pendant l'embryogenèse ou dans un programme de régénération tissulaire chez l'adulte. Depuis plusieurs années il a été démontré que le variant d'histone H2A.Z joue un rôle crucial et spécifique dans la régulation de la structure chromatinienne au cours du développement (Kapoor et al., 2010) mais également lors de certaines pathologies (Chen et al., 2013). Depuis peu de temps les liens entre certains facteurs de remodelage de la chromatine et la plasticité des cellules souches, déterminant le destin cellulaire au cours de l'homéostasie et la régénération tissulaire, commencent à émerger. La peau est un excellent modèle afin d'étudier le contrôle épigénétique des cellules souches adultes, SCs et HFSCs, leur auto-renouvèlement et leur différenciation.

Les cellules souches embryonnaires (ESCs) présentent une structure chromatinienne dynamique caractérisée par un état hypomethylé (H3K4/K9/K27me3) de l'ADN, où la chromatine se trouve extrêmement compactée. Cet état hypométhylé semble être essentiel au maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvèlement des ESCs. En effet, les régions des promoteurs des gènes Oct4 et Nanog, en plus de la présence de H2A.Z, sont au départ hypométylées, puis sont hyperméthylées pendant la différenciation des ESCs (Berdasco and Esteller, 2011). Ainsi, le changement du profil de méthylation des promoteurs d'un certain groupe de gènes est un facteur clé de la différenciation en une lignée cellulaire donnée. Pendant la phase catagène du cycle du poil, les cellules souches folliculaires (HFSCs) en quiescence (G0) sont hypométhylés (H3K4/9/27me3) avec un faible niveau d'expression des ARNs messagers des HMTs (*histone methyltransferases*), Ezh2 (H3K27me3), Suv39 h2 (H3K9me3) et Setd1b (H3K4me3), suggérant une haute plasticité cellulaire (Lee et al., 2016). Les cellules souches vont alors soit s'auto-renouveler dans le bulge soit se différencier afin de devenir des cellules TA du germe du poil et enfin des cellules de la matrice et de la gaine folliculaire interne (IRS).

La pluripotence et l'auto-renouvèlement des cellules souches embryonnaires de souris (mESCs) sont régulés par des facteurs extrinsèques, comme le LIF (*Leukemia inhibitory factor*), BMP (*bone morphogenetic protein*) et les membre de la famille Wnt (*wingless-type integration site familly*), et intrinsèques comme Oct4, Nanog et Sox2. En l'absence de Oct4, Nanog et Sox2 les cellules souches embryonnaires se différencient (Hyslop et al., 2005). L'étude pangénomique des ESCs a montré que l'incorporation de l'histone variante H2A.Z au niveau des séquences promotrices et amplificatrices permet d'améliorer l'accessibilité de la chromatine à certains facteurs de transcription essentiels au maintien de l'état pluripotent des ESCs et de leur auto-renouvèlement comme Oct4 (Hu et al., 2013). Nanog est un autre facteur de transcription qui agit en coopération avec le complexe Oct4-Sox2 afin de diminuer l'expression des gènes impliqués dans la différenciation et d'augmenter l'expression des gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence. L'analyse biochimique des partenaires directs de Nanog a révélé une interaction directe de Nanog avec l'histone variante H2A.Z. Wang et ses collaborateurs ont démontré que

l'invalidation génique de H2A.Z, *in-vitro*, induit la différenciation des ESCs non seulement par le biais de la régulation de l'accessibilité aux régions promotrices et amplificatrices, mais également par le biais de la modulation directe de la quantité de protéines Nanog (Wang et al., 2015).

# I.2.9 Limites de l'utilisation du modèle souris pour l'étude de la peau et de son extrapolation à l'homme

Les follicules pileux murins et humains partagent des caractéristiques essentielles en ce qui concerne leur structure et leur fonction. De plus, ils sont constitués par les mêmes types cellulaires et leurs cycles respectifs alternent entre des phases de croissance active (anagène), de régression (catagène) et de quiescence ou de repos (télogène) (Figure I.2–10). Cependant, l'étude du développement et de l'homéostasie des follicules pileux murins ne peut pas toujours être extrapolée à l'homme. En effet, certaines caractéristiques du follicule pileux de souris ne sont pas retrouvées à l'homme.

C'est le cas par exemple de la localisation des cellules souches. Alors que les cellules souches du follicule pileux murin se trouvent localisées au niveau du bulge, seule région identifiée comme étant un réservoir de cellules souches, le follicule pileux en phase anagène chez l'homme contient deux réservoirs, un sur le 1/3 supérieur et un sur le 1/3 inférieur de l'ORS. Ces deux régions vont fusionner pendant la transition catagène-télogène et réapparaissent sur le nouveau poil en phase anagène (Commo et al., 2000). De la même façon, en ce qui concerne les marqueurs spécifiques des HFSCs murines, il n'est pas certain qu'ils puissent tous être extrapolés aux HFSCs humaines (Purba et al., 2014).

Enfin, le cycle du follicule pileux, chez la souris et chez l'homme, présente également de nombreuses différences. Chez la souris, le cycle des follicules pileux est synchronisé entre tous, ne dure que quelques semaines, et la transition entre les phases anagène-télogène et telogène-anagène s'accompagne d'un profond remodelage tissulaire impliquant l'hypoderme (Festa et al., 2011). Chez l'homme, en revanche, le cycle des follicules pileux est asynchrone, et les follicules pileux peuvent fonctionner de 3 à 7 ans (voir section I.2.2.1.1).

# **II.Objectifs**

Quel est le mécanisme de transmission des informations épigénétiques ? Les histones variantes ainsi que les complexes permettant leur assemblage dans les nucléosomes pourraient en être le support.

Chaque cellule eucaryote exprime, en plus des histones de cœur conventionnelles, des histones variantes. Les histones peuvent faire l'objet de modifications post-traductionnelles qui influent sur les relations locales de la chromatine avec le complexe de transcription, c'est à dire sur l'état transcrit ou non-transcrit de chaque gène. Il semblerait que ces modifications post-traductionnelles, sur les queues N-terminales des histones, puissent être transmises lors d'une division cellulaire et permettre ainsi de propager des informations épigénétiques.

Les histones variantes pourraient transmettre aux cellules filles lors d'une division cellulaire des informations épigénétiques et notamment les divers états de la chromatine. Le remplacement d'une histone canonique par sa forme variante peut induire une déstabilisation ou au contraire une stabilisation du nucléosome sur la fibre chromatinienne rendant ainsi plus ou moins possible l'accessibilité de l'ADN aux complexes protéiques actifs de la transcription, de la réparation, etc. Les histones variantes seraient des facteurs épigénétiques qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des propriétés structurales et fonctionnelles du nucléosome et de la chromatine. Par conséquent, les histones variantes seraient impliquées dans de multiples états cellulaires tels que la différenciation, l'embryogenèse, le cancer, ou le vieillissement.

Les données scientifiques disponibles jusqu'à présent suggèrent que, chacune des histones variantes H2A.Z-1 et H2A.Z-2, et de façon générale l'histone variante H2A.Z, pourraient être impliquées dans divers évènements cellulaires tels que la transcription, la réparation de l'ADN ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaire. L'histone canonique H2A peut être remplacée par l'histone variante H2A.Z dans certaines régions de la chromatine. L'histone variante H2A.Z appartient à la famille de l'histone H2A et s'exprime sous la forme de deux isoformes, H2A.Z-1 et H2A.Z-2, qui diffèrent par seulement 3 acides aminés et sont codés par deux gènes distincts, respectivement H2afz et H2afv.

La fonction de H2A.Z a été, jusqu'ici, analysée surtout grâce à des techniques *in-vitro* de culture cellulaire. Peu d'informations sont disponibles concernant le rôle de H2A.Z *in-vivo* dans différents organes, dû au manque de modèles animaux permettant le l'invalidation conditionnelle (aussi appelée knock-out ou KO) de H2A.Z. Le premier objectif de mon projet de thèse a donc été d'établir un modèle murin permettant d'invalider les deux gènes H2afz et H2afv, afin de disséquer la fonction de H2A.Z *in-vivo*.

J'ai utilisé comme modèle d'étude la peau. La peau est un organe très intéressant car l'épiderme est en perpétuel renouvellement. Il est à la fois en constante prolifération (tissu mitotique), mais aussi en constante différenciation (tissu post-mitotique), ce qui permet d'analyser le rôle de H2A.Z dans ces deux processus. Le but de ma thèse a été de comprendre les effets de l'absence de H2AZ-1 et de H2AZ-2 sur la prolifération et sur la différenciation cellulaire, en prenant comme modèle les kératinocytes épidermiques. Afin de comprendre la fonction particulière de l'histone variante H2A.Z lors de la mitose, j'ai, au début de mon projet de thèse, créé de nouveaux et uniques modèles de souris transgéniques de knock-out conditionnel (KO) permettant l'invalidation deux gènes H2afz (H2A.Z-1) et H2afv (H2A.Z-2). La particularité de ces modèles est que l'invalidation conditionnelle est tissu-spécifique, au niveau de l'épiderme. En effet, ces souris expriment sous le contrôle des promoteurs des gènes K14 ou K5 (K14CreERT2 ou K5Cre), spécifiques de la couche basale de l'épiderme, une Recombinase-Cre, et vont ainsi par différentes méthodes exciser les séquences flanquées par deux sites loxP, et donc les gènes H2afz et H2afv. Mon projet a ensuite consisté en la caractérisation cellulaire et moléculaire du phénotype développé par les souris KO pour H2afz et H2afv.

Mes derniers résultats me permettent d'avancer l'hypothèse selon laquelle l'histone variante H2A.Z jouerait un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie de la peau par le biais de la régulation de la mitose et donc de la prolifération. Le but suivant sera d'identifier les mécanismes sous-jacents mis en jeux par l'histone variante H2A.Z au cours de la mitose. Mon projet de thèse s'inscrit donc dans un projet complètement nouveau et innovant qui fait face à des problèmes fondamentaux non seulement dans le domaine de l'épigénétique fonctionnelle, mais également dans la compréhension de l'altération des fonctions de H2A.Z dans différentes maladies, telles que le cancer.

# III.Matériel et Méthodes
### **<u>Chapitre III.1</u>** Expérimentation animale

### III.1.1 Élevage et création des lignées de souris transgéniques

### III.1.1.1 La lignée murine transgénique (KI/cKO) H2A.Z-1 et la lignée murine transgénique (KI/cKO) H2A.Z-2

Les lignées de knock-out conditionnel (cKO) pour H2afz, codant pour l'histone variante H2A.Z-1, et de knock-out conditionnel (cKO) pour H2afv, codant pour la l'histone variante H2A.Z-2, ont été générées à l'Institut Clinique de la Souris (ICS) à Illkirch. Ces deux lignées proviennent de souris C57BL/6N et ont été créées en utilisant les approches standards de génétique par recombinaison homologue (Figure III.1–1).

Deux séquence loxP ont été ajoutées, par recombinaison homologue, de part et d'autre des exons 2-4 pour le gène H2afz (Figure III.1–1, a) et des exons 4-5 pour le gène H2afv (Figure III.1–1, b). Les génotypes des souris de chacune des lignées sont respectivement H2afz <sup>fl/fl</sup> et H2afv <sup>fl/fl</sup>. Lorsque les souris expriment une Recombinase-Cre, cette enzyme reconnait les sites loxP et la séquence positionnée entre ces deux sites sera excisée (Figure III.1–1). Le génotype de ces souris est alors H2afv <sup>-/-</sup> et H2afv <sup>-/-</sup> respectivement (Figure III.1–1). Cette excision conduit à la perte de l'expression des protéines H2A.Z-1 et H2A.Z-2 respectivement. C'est le principe de l'invalidation génétique par la technique de Knock-out conditionnel.



Figure III.1–1- Représentation schématique des constructions génétiques des souris génétiquement modifiées (H2afz<sup>fl/fl</sup> et H2afv<sup>fl/fl</sup>). Les souris cKO pour les gènes H2afz et H2Afv ont été créées en insérant deux séquences loxP de part et d'autre des exons 2-4 et 4-5 des gènes H2afz et H2afv. L'invalidation génétique des gènes H2afz et H2afv est obtenue suite à l'expression de la Recombinase-Cre. Celle-ci reconnait ses sites spécifiques loxP et excise les séquences d'ADN flanquées.

Lignées de souris initiales	Établissement d'origine
H2afz <sup>fl/fl</sup> (nommée H2A.Z-1)	Institut Clinique de la Souris, Illkirch
H2afv <sup>fl/fl</sup> (nommée H2A.Z-2)	Institut Clinique de la Souris, Illkirch
K14CreER <sup>T2 tg/+</sup> (nommées K14Cre)	Dr. Daniel Metzger
(Tg(KRT14-cre/ERT2)1Ipc)	Institut de génétique et de biologie
(Indra et al., 2000)	moléculaire et cellulaire (IGBMC), Illkirch
K5Cre <sup>tg/+</sup> (nommée K5Cre)	Dr. Aurélie Chiche
(Tg(KRT5-cre)5132Jlj)	Institut Pasteur, Plasticité cellulaire e
(Ramirez et al., 2004)	modélisation des maladies, Paris
Rosa26 <sup>fl/fl</sup> -TdTomato <sup>fl/fl</sup> -GFP	
(nommée mTmG)	
(Gt(ROSA)26Sor <sup>tm4(ACTB-tdTomato,-</sup>	The Jackson Laboratory, USA
GFP)Luo/J)	
(Muzumdar et al., 2007)	

Tableau III.1-1- Lignées de souris utilisées en élevage afin de créer les lignées à expérimenter

# III.1.1.2 La lignée murine transgénique permettant la double invalidation conditionnelle (cKO) de H2afz et de H2afv

Grâce aux deux lignées transgéniques H2afz et H2afv, j'ai créé une lignée de souris permettant la double invalidation conditionnelle de H2afz et H2afv, à la Plateforme de Hautes Technologies Animales de Grenoble (PHTA). Pour ce faire, les souris porteuses du gène H2afz floxé ont été croisées avec celles porteuses du gène H2afv floxé. Le génotype de ses souris est donc H2afz<sup>fl/fl</sup>; H2afv<sup>fl/fl</sup> et toutes les cellules provenant de ces souris ont le même génotype. Pour simplifier la nomenclature, on appellera cette lignée de souris H2A.Z-1 ; H2A.Z-2.

### III.1.1.3 La lignée murine transgénique permettant la double invalidation conditionnelle (cKO) de H2afz et de H2afv spécifiquement sur la peau

Les souris précédemment générées, H2afz<sup>fl/fl</sup>; H2afv<sup>fl/fl</sup>, ont été croisées à leur tour avec des souris K14CreER<sup>T2</sup> (K14Cre<sup>tg/+</sup>). Le transgène K14CreER<sup>T2</sup> permet l'expression d'une Recombinase-Cre ER<sup>T2</sup> inductible, par l'injection de tamoxifène, spécifiquement au niveau des cellules K14+ dans la couche basale de l'épiderme. De la même manière, les souris H2afz<sup>fl/fl</sup>; H2afv<sup>fl/fl</sup> ont été croisées avec des souris K5Cre (K5Cre <sup>tg/+</sup>). Ce transgène K5Cre permet l'expression d'une Recombinase-Cre constitutive spécifiquement au niveau des cellules K5+ dans la couche basale de l'épiderme. La Recombinase-Cre constitutive, comme son nom l'indique, n'a pas besoin d'être induite par le tamoxifène. Le génotype de ses souris est donc H2afz <sup>fl/fl</sup> H2afv <sup>fl/fl</sup> K14/K5 <sup>tg/+</sup> ou <sup>+/+</sup>. Pour simplifier la nomenclature, on appellera cette lignée de souris H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K14/K4Cre.

### III.1.1.4 La lignée murine transgénique double H2A.Z-1 H2A.Z-2 Rosa26mTmG K5Cre

Les souris **Gt** (**ROSA**)26Sor<sup>tm4(ACTB-tdTomato,-GFP)Luo/J proviennent du fournisseur *The Jackson Laboratory* et sont une lignée congénique de souris C57BL/6J (B6.129(Cg)). Par soucis de simplification, cette lignée est également appelée mTmG (*The Jackson Laboratory* n°007676) (Muzumdar et al., 2007). La lignée de souris mTmG contient un gène rapporteur de l'activité de la Recombinase-Cre nommé Rosa26 combiné aux deux fluorochromes Tomato et GFP exprimés à la membrane plasmique. Le génotype de ces souris est Rosa <sup>fl/fl</sup>- tdTomato<sup>fl/fl</sup>-GFP (voir page 126). Pour simplifier la nomenclature, on appellera cette lignée de souris mTmG.</sup>

Dans le but de pouvoir suivre l'activité par épifluorescence de la Recombinase-Cre dans mon modèle d'invalidation conditionnelle de H2afz<sup>fl/fl</sup>; H2afv<sup>fl/fl</sup>, j'ai créé, également à la PHTA, une nouvelle lignée de souris par le croisement de la lignée H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K5Cre et de la lignée mTmG. Le génotype de ses souris est donc H2afz<sup>fl/fl</sup> ; H2afv<sup>fl/fl</sup> ; Rosa<sup>fl/fl</sup>-tdTomato<sup>fl/fl</sup>-GFP ; K5Cre<sup>tg/+ ou +/+</sup>. Pour simplifier la nomenclature, on appellera cette lignée de souris H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; mTmG ; K5Cre.

La gestion des lignées s'effectue avec l'aide du logiciel Mayakind. Les lignées de souris transgénique en élevage sont présentes à l'animalerie de la Plateforme de Hautes Technologies Animale de Grenoble (PHTA) et les lignées de souris transgéniques utilisées pour l'expérimentation sont présentes à l'Animalerie de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB). Les projets ont été validés par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'innovation (MESRI) auprès duquel nous avons obtenu les autorisations de projets #6525 et #7785. Ces projets d'expérimentation des animaux ont également été approuvés par le Comité d'éthique en expérimentation animale de Grenoble auprès duquel nous avons obtenu respectivement les agréments n°336 et n°353.

### III.1.2 Protocole d'invalidation conditionnelle des gènes H2afz et H2afv chez les souris

# III.1.2.1 L'invalidation des gènes H2afz et H2afv a été réalisée à différents stades de développement de la souris

Lors du knock-out chez l'adulte, les souris utilisées étaient toutes âgées de 6 à 8 mois. Le protocole d'injection de tamoxifène consiste en 1 injection à 0,1mg/souris, toutes les 24 heures et ceci pendant 5 jours consécutifs.

Pour l'étude de l'impact de la perte d'expression de H2A.Z sur la formation de la peau au cours de l'embryogénèse, nous avons utilisé des souris gravides âgés de 4. Un bouchon vaginal apparaît suite à l'accouplement de la souris mâle avec la souris femelle, c'est le jour 0.5 de gestation. À 8.5 jours de gestation, nous avons procédé à la première injection de tamoxifène à 0,1mg/souris, que nous avons répété pendant 5 jours à 24 heures d'intervalle. À 17.5 jours de gestation, nous avons récupéré les embryons.

Pour rappel, le transgène K5Cre induit l'expression, dans les kératinocytes épidermiques basaux, d'une Recombinase-Cre constitutive, qui est activée en continu. Le knock-out est réalisé au cours de l'embryogénèse, dès l'expression de la kératine 5. Ce transgène permet d'étudier l'impact du KO de H2A.Z au cours du développement embryonnaire et postnatal de la peau.

#### **III.1.3 Préparation du tamoxifène**

Pour préparer le mélange à injecter, 50 mg de tamoxifène (Sigma-Aldrich T5648) ont été re-suspendus dans 500 µl d'éthanol absolu (Carlo Erba). Ce mélange a été chauffé au bain-marie à 60°C puis mélangé par vortex jusqu'à obtention d'une solution translucide. Noter qu'il ne faut pas hésiter à soniquer à chaud si nécessaire. Le mélange a ensuite été dilué dans de l'huile de maïs (Sigma-Aldrich C8267) afin d'obtenir une concentration finale de 10 mg/ml. Puis nous avons incubé le mélange au bain-marie à 60°C afin d'obtenir une solution translucide. La solution stock à 10 mg/ml a été conservée à -20°C en aliquots de 1 ml. Des aliquots d'une solution stock à 1 mg/ml ont également été conservés dans les mêmes conditions.

### **III.1.4 Injection intrapéritonéale**

Préalablement à l'injection nous avons chauffé l'aliquot de tamoxifène (solution stock à 1 mg/ml) dans un bain-marie à 60 °C pendant 10 à 15 minutes puis nous l'avons soniqué à chaud

pendant 10 minutes. Noter qu'il est crucial de laisser l'aliquot au chaud jusqu'au moment de l'injection. De plus, il est extrêmement important que la solution soit limpide. L'injection de tamoxifène a été effectuée par voie intrapéritonéale à l'aide d'une aiguille 25G (AGANT <sup>TM</sup> NEEDLE). Ont été injectés 0,1mg/ml de tamoxifène, donc un volume de 100 µl par souris. La fréquence est d'une injection chaque 24 heures et ceci pendant 5 jours consécutifs. La prise ou la perte de poids ont fait l'objet d'un suivi quotidien pour les souris en cours d'expérimentation.

#### **III.1.5** Administration des médicaments

Nous avons mené une étude témoin, sur les souris après le knock-out de H2A.Z, afin de visualiser à partir de quel moment se développait le phénotype et de déterminer les points limites et le point final de l'expérimentation. Au cours de cette étude témoin, les souris ont pu montrer un certain nombre de signes de souffrance. Nous les avons traités avec des anti-inflammatoires dans l'eau de boisson (Méloxicam,  $10\mu$ g/ml) ainsi qu'administré des antalgiques (Buprénorphine, 0,1mg/kg) par voie intrapéritonéale (100  $\mu$ l par 20 g de souris).

### Chapitre III.2 Génotypage des souris

#### **III.2.1** Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique des lignées de souris transgéniques a été effectuée à partir d'une biopsie de queue. La queue de la souris est composée d'une population hétérogène de cellules comprenant, entre autres, des cellules endothéliales, des fibroblastes du derme ainsi que la population de kératinocytes correspondant à chaque couche de l'épiderme, nous retrouverons donc dans l'extrait d'ADN génomique une « contamination » de l'ADN provenant de tous les types cellulaires mélangés.

Cette biopsie a été digérée dans une solution de 750 µl contenant 30 µl de protéinase K à 10 mg/ml (Sigma) et 720 µl de 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl et 1% de SDS pendant une nuit à 55°C sous agitation. Après l'ajout de 250µl de NaCl 5M, l'ADN génomique a été vortexé puis centrifugé 5 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant a été récupéré. Nous avons précipité l'ADN génomique avec 500 µl d'isopropanol (Propan-2-ol, Carlo Erba). Après agitation par retournement, les pelotes d'ADN ont été culotées par centrifugation 5 minutes à 13000 rpm à température ambiante. Le culot d'ADN a été lavé par l'ajout de 700 µl d'éthanol 70%, puis nous avons centrifugé le culot d'ADN en deux cycles de centrifugation de 5 minutes

à 13 000 rpm à température ambiante. Le culot a été ensuite séché à température ambiante avant d'être repris dans 50  $\mu$ l d'eau.

### III.2.2 PCR sur ADN génomique

Le génotypage des gènes H2afz, H2afv et Cre a été réalisé par PCR dans un tampon de 25 µl contenant entre 50 et 150 ng d'ADN génomique, 1X de tampon My Taq Red Mix (Bioline), 0,4 mM de chacune des amorces sens et anti-sens, 0,2 µl de Taq polymérase Bioline. Les liste des amorces ainsi que les différents programmes PCR utilisés, correspondant à l'analyse de chaque gène, sont listés respectivement sur le Tableau III.2-1 et Tableau III.2-2. Les fragments d'ADN amplifiés ont été visualisés sur des gels d'agarose à 1.2% ou 2% et colorés au bromure d'éthydium.

Gènes ciblés	Séquence des amorces sens (5' vers 3')	Séquence des amorces anti-sens (5' vers 3')	Séquence des amorces communes	Taille des fragments et allèles
H2A 7-1 Knock-in	GCTACCATTECTEGTEGTEGTATETCA	TGTGTGGGATGACACCTAGGAGAGGG		278 pb (WT)
				388 pb (L2 ou fl)
H2A.Z-1 Knock-out	CGTCGGAGCTTCAGCACGGTCC	TGTGTGGGATGACACCTAGGAGAGGG		483 pb (L- ou KO)
1124 7 2 Knock in	CONCETANTE NE ATCENETE COUT			257 pb (WT)
HZA.2-2 KNOCK-IN	CLACGTAATGAGATCLAGTGCCCT	CATGLACCIGLCATIATGTCTGGTA		433pb (L2 ou fl)
H2A.Z-2 Knock-out	CATGCACCTGCCATTATGTCTGGTA	ACTGATGGCGAGCTCAGACCATAAC		300 pb (L- ou KO)
Cre	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGCC	GAGTTGATAGCTGGCTGGTGGCAGATG		654 pb
Page Tel Tempto FCFD		CACCACAACCCCCACACA	CTTOCCTOCTC ATCTCCAAC	96 pb (WT)
KUSA-TOTOMATO-EGPP	GITATGTAALGUGGAALTULA	LAUGALAALGULALALA	CITCUTUSTGATCIGCAAC	140 pb (mut)

Tableau III.2-1 - Liste des amorces utilisées pour le génotypage

Programn	ne PCR h2afz (fl), h2	afv (fl), h2afv	/ (KO)		Programme PCR	Cre (tg)	
Etapes	Température (C°)	Temps	Cycles	Etapes	Température (C°)	Temps	Cycles
1	94	2 min		1	94	3 min	
2	94	1 min		2	94	1 min	
3	58	1 min	2 cycles	3	58	1 min	2 cycles
4	72	1 min		4	72	1 min	
5	94	30 sec		5	94	30 sec	
6	58	30 sec	30 cycles	6	58	30 sec	30 cycles
7	72	30 sec		7	72	30 sec	
8	72	3 min		8	72	3 min	
9	4			9	4		

Programme PCR h2afz (KO)					
Etapes	Cycles				
1	95	3 min			
2	95	30 sec			
3	60	1 min	34 cycles		
4	72	2 min			
5	72	10 min			
6	4				

Programme PCR mTmG (fl)							
Etapes	Température (C°)	Temps	Cycles				
1	94	2 min					
2	94	20 sec					
3	58	15 sec	10 cycles				
4	72	10 sec					
5	94	15 sec					
6	58	15 sec	28 cycles				
7	72	10 sec					
8	72	3 min					
9	4						

Tableau III.2-2 - Programme PCR pour les génotypages des gènes h2azf, H2afv, Cre et mTmG.

### **Chapitre III.3** Techniques in-situ

# III.3.1 Préparation de la pancréatine 8% pour la séparation derme et de l'épiderme

Nous avons préparé une solution stock à 8% dans du PBS 1X à partir de pancréatine en poudre (SIGMA P3292). Pour cela, 2 g de pancréatine ont été dissous dans 100 ml de PBS 1X. Nous avons laissé le mélange se dissoudre, sous agitation magnétique, pendant 24h à 4°C. Puis nous l'avons centrifugé à 2000 rpm pendant 20 min. Le mélange a été passé dans plusieurs filtres de 0,22 µm. Les aliquots de solution stock de pancréatine 8% ont été conservés à -20°C.

### III.3.2 Séparation du derme et de l'épiderme

La séparation du derme et de l'épiderme a été réalisée à partir d'une biopsie de peau, ventrale ou dorsale, de souriceau ou de souris adulte. Nous avons tondu les poils, à l'aide d'une tondeuse, puis épilé à l'aide d'une crème dépilatoire (Veet Silk & Fresh) pendant 5min. La peau a ensuite été rincée soigneusement sous l'eau froide.

Une fois que la biopsie de peau a été récupérée, la peau a été mise à plat dans une boite de pétri 100 mm au-dessus de quelques gouttes de PBS 1X (à partir de PBS 10X, Euromedex) sur la glace (la peau peut être conservée pendant plusieurs heures sur la glace sans affecter la qualité de l'échantillon). Le derme placé vers le haut et l'épiderme vers le bas, nous avons gratté la face dermique avec un scalpel afin de retirer le tissu adipeux et le muscle restant. Noter que cette étape est déterminante pour la qualité de la préparation du derme et pour le bon fonctionnement des enzymes. Une fois le derme nettoyé, nous avons déposé les petits morceaux de peau face épidermique vers le haut et nous les avons laissé flotter sur un mélange fraichement préparé de pancréatine 8% (préparée à partir de poudre, SIGMA P3292) et trypsine 10X (SIGMA T4174), à 50/50, sur la nuit (environ 16 heures) à 4 °C (Figure III.3–1).

Le lendemain matin, à l'aide d'une loupe binoculaire et en utilisant des pinces courbes, nous avons mécaniquement séparé l'épiderme du derme (Figure III.3–1). Chacun des tissus a été soigneusement rincé dans du PBS 1X à 4 °C. Les échantillons ont été plongés dans l'azote liquide afin de les conserver pour une utilisation ultérieure.



Figure III.3–1 - Méthode de séparation du derme et de l'épiderme d'une souris phénotypée de 8 jours.

La peau de souris est prélevée et déposée derme vers le haut sur du PBS1X dans une boite de pétri (a). À l'aide d'un scalpel on retire le tissu adipeux et les muscles qui sont accrochés au derme (b). La peau est ensuite prête pour la digestion enzymatique (c). On découpe la peau en petits morceaux. Ceux-ci, épiderme vers le haut et derme vers le bas, flottent sur un mélange de pancréatine 8% et de trypsine 10% pendant une nuit (environ 16 heures) à  $4 \,^{\circ}C$  (d). Le lendemain matin, le derme et l'épiderme sont séparés mécaniquement à l'aide de pinces courbes et d'une loupe binoculaire (e). Tout le protocole a été réalisé sur de la glace ou à 4°C. Les images (a), (b) et (c) proviennent de (Jensen et al., 2010).

#### **III.3.3** Inclusion des tissus en paraffine

Les biopsies de peau ont été incluses soit dans un bloc de paraffine soit dans une solution pour cryoconservation, l'OCT (Q PATH, 00411243). Les échantillons pour inclusion dans la paraffine ont été introduits dans une cassette entre deux mousses. Ils ont alors été incubés dans une solution de fixation, formaline 10% (Sigma-Aldrich, HT5012), pendant 2 jours à température ambiante et sous agitation. Une fois fixés, les échantillons ont été lavés avec du PBS 1X, puis ont subi un processus de déshydratation. L'étape d'inclusion en paraffine se déroule dans un automate à déshydratation et inclusion en 3 étapes : la déshydratation, la clarification et l'imprégnation en paraffine. La déshydratation consiste en un passage progressif par différents bains de teneur d'éthanol de plus en plus élevée (70, 85, 95 et 100%) et les fluides vont se substituer les uns aux autres. Cette étape est essentielle car la paraffine n'est pas miscible dans l'eau. L'étape de clarification est quant à elle nécessaire car la paraffine n'est pas non plus miscible dans l'alcool et se fait par le xylène (Carlo Erba). Le dernier bain contient de la paraffine liquide (Microm Microtech, F/0040X) (point de fusion entre 56 °C et 48 °C). Une fois les pièces imprégnées de paraffine liquide, les tissus ont été inclus dans un bloc de paraffine. C'est l'étape

d'enrobage. Les blocs de paraffine ont été coupés au microtome en coupes de 10  $\mu$ m d'épaisseur. Les coupes ont été déposées sur des lames super frost-gold plus (Dominique Dustcher) à l'aide d'un bain-marie à 45 °C. Nous avons laissé les lames sécher pendant 48 heures à 37°C. Les blocs de peau inclus dans l'OCT ont ensuite été coupés au cryomicrotome en coupes de 10  $\mu$ m d'épaisseur puis les lames ont été conservées à -20°C.

#### **III.3.4 Déparaffinage des coupes**

Avant d'être utilisées, les coupes inclues dans la paraffine ont subi un traitement de déparaffinage et de réhydratation. Les coupes ont d'abord été incubées dans le toluène (Sigma-Aldrich) (3 bains de 10 minutes chacun). Puis les coupes ont été incubées 10 minutes dans un bain d'éthanol 100%. Afin de réhydrater les tissus, les coupes sont passées par une succession d'incubations de 2 minutes dans des bains de teneur décroissante d'éthanol (100%, 90%, 70%). Pour terminer l'étape de réhydratation nous avons incubé les coupes 10 minutes dans du PBS 1X.

### III.3.5 Coloration Hématoxyline – Éosine – Safran (HES)

La coloration HES (hématoxyline, éosine et safran) a été réalisée à l'aide d'un automate à coloration Leica (Autostainer XL Leica). Dans cet automate, les coupes passent d'abord par 3 bains de 1 minute de xylène, puis 3 bains de 2 minutes d'éthanol et un lavage de 1 minute à l'eau. Les coupes sont ensuite colorées à l'hématoxyline (DIAPATH, C030X) pendant 7 minutes puis passent par une succession d'étapes de lavages avec de l'eau (2 minutes) puis de l'eau et HCL (30 secondes), de l'eau (2 minutes), de l'eau et NH4 (30 secondes) et enfin un dernier lavage d'eau (2 minutes). Enfin les lames sont incubées dans l'éosine (DIAPTH, C036X) pendant 5 minutes puis lavées pendant 2 minutes à l'eau. Trois bains dans l'éthanol 100% (30 secondes) sont effectués avant de plonger les coupes dans le safran (Microm Micotech, F/SAFRAN) pendant 5 minutes. Enfin les coupes passent par deux bains d'éthanol 100% (30 secondes) et 3 bains de xylène de 1 minute. Une fois sorties de l'automate les coupes de tissus ont été montées sous la lamelle grâce à la résine de montage Eukitt (Référence 124103, Dutscher) puis visualisées à l'aide d'un microscope Olympus BX41 ou le microscope Zeiss AxioImager M2. L'hématoxyline est un colorant basique qui se fixe aux acides nucléiques présents dans les noyaux et permet de les colorer en bleu ou violet. L'éosine est un colorant acide et permet de colorer tous les éléments du cytoplasme qui sont plutôt basiques. Celui-ci colore le cytoplasme en rose et tous les autres éléments cellulaires en rose/rouge plus ou moins vif selon leur

acidophilie. Enfin, le safran colore en jaune les fibres de collagène des tissus conjonctifs et donc le derme.

#### **III.3.6 Immunofluorescence**

Sur les coupes de tissus déparaffinées il est important de passer par une étape de démasquage des épitopes préalablement à l'immunofluorescence. Pour cela, les lames ont été placées dans une solution de 10 mM de citrate de sodium (à partir du tampon de Citrate de Sodium 10X, pH 6.0, Diagnostic Biosystems K035) et de 0,05% de Tween 20 (Carlo Erba). La solution a été chauffée progressivement de telle sorte à atteindre un plateau à 95°C pendant 40 minutes. Après une redescente lente en température, les lames ont été transférées dans une solution de perméabilisation

La première étape de la technique d'immunofluorescence est la perméabilisation des cellules. Pour cela, les coupes de tissus ont été placées dans une solution de perméabilisation de PBS 1X (PBS 10X, Euromedex) contenant 0,5% de Triton-X100 (SIGMA, T9284) pendant 30 minutes. Après lavage des lames dans du PBS 1X de 10 minutes, l'étape suivante a été la saturation des sites non spécifiques en incubant les lames 1 heure à température ambiante dans une solution de PBS 1X contenant 0,1% de Tween20 et 10% de SVF. Enfin, les lames ont été incubées dans du PBS 1X contenant 0,1% de Tween20, 1% de SVF et l'anticorps primaire à la concentration désirée (Tableau III.3-1), pendant une nuit à 4 °C. Après 30 minutes de lavages au PBS 1X contenant 0,1% de Tween20, les échantillons ont été incubés avec l'anticorps secondaire dans du PBS 1X, 0,1% de Tween20 et 1% de SVF pendant 1 à 2 heures à température ambiante. Les lames ont ensuite été lavées au PBS 1X et 0,1% Tween20 pendant 20 minutes. Le marquage de l'ADN a été effectué par une solution de Hoechst 33342 à 0,5 µg/ml (Invitrogen) pendant 5 minutes, puis nous avons effectué un dernier lavage de 10 minutes dans du PBS 1X. Enfin les lames ont été montées dans un milieu de montage Dako fluorescent mounting medium (Dako, S3023). Noter que pendant les étapes d'incubation avec les solutions d'anticorps, les lames ont été placées dans une chambre humide.

Anticorps primaires	Référence fournisseur	Dilution
Anti-Histone H2A.Z [EPR18090]	Abcam (ab188314)	1/250
Anti-Cytokeratin 14 [LL002]	Abcam (ab7800)	1/250
Anti-Cytokeratin 15 [LHK15]	Abcam (ab80522)	1/200
Anti-Cytokeratin 10 [DE-K10]	Abcam (ab9026)	1/100
Anti-KRT6B	Abcam (ab154313)	1/400
Anti-Loricrine	Abcam (ab85679)	1/100
Anti-SOX9 [EPR14335-78]	Abcam (ab185966)	1/250
Anti-CD34 [MEC 14.7]	Abcam (ab8158)	1/100
Anti-p63 [EPR5701]	Abcam (ab124762)	1/250
Anti-H3Ser10P	Millipore (06-570)	1/250

Tableau III.3-1 - Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.

Anticorps secondaires	Référence fournisseur	Dilution
Alexa Fluor 488 AffiniPure Fab fragment Donket Anti-Rat IgG	Jackson ImmunoResearch	1/300
Cy <sup>TM</sup> 2 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch	1/300
Cy <sup>TM</sup> 3 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch	1/300
Cy <sup>TM</sup> 2 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	1/300
Cy <sup>TM</sup> 3 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	1/300

Tableau III.3-2 – Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence.

# III.3.7 Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission

Après l'euthanasie des animaux expérimentés et leur dissection, des biopsies de peau ventrale ont été collectées. Ces biopsies ont été conservées dans un tampon fixateur, composé à 50% de PBS 1X et à 50% de Glutaraldéhyde, pendant 5 mois à 4°C. Ce tampon permet de fixer et de stériliser les tissus.

La préparation des échantillons et l'analyse des échantillons par microscopie électronique à transmission a été réalisée à la plateforme ImagoSeine, à l'Institut Jacques Monod à Paris, dans le laboratoire du Dr Verbavatz et selon leur protocole.

Les coupes des biopsies ont été réalisées à l'ultra-microtome, longitudinalement, et mesurent 50 nm d'épaisseur.

Les photos de microscopie électronique à transmission (TEM) ont été réalisées à l'aide du microscopie Tecnai 12 (FEI).

# IV.Résultats

# <u>Chapitre IV.1</u> Préambule : La technique d'invalidation génique, aussi appelée Knock-out

Cet outil extrêmement intéressant a permis de réaliser un grand nombre d'études génétiques fonctionnelles, en particulier lorsque ces gènes sont exprimés dans un tissu ou à un stade de développement particulier. Le laboratoire du Dr. Pierre Chambon et du Dr. Daniel Metzger a créé les souris transgéniques CreER<sup>T</sup>. L'activité d'excision de cette Recombinase-Cre ER<sup>T</sup> peut être induite à un instant (t) donné, grâce à la fusion de la Recombinase-Cre avec un ligand possédant un domaine de liaison au récepteur des œstrogènes (ERt). Ce transgène a fait l'objet de nombreuses études et a été largement caractérisé et amélioré depuis la fin des années 1990 (Brocard et al., 1997). Le principe du knock-out utilisant la Recombinase CreER<sup>T</sup> repose sur l'action du tamoxifène, un composé antagoniste du récepteur aux œstrogènes (ERt). Le récepteur ERt a plus d'affinité pour le tamoxifène que pour les œstrogènes endogènes, ce qui signifie qu'en absence de tamoxifène, la CreER<sup>T</sup> est « séquestrée » dans le cytoplasme. Lorsque l'on introduit du tamoxifène dans la cellule, le ligand CreER<sup>T</sup> va être libéré de son récepteur suite à la liaison du tamoxifène et va pouvoir passer du cytoplasme vers le noyau. Une fois dans le noyau, la Cre va reconnaitre les sites loxP et va exciser les séquences d'ADN flanquées par les sites loxP (Figure IV.2-1). Plusieurs lignées de souris ont été créées par l'équipe du Dr. Metzger afin de diminuer la toxicité du transgène et également d'améliorer sa sensibilité au tamoxifène et son efficacité pour obtenir le transgène nommé CreER<sup>T2</sup>. Afin de démontrer l'efficacité enzymatique de la Recombinase-CreER<sup>T2</sup>, sa séquence codante a été placée sous le contrôle des promoteurs de la kératine 5 ou de la kératine 14 qui sont exprimées par les cellules de la couche basale de l'épiderme. L'efficacité de l'excision de la CreER<sup>T2</sup>, régulée par le promoteur de K14 ou celui de K5, a été étudié grâce à des gènes rapporteurs (Indra et al., 1999, 2000; Ramirez et al., 2004). Cette technique d'invalidation génétique, utilisant le transgène CreER<sup>T2</sup>, est couramment utilisée au laboratoire et l'activité de cette dernière peut être contrôlée dans le temps, à différents stades de développement de l'animal, ainsi que dans l'espace, de manière tissu-spécifique, permettant de passer outre la létalité embryonnaire. D'autres modèles ont été créés, utilisant d'autres Recombinase-Cres telles que la K14CreER<sup>tam</sup>, dans le laboratoire de Elaine Fuchs (Vasioukhin et al., 1999). Il existe également la possibilité d'exprimer de manière constitutive la Recombinase-Cre, tel que dans le transgène K5Cre que je détaillerai dans la section IV.2.2.1 (Ramirez et al., 2004).

## <u>Chapitre IV.2</u> Obtention des différentes lignées KO pour H2A.Z et des contrôles de validité

# IV.2.1 Obtention des modèles de souris H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K14CreER<sup>T2</sup> et H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K5Cre

Comme mentionné précédemment, la délétion du gène H2afz, codant pour l'histone variante H2A.Z-1, est létale chez la drosophile et chez la souris au stade embryonnaire (Carr et al., 1994; Jackson and Gorovsky, 2000; Faast et al., 2001; Zlatanova and Thakar, 2008). Il n'existait encore aucun modèle animal permettant d'induire la double invalidation conditionnelle de H2A.Z (H2afz et H2afv) spécifiquement dans un tissu. J'ai créé dans ce but un modèle de souris transgénique permettant l'invalidation génétique spatio-temporelle des deux gènes, H2afz et H2afv, codant pour les protéines H2A.Z-1 et H2A.Z-2. Notre laboratoire a tout d'abord créé, en collaboration avec l'Institut clinique de la souris de Strasbourg, deux lignées de souris génétiquement modifiées : la lignée de knock-out conditionnel (cKO) H2afz et la lignée de knock-out conditionnel (cKO) H2afv. J'ai ensuite croisé ses deux lignées ensemble afin de créer une lignée double cKO, comportant les deux transgènes H2afz<sup>fl/fl</sup> et H2afv<sup>fl/fl</sup>, on appellera cette lignée H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 (Figure III.1-1, page 108). Afin de créer la lignée transgénique comportant en plus des deux gènes floxés, H2afz<sup>fl/fl</sup> et H2afv<sup>fl/fl</sup>, le transgène de la K14CreER<sup>T2</sup>, j'ai croisé la lignée H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 avec la lignée K14CreER<sup>T2</sup>, fournie par le Dr. Metzger (Figure IV.2-1) (Indra et al., 2000) (page 109). Nous appellerons cette lignée H2A.Z-1; H2A.Z-2 ; K14CreER<sup>T2</sup>. Pour la suite des expériences, nous avons procédé selon les protocoles et grâce aux conseils du Dr. Metzger. L'invalidation génétique chez des souris adultes âgées de 6 à 8 mois se fait par l'intermédiaire d'une injection de tamoxifène toutes les 24h, pendant 5 jours consécutifs, par voie intrapéritonéale.

L'invalidation génétique, des gènes H2afz et H2Afv, au stade embryonnaire a été réalisée par deux méthodes différentes utilisant deux types de lignées de souris transgéniques différentes. Nous avons tout d'abord croisé une femelle (H2afz <sup>fl/fl</sup> H2afv <sup>fl/fl</sup> K14Cre <sup>tg/+</sup> ou H2afz <sup>fl/fl</sup> H2afv <sup>fl/fl</sup> K14Cre <sup>tg/+</sup> ou H2afz <sup>fl/fl</sup> H2afv <sup>fl/fl</sup> K14Cre <sup>tg/+</sup> ou H2afz <sup>fl/fl</sup> K14Cre <sup>tg/+</sup> respectivement). Après vérification de l'accouplement, nous avons administré la première dose de tamoxifène à la souris gestante, par voie intrapéritonéale, à E8 et ce pendant 5 jours consécutifs. Les embryons ont été récupérés à E17.5 par césarienne. Dans ce premier modèle, l'invalidation de H2A.Z a lieu au cours de l'embryogénèse en concomitance avec l'expression de K14 dans la peau. Deuxièmement, nous avons créé une lignée de souris transgénique

permettant d'invalider les gènes H2afz<sup>fl/fl</sup> et H2afv<sup>fl/fl</sup> de manière spontanée, grâce à un transgène K5Cre non inductible mais spontané, qui est régulée par le promoteur de la kératine 5 (Figure IV.2–2). Dans second modèle, l'invalidation génétique de H2A.Z a lieu spontanément au cours de l'embryogénèse en concomitance avec le début de l'expression de K5 (voir section IV.2.2.3), sans qu'il y ait besoin d'injecter la souris gravide (Ramirez et al., 2004).

Le suivi journalier, et parfois bi-journalier, des souris adultes et nouveau-nés est crucial afin de visualiser l'apparition de certains « points limites » ainsi que l'apparition d'un phénotype externe particulier. Le « point limite » est défini par la FELASA (*Federation for Laboratory Animal Science Association*) comme le moment auquel la souffrance et/ou la détresse d'un animal d'expérimentation doit être arrêtée, minimisée ou diminuée à l'aide de mesures telles que l'euthanasie (faite de façon supportable pour l'animal), par l'arrêt du processus qui le fait souffrir, ou par un traitement visant à le soulager.



Figure IV.2–1- Représentation schématique de la construction génétique des lignées de souris génétiquement modifiées (H2afz<sup>fl/fl</sup>, H2afv<sup>fl/fl</sup>, K14Cre).

Ce modèle expérimental a été créé afin d'étudier *in-vivo* le rôle de l'histone variante H2A.Z dans la prolifération et la différenciation de l'épiderme.

L'utilisation du transgène CreER<sup>T2</sup> peut faire l'objet d'un certain nombre d'inconvénients (d'après ("12 things you don't know about Cre-lox," n.d.)) :

• Le mosaïsme de la Recombinase-Cre :

Il a été reporté que dans les même tissus, le transgène de la Recombinase-Cre peut ne pas être exprimé de manière équivalente dans toutes les cellules ou que cette expression peut être inconstante (Guo et al., 2002; Heffner et al., 2012). Ce fait entraine des effets différents entre souris de la même portée, qui devraient montrer le même phénotype.

• La toxicité de la Recombinase-Cre :

La Recombinase-Cre peut parfois faire preuve de toxicité (Li et al., 2014). Étant capable de reconnaitre des sites endogènes de certains gènes, similaires aux sites loxP appelés *cryptic loxP* sites, elle peut, en invalidant des gènes importants, causer de nombreux effets indésirables. Cette toxicité peut également avoir lieu lorsque l'expression de la Cre est trop élevée ou sur une longue période. Celle-ci peut affecter la physiologie de la cellule, et/ou causer des dommages sur sa séquence d'ADN. Pour cette raison il est judicieux d'utiliser un témoin approprié, à savoir le témoin n'exprimant que le transgène K14 Cre<sup>tg/+</sup> ou K5Cre<sup>tg/+</sup>.

• La non spécificité de la Recombinase-Cre :

Il est connu que même si une souris transgénique exprime une Recombinase-Cre inductible (ou pas) régulée par un promoteur particulier, spécifique d'un type cellulaire ou d'un tissu, elle peut parfois « fuiter » (*leakage*) et s'exprimer dans des cellules même si elle n'a pas été induite. Une telle expression non spécifique peut entrainer des résultats aléatoires et confus. En effet, les Recombinase-Cres inductibles sont séquestrées dans le cytoplasme par une chaperonne et ne s'en détachent qu'en présence de tamoxifène. Si la Recombinase-Cre a une faible affinité pour la chaperonne, elle peut réussir à s'en détacher et à entrer dans le noyau. Il a été démontré que la CreER<sup>T2</sup> a une meilleure affinité pour sa chaperonne que la CreER et a donc moins de chances de fuiter (Feil et al., 1997).

• L'expression de la Recombinase-Cre peut être parent-dépendante :

L'efficacité de l'activité de la Recombinase-Cre peut dépendre du fait qu'elle ait été transmise par le parent mâle ou le parent femelle. Dans certaines souches transgéniques, l'activité de la Cre a été montrée plus efficace lorsqu'elle est héritée du côté maternel (Heffner et al., 2012). Concernant le souche transgénique K14CreER<sup>T2</sup>, aucune différence n'a été identifiée en ce qui concerne la provenance de la Cre parentale. Cependant, il a été décrit dans la littérature que dans

le modèle K5Cre, la Cre s'exprime de manière constitutive et qu'elle a une expression maternelle ovocytaire (Ramirez et al., 2004). Ceci implique que les embryons en gestation vont exprimer la Cre maternelle même s'ils ne possèdent pas le transgène dans leur génome. Ceci implique que lors des croisements le parent portant le transgène de la Cre doit impérativement être le mâle.

Il est donc important de pouvoir suivre l'expression et l'activité de la Recombinase-Cre pour évaluer son efficacité. Pour cela, nous avons utilisé un nouveau modèle de souris transgénique, provenant de Jackson Laboratories, permettant le suivi de la Cre grâce aux gènes de la Rosa26, du fluorochrome Tomato, ainsi que du fluorochrome GFP. Je détaillerai ce modèle dans la section IV.2.2.2 ci-après. Les modèles de souris transgéniques exprimant le transgène K14CreER<sup>T2</sup> de ou transgène K5Cre, utilisés dans notre étude, ont été caractérisés depuis presque vingt ans et nous avons suivi les protocoles expérimentaux établis. Afin de conforter les résultats obtenus, un certain nombre de contrôles expérimentaux ont été réalisés et pour ce faire nous avons créé différentes lignées de souris transgéniques (section IV.2.2).

#### IV.2.2 Obtention de différentes lignées contrôle

### IV.2.2.1 Le modèle de souris H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K5Cre

Les cellules de la couche basale exprimant le couple de kératines K14/K5, nous a invité à utiliser un nouveau modèle de souris transgénique, K5Cre, qui nous a été donné par le Dr. Aurélie Chiche de l'Institut Pasteur à Paris. Contrairement au transgène K14CreER<sup>T2</sup>, l'activité de la Recombinase-Cre induite par le transgène K5Cre elle est constitutive (Ramirez et al., 2004). Ce transgène K5Cre a l'avantage de passer outre l'injection de tamoxifène et ainsi d'éviter les effets indésirables qui lui sont liés.

En croisant tout d'abord la lignée H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 avec la lignée K5Cre j'ai obtenu la lignée H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K5Cre. L'activité constitutive de la Recombinase-Cre, contrôlée par le promoteur K5, nous permet d'avoir un double knock-out de H2afz et H2Afv qui est spontané et durable dans le temps. Nous avons pu identifier les lignées cellulaires impactées par le KO, ainsi qu'étudier leur différenciation au cours de l'embryogénèse et au cours du développement péri et postnatal jusqu'à environ 13 jours.

### IV.2.2.2 Le modèle de souris mTmG

Afin de pouvoir suivre l'expression et l'activité de la Recombinase-Cre, nous avons utilisé un modèle de souris transgénique Rosa26-Tomato-GFP (aussi appelé mTmG) (Muzumdar et al., 2007). L'utilisation d'un transgène rapporteur de l'activité de la Recombinase-Cre est essentielle afin de confirmer l'expression et la localisation de la Recombinase-Cre, à savoir si cette dernière est bien spécifique des kératinocytes basaux épidermiques (Figure IV.2–2). L'activité enzymatique de la Recombinase-Cre peut-être suivie par l'intermédiaire de deux gènes rapporteurs fluorescents présents dans le transgène mTmG (Tomato <sup>fl/fl</sup> et GFP <sup>tg/+</sup>, Figure IV.2–2, a, b), codant pour deux protéines fluorescentes, la protéine Tomato et la protéine GFP, qui sont suivies par microscopie à épifluorescence (Figure IV.2–2, a, c).

### IV.2.2.3 Le modèle de souris expérimental : H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K5Cre ; mTmG

Pour obtenir la dernière lignée de contrôle H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K5cre ; mTmG, j'ai croisé des souris de la lignée H2A.Z-1 ; H2A.Z-2 ; K5Cre avec des souris mTmG.

Théoriquement, les cellules exprimant spécifiquement la kératine 5, à savoir les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, vont également exprimer la Recombinase-Cre de manière constante. Dans ces cellules, l'enzyme Recombinase-Cre reconnaît les deux sites loxP, entre lesquels se situent les séquences codant pour la protéine Rosa et pour la protéine fluorescente Tomato, et vont exciser ces derniers. Dans ces séquences excisées se trouve également un codon STOP qui sera également éliminé, ce qui va permettre au gène codant pour le fluorochrome GFP, au début silencieux, d'être exprimé à son tour (Figure IV.2–2, a). Les cellules n'exprimant pas la kératine 5 n'expriment pas non plus la Recombinase-Cre. Celles-ci expriment ainsi de manière continue le fluorochrome Tomato et sont visibles en rouge par microscopie à épifluorescence (Figure IV.2–2, b).



Figure IV.2-2 - Le modèle de souris contrôle H2A.Z-1, H2A.Z-2, K5Cre, mTmG.

(a) Représentation schématique des constructions génétiques des lignées de souris génétiquement modifiées (H2afz<sup>fl/fl</sup>, H2afv<sup>fl/fl</sup>, K5Cre, mTmG). L'activité enzymatique de la Recombinase-Cre est régulée par le promoteur de la kératine 5 et est visualisée grâce à l'expression de deux fluorochromes codés par le transgène mTmG, la Tomato (rouge) et la GFP (vert). Lorsque la cellule exprime la kératine 5 (kératinocytes basaux) la Recombinase-Cre s'exprime également et excise une partie des gènes gènes H2afz et H2afv qui sont « floxés ». La Recombinase-Cre excise également le transgène mTmG et délète les séquences des gènes rapporteurs de la Rosa, de la Tomato ainsi que le codon STOP. La cellule exprime alors le fluorochrome GFP. Le cytoplasme des kératinocytes basaux KO est visualisé en vert. (b) Si la cellule n'exprime pas la kératine 5, (kératinocytes suprabasaux) la Cre ne s'exprime pas et n'excise pas les gènes codant pour H2A.Z-1, H2A.Z-2, Rosa et Tomato. Ainsi toutes les cellules n'exprimant pas la Cre sont visualisées en rouge. (c) L'expression de la GFP dans le cytoplasme des kératinocytes basaux confirme que l'activité de la Cre est spécifique de la couche basale. Coupe de peau dorsale de souris, âgée de 12 jours, de génotype H2afz <sup>-/-</sup> H2afv <sup>-/-</sup> K5Cre <sup>tg/+</sup> mTmG <sup>+/-</sup>. Microscopie à épifluorescence : Cre active (GFP, en vert), Cre inactive (Tomato, en rouge), noyaux (Hoechst, en bleu). Couche basale (CB), couche cornée (CC), derme (D), épiderme (E), follicule pileux (HF), gaine folliculaire externe (ORS).

# IV.2.3 Contrôle de la validité des modèles utilisés pour l'invalidation des gènes H2afz et H2afv

# IV.2.3.1 La Recombinase-Cre s'exprime spécifiquement dans les kératinocytes basaux

Une biopsie de peau dorsale a été prélevée chez des souriceaux âgés de 12 jours. La GFP, traduisant l'activité enzymatique de la Recombinase-Cre, s'exprime dans la couche basale de l'épiderme. La Cre est active dans l'épiderme interfolliculaire, ainsi que dans la gaine externe (ORS) des follicules pileux (Figure IV.2–2, c). A l'opposé, les cellules du derme n'exprimant pas la kératine 5, n'expriment pas non plus la Recombinase-Cre, et donc expriment le fluorochrome Tomato dans leur cytoplasme. En plus des biopsies de peau dorsale, des biopsies de peau ventrale et de peau de la queue ont également été collectées, les résultats s'avérant identiques à ceux obtenus pour la peau dorsale (Figure S. 1).

## IV.2.3.2 Test de la toxicité et de l'efficacité de la Recombinase-Cre sous le contrôle du promoteur de K5

Une fois l'activité Recombinase-Cre confirmée, nous avons utilisé un anticorps anti-H2A.Z sur des biopsies de peau de queue de souriceau, âgés de 8 jours, afin de déterminer si l'excision des deux gènes H2afz et H2afv par la Recombinase-Cre constitutive était efficace.

La peau de trois souriceaux témoins, de trois génotypes différents T1, T2 et T3 (Figure IV.2–3, a, b, c), a été analysée grâce à un anticorps anti-H2A.Z. Les deux isoformes H2A.Z-1 et H2A.Z-2 ne différant que par 3 acides aminés, l'anticorps utilisé est incapable de distinguer ces deux protéines séparément. La composition génétique des transgènes est différente entre ses trois témoins. On notera T1 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre <sup>g/+</sup>; mTmG<sup>+/-</sup>; T2 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; H2afv<sup>+/+</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup>; T3 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup>; T3 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; M2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup>; S1 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; M2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup>; T3 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; M2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup>; S1 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; M2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup>; T3 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup>; S1 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup>; T3 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup>; S1 le souriceau témoin de génotype H2afz<sup>+/+</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/+</sup> (Figure IV.2–3, a, b, c). Deux questions se posent : est-ce que les gènes H2afz, H2afv, Rosa et Tomato sont « défloxés » ? Si oui, sont-ils à l'état homozygotes ou hétérozygotes ?

Nous avons d'abord comparé les souriceaux témoins T1, T2 et T3 entre eux (Figure IV.2– 3, a, b, c). L'expression de l'histone variante H2A.Z, visualisée avec un anticorps anti-H2A.Z, est ubiquitaire dans toutes les cellules du derme et de l'épiderme (Figure IV.2–3, a, b, c). La détection nucléaire de l'anticorps anti-H2A.Z, dans les cellules du derme et de l'épiderme, démontre une reconnaissance spécifique de l'anticorps pour sa cible.

Aucun des trois témoins T1, T2 ou T3 n'a développé de phénotype macroscopique ou microscopique particulier (Figure IV.2–3, a, b, c). Le transgène mTmG est présent chez le témoin T1 mais pas chez les témoins T2 et T3 et aucun de ses souriceaux n'a développé de phénotype particulier (Figure IV.2–3, a, b, c). De plus, transgène de la Cre est présent chez les témoins T1 et T3 mais pas chez le témoin T2 et, une fois de plus, aucun de ses souriceaux n'a développé de phénotype particulier (Figure IV.2–3, a, b, c). Nous pouvons donc affirmer que l'introduction du transgène mTmG et du transgène K5Cre ne provoque pas l'apparition d'un phénotype particulier chez le souriceau.

De plus, on remarque que les deux souriceaux T1 et T3 sont H2afv<sup>-/-</sup> mais sont H2afz<sup>+/+</sup> (Figure IV.2–3, a, c). L'analyse des témoins T1, T2 et T3 montre que la structure de l'épiderme ne semble pas être perturbée par l'invalidation du gène H2afv seule qui n'est donc pas suffisante pour provoquer l'apparition d'un phénotype visible chez le souriceau (Figure IV.2-3, a, b, c). Les cellules des souriceaux T1 et T3 expriment toujours la protéine H2A.Z-1, mais pas la protéine H2A.Z-2, cependant l'anticorps utilisé est incapable de différencier les isoformes H2A.Z-1 et H2A.Z-2 et donc toutes les cellules sont marquées. Ces résultats sont en conformité avec le fait que lors de la délétion constitutive du gène H2afv au niveau des cellules germinales, aucun phénotype n'est observé (Favier et al., en préparation). Ces expériences laissent supposer que la délétion de l'isoforme H2afy, et par conséquent l'expression de la protéine H2A.Z-2 seule est dispensable au développement de la souris. Seuls les souriceaux présentant un knock-out complet des deux isoformes de manière homozygote développent le phénotype caractéristique observé sur la peau, que je détaillerais dans la section IV.4.2.1. Nous avons également observé ce phénotype chez le souriceau T4 (H2afz<sup>-/-</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>; mTmG<sup>+/</sup>). Chez le souriceau T4, ainsi que pour tous les souriceaux KO pour les deux gènes H2A.Z obtenus, nous avons observé le développement d'une peau sèche et craquelée, rougeâtre, ainsi qu'un retard de l'émergence des poils par rapport à la souris témoin. Ce phénotype macroscopique caractéristique du KO de H2A.Z, est également retrouvé chez d'autres souriceaux KO pour H2A.Z (page 155). Le souriceau T4 présente une diminution quasi-totale de l'expression de l'histone variante H2A.Z dans les kératinocytes de la couche basale ainsi que dans les kératinocytes de la gaine externe des follicule pileux (Figure IV.2–3, d, Figure IV.4–5). Ce résultat est en parfait accord avec le précédent, démontrant que l'activité de la Recombinase-Cre est spécifique des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme et de l'ORS du follicule pileux.



Figure IV.2–3 – Contrôle de la spécificité de l'activité de la Recombinase-Cre constitutive au niveau de la couche basale.

Peau de queue de quatre souris T1, T2, T3, T4, âgées de 8 jours. **(a-b)** Chez la souris T1 et T2, la Cre est exprimée dans la couche basale de l'épiderme. Alors que chez la souris T1 l'ensemble des cellules expriment H2A.Z, chez la souris T2 on note une forte diminution de l'expression de la protéine H2A.Z dans la couche basale de l'IFE et dans l'ORS ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de la couche cornée d'environ 2 fois. **(c-d)** Les souris T3, et T4 ne possèdent pas le transgène de la mTmG, l'activité de la Cre ne peux pas être suivie. **(c)** Chez la souris T3 H2A.Z s'exprime dans la totalité des cellules. Cre active (GFP, en vert), Cre inactive (Tomato, en rouge), H2A.Z (anticorps anti-H2A.Z, en rouge), noyaux (Hoechst, en bleu). Couche basale (CB), couche cornée (CC), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), derme (D), épiderme (E), épiderme interfolliculaire (IFE), follicule pileux (HF). Les pointillés blancs permettent de souligner la membrane basale.

### <u>Chapitre IV.3</u> Impact de l'invalidation des deux gènes H2A.Z sur l'homéostasie de la peau de souris adulte

### IV.3.1 Développement d'une alopécie localisée après le knock-out de H2A.Z

Nous avons injecté le tamoxifène à un groupe de souris (I), âgées de 6-8 mois, de génotype H2afz<sup>fl/fl</sup> ; H2afv<sup>fl/fl</sup> ; K14Cre<sup>tg/+</sup> (Figure IV.3–1 a, b) ainsi qu'à un groupe de souris témoins (II), de génotype H2afz<sup>fl/fl</sup> ; H2afv<sup>fl/fl</sup> ; K14Cre<sup>+/+</sup> (Figure IV.3–1, a, b). Les groupe de souris (I) et (II) se compose respectivement de 10 et 7 souris. En moyenne, il se passe environ 15 jours (J15) entre la première injection de tamoxifène (J1 post-tamoxifène) et l'apparition des premiers signes d'un phénotype macroscopique. Ce même résultat a été observé sur 6 souris sur 10 du groupe (I) et aucune des souris du groupe contrôle (II) n'a développé de phénotype macroscopique similaire. Nous avons procédé à l'euthanasie des souris expérimentées entre les jours J19-J22 post-tamoxifène, selon la gravité phénotypique (Figure IV.3–1, a).

Quinze jours en moyenne après la première injection de tamoxifène, on constate un changement de l'état de la peau, devenant très rouge, très sèche et formant des pellicules. Ce phénotype se développe au niveau ventral, particulièrement sur le torse, le museau ainsi que les pattes avant (Figure IV.3–1, a). Une forte alopécie se développe, au niveau du torse (Figure IV.3–1, a) et le pelage semble plus gras sur la totalité restante du corps de la souris. Pour les souris du groupe (I), ayant développé le phénotype, et appelées « phénotypées », le suivi du poids journalier ou bi-journalier a montré une perte de poids d'environ 25% entre le premier jour (J1) et les derniers jours d'expérimentation (J19-J22 post-tamoxifène). De plus, un changement comportemental des souris « phénotypées » se produit, tel que l'apparition de fortes démangeaisons au niveau du museau ainsi qu'une hypokinésie (diminution de l'activité physique). Il est important de souligner que dès l'apparition des premiers symptômes toutes les souris ont été traitées avec des anti-inflammatoires ainsi que des antidouleurs.

Le tableau (Figure IV.3–1, b) montre la taille des fragments d'ADN obtenus lors des PCR permettant de génotyper les allèles sauvages (*wild-type* ou wt), floxées (fl) ou délétes (-) en ce qui concerne les gènes H2afz et H2afv. De la même manière, nous avons vérifié par PCR si les souris possédaient dans leur génome le transgène de K14-CreER<sup>T2</sup> (tg/+) ou pas (+/+). L'euthanasie des souris témoins et des souris KO pour H2A.Z, appartenant au groupe (II) et (I) respectivement dans la Figure IV.3–1, a été réalisée après l'apparition du phénotype macroscopique, à 21 jours post-tamoxifène. L'analyse de l'ADN génomique des souris (I) et (II) confirme leur génotype avant induction du knock-out de H2A.Z, à savoir respectivement

H2afz<sup>fl/fl</sup>; H2Afv<sup>fl/fl</sup>; K14Cre<sup>tg/+</sup> et H2afz<sup>fl/fl</sup>; H2Afv<sup>fl/fl</sup>; K14Cre<sup>+/+</sup>. De plus, le génotypage des allèles de H2afz et H2Afv délétées nous permet de valider notre expérience d'invalidation des gènes H2afz et H2afv puisqu'on observe une bande à environ 500 pb correspondant à la délétion du fragment de H2afz ainsi qu'une bande en dessous de 300 pb correspondant à la délétion du fragment H2afv. Ainsi, 21 jours après la première injection de tamoxifène les souris exprimant la Recombinase-Cre sont bien invalidées pour les deux gènes H2afz et H2afv et l'apparition du phénotype macroscopique localisé décrit précédemment en est la conséquence. Par la suite, nous appellerons les souris ayant développé ce phénotype caractéristique par « souris KO » ou souris « phénotypées ». L'apparition de ce phénotype externe a été observé chez 6 souris expérimentées sur 10, de génotype H2afz<sup>fl/fl</sup>; H2Afv<sup>fl/fl</sup>; K14Cre<sup>tg/+</sup>, devenues H2afz<sup>-/-</sup>; H2Afv<sup>-/-</sup>; K14Cre<sup>tg/+</sup> après l'injection de tamoxifène. Par contre aucune des 7 souris témoins injectées au tamoxifène n'a développé de phénotype.

a) Souris KO (I) Témoin (II) H2afz + H2afv + K14Cre tg+ H2afz 11/1 H2afv 11/1 K14Cre +/+

b)

Gène analysé h2afz	Amorces	allèle cKO (fl)	allèle KO (-)	allèle sauvage (+)
Présence des sites LoxP	4421-4422	388 pb	-	278 pb
Excision des exons floxés (KO)	4419-4422	-	483 pb	-

Gène analysé h2afv	Amorces	allèle cKO (fl)	allèle KO (-)	allèle sauvage (+)
Présence des sites LoxP	5978-4981	433 pb	-	257 pb
Excision des exons floxés (KO)	5978-3255	-	280 pb	-
Excision des exons floxés (KO)	5978-3255	-	280 pb	-

Génotypage

Gène analysé Cre	Amorces	allèle tg	allèle sauvage (+)
Présence du transgène	Cre3-Cre5	654 pb	-

C) Génotypage



#### (I) cKO: H2afz <sup>#/f</sup> H2afv <sup>fl/fl</sup> K14Cre <sup>tg/+</sup> KO: H2afz + H2afv + K14Cre tg/+

(II) Témoin: H2afz 1/1 H2afv 1/1 K14Cre +/+

Figure IV.3-1 - Résultat de l'invalidation génétique in-vivo des deux gènes, H2afz et H2afv, codant pour l'expression des histones variantes H2A.Z-1 et H2A.Z-2.

H2afv (-)

(a) 21 jours après la première injection de tamoxifène, la délétion de H2A.Z spécifiquement dans la couche basale de l'épiderme provoque une sévère alopécie principalement localisée au niveau de la peau de la face ventrale, des pattes antérieures et du museau. Cette alopécie s'accompagne de la formation de plaques rouges, d'une peau très sèche et desquamante. (b) Taille des fragments d'ADN attendus suite aux PCR permettant le génotypage des gènes H2afz, H2afv et Cre. (c) Validation des modèles par le génotypage des souris KO (I) et des souris témoin (II).

### IV.3.2 Hyperplasie de l'épiderme KO pour H2A.Z

Afin de caractériser le phénotype externe observé chez les souris KO pour H2A.Z, j'ai réalisé une analyse histologique de la peau des souris, les souris témoins (H2afz<sup>fl/fl</sup>; H2afv<sup>fl/fl</sup>; K14Cre<sup>+/+</sup>) et les souris KO pour H2A.Z (H2afz<sup>-/-</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K14Cre<sup>tg/+</sup>), à J21 après injection de tamoxifène. Des biopsies de peau (ventrale, dorsale, lèvre inférieure et de patte avant) ont été effectuées. De plus, une biopsie des glandes salivaires a été réalisée, mais aucune différence avec les souris témoins n'a été détectée (Figure S. 2).

En microscopie photonique, la première différence frappante est un fort épaississement de l'épiderme, pour la plupart des localisations anatomiques analysées, de la peau des souris KO pour H2A.Z par rapport à celle des souris témoins (Figure IV.3-2). Cet épaississement concerne la couche vivante, à savoir la couche basale et les couches suprabasales, ainsi que la couche cornée. La couche vivante des souris témoins contient 1 à 2 couches de cellules alors que celle des souris KO pour H2A.Z en contient 4 à 6, dans le cas de la peau ventrale (Figure IV.3-2, a), de la patte avant (Figure IV.3–2, c) ainsi que de la lèvre inférieure (Figure IV.3–2, d). La couche cornée de l'épiderme devient beaucoup plus épaisse après induction du KO pour H2A.Z, résultat particulièrement visible sur les coupes de peau ventrale et de peau de la patte avant (Figure IV.3-2, a et Figure IV.3–2, c). La deuxième différence concerne les tiges des poils. Bien que l'on constate une perte de poils significative pour les souris KO pour H2A.Z au niveau du thorax ventral, des follicules pileux sont toujours présents (Figure IV.3-2, a, Figure IV.3-2, c). Leur diamètre épaissi, ainsi que l'épaisseur de l'épiderme pourraient contrecarrer l'émergence du poil. En revanche, il n'y a pas de différence significative dans la région dorsale entre la peau des souris KO pour H2A.Z et la peau des souris témoins (Figure IV.3–2, b). Enfin, chez les souris KO pour H2A.Z nous remarquons également l'apparition de blessures au niveau des pattes avant (Figure IV.3–2, c).



Figure IV.3–2 – L'invalidation des gènes H2afz et H2afv provoque une hyperplasie de l'épiderme chez les souris KO.

Comparaison de la peau de différentes régions d'une souris témoin et d'une souris KO pour H2A.Z, à 21 jours post-tamoxifène. Noter que l'épiderme thoracique ventral (a), de même que celui de la patte avant (c) et de la lèvre inférieure (d) de la souris KO est hyperplasique avec 4 à 6 couches de cellules basales et suprabasales au lieu de 1 à 2 cellules basales et suprabasales pour le témoin. Aucune différence n'a été observée au niveau de la peau dorsale (b). Coloration trichromatique HES (hématoxyline, éosine et safran). Couche basale (CB), couche cornée (CC), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), derme (D), épiderme (E), follicule pileux (HF), gaine folliculaire externe (ORS), glandes sébacées (SG).

En microscopie électronique, dans le cas des souris témoins une seule image permet de représenter une partie du derme ainsi que la totalité de l'épiderme (Figure IV.3–3, a). Ce dernier comprend ses différentes couches, composées chacune de 1 à 2 cellules en épaisseur : basale, épineuse, granuleuse et cornée. Dans le cas des souris KO pour H2A.Z, par contre plusieurs images sont requises afin de pouvoir visualiser toutes les couches de l'épiderme (Figure IV.3–3, b, c, d, e). La perte d'expression de H2A.Z dans la couche basale de l'épiderme conduit à une augmentation de l'épiaisseur de l'épiderme. L'ensemble des couches vivantes (couches basale, épineuse et granuleuse) correspond à une épaisseur de moins de 10 µm chez les souris témoins alors que chez les souris KO pour H2A.Z cet ensemble mesure environ 50 µm d'épaisseur. Chez les souris KO pour H2A.Z la couche granuleuse comprend environ 3 cellules en épaisseur (Figure IV.3–3, c, d) ; en ce qui concerne la couche épineuse et la couche basale, il est difficile de les délimiter mais, à deux, elles se composent de 3 à 4 cellules en épaisseur (Figure IV.3–3, e). De même, la couche cornée est plus épaisse allant d'environ 1 µm chez les souris témoin jusqu'à environ 40 µm chez les souris KO pour H2A.Z (Figure IV.3–3, b).

En plus de l'hyperplasie épidermique, on note une augmentation de la taille des granules de kératohyaline dans le cytoplasme des kératinocytes de la couche granuleuse de la souris KO, par rapport à ceux de la souris témoin (Figure IV.3–3, a, b). Ces granules peuvent atteindre une taille d'environ 2,5  $\mu$ m, donc pratiquement la moitié de la taille d'un noyau (Figure IV.3–3, c), alors qu'ils ne mesurent en moyenne chez le témoin que de 1 à 1,5  $\mu$ m (Figure IV.3–3, a).



Figure IV.3–3 – Observation par microscopie électronique à transmission de l'épiderme hyperplasique des souris KO pour H2A.Z

Épiderme thoracique ventral de souris témoin (a) et de souris KO (b-e), 21 jours après l'injection de tamoxifène. Chez la souris témoin, toutes les couches composant l'épiderme, à savoir la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée ainsi que le derme. (b-e) Chez la souris KO, toutes les couches de l'épiderme sont plus épaisses que chez le témoin. (b) La couche cornée est environ 40 fois plus épaisse (accolade rouge). (c, d, e) Cette hyperplasie est également visible en ce qui concerne la couche granuleuse (c et d), ainsi que la couche épineuse (d et e) et la couche basale (e). Noter une augmentation de la taille des granules de kératohyaline. La ligne en pointillés rouge permet de visualiser le passage d'une couche à l'autre de l'épiderme. La ligne en pointillés jaune délimite le contour d'une cellule. Couche basale (CB), couche cornée (CC), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), derme (D), fibres de collagène (c), grains de kératohyaline (kh), mitochondrie (m), noyau (N). Microscopie électronique à transmission.



Figure IV.3–4 – Observation par microscopie électronique de la structure de l'épiderme thoracique ventral et des kératinocytes basaux, 21 jours après la première injection de tamoxifène.

(a) Alors que dans l'épiderme de la souris témoin le noyau des kératinocytes basaux est orienté parallèlement à la lame basale, (b) dans le cas de la souris KO, des « niches », dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire comportent des kératinocytes avec une orientation perpendiculaire à la lame basale. (c) Les kératinocytes basaux de la peau témoin adhèrent les uns aux autres par de nombreux desmosomes. (d) La perte d'expression de H2A.Z provoque une diminution du nombre de desmosomes et une augmentation de l'espace intercellulaire. (e) L'interaction entre le derme et les kératinocytes épidermiques basaux se fait par l'intermédiaire de la jonction dermo-épidermique composée, entre autres, d'hémidesmosomes. (f) L'adhérence des kératinocytes de la couche basale à la matrice extracellulaire n'est pas impactée par la perte d'expression de H2A.Z. Les hémidesmosomes et la lame basale sont intacts après le knock-out. Peau de souris thoracique ventrale âgée de 6-8 mois, 21 jours après injection de tamoxifène. Couche basale (CB), couche cornée (CC), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), derme (D), desmosomes (d), fibres de collagène (c), filaments de kératine (k), hémidesmosomes (hd), lame basale (LB), mitochondrie (m). Microscopie électronique à transmission.

En plus de l'hyperplasie de l'épiderme, de l'augmentation du nombre de cellules dans chacune des couches ainsi que de l'augmentation de la taille des granules de kératohyaline, la perte d'expression de l'histone variante H2A.Z provoque le changement de polarité des kératinocytes basaux localisés dans des « niches ». Alors que les kératinocytes basaux, chez les souris témoins sont généralement orientés parallèlement à la lame basale, chez les souris KO pour H2A.Z des kératinocytes basaux se trouvent regroupés dans des « niches » où ils ont une orientation perpendiculaire à la lame basale (Figure IV.3–4, a, b).

Ce changement de polarité cellulaire pourrait être dû à une diminution du nombre des adhérences entre la lame basale et la membrane cellulaire, appelées hémidesmosomes. L'analyse de l'état de la lame basale ainsi que des hémidesmosomes et sa comparaison entre les souris témoins (Figure IV.3–4, e) et les souris KO pour H2A.Z (Figure IV.3–4, f) ne permet pas de trouver de différences significatives. Par conséquent, le phénotype provoqué par le KO de H2A.Z n'est pas lié à une perte d'adhérence des cellules de la lame basale avec le derme. On remarque également une augmentation de l'espace intercellulaire au niveau des kératinocytes basaux (Figure IV.3–4, c, d). Lorsque l'on compte le nombre de desmosomes présents sur les membranes latérales des kératinocytes basaux, chez les souris témoins et chez les souris KO pour H2A.Z, on constate une forte diminution du nombre de desmosomes corrélée avec une augmentation de l'espace intercellulaire (Figure IV.3–4, b, c, d).

#### IV.3.3 Localisation des kératinocytes dépourvus en H2A.Z

Afin de confirmer que l'invalidation des gènes H2afz et H2afv a été réalisé spécifiquement au niveau des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme et que les cellules correspondantes n'expriment plus l'histone variante H2A.Z-1 et H2A.Z-2, nous avons utilisé un anticorps qui reconnait spécifiquement les deux isoformes, sur des coupes de peau ventrale provenant de souris KO pour H2A.Z et de souris témoins (Figure IV.3–5). Dans le cas des souris témoins, on constate comme prévu une co-localisation parfaite entre le Hoechst et l'histone variante H2A.Z présents tous deux à l'intérieur des noyaux. Ce résultat est cohérent avec la littérature puisque l'histone variante H2A.Z est une protéine nucléaire, essentielle entre autres, au maintien de la structure de la chromatine (Figure IV.3–5).

Le panel (a) de la Figure IV.3–5 montre l'expression de l'histone variante H2A.Z dans les cellules de l'épiderme interfolliculaire d'une biopsie de peau thoracique ventrale de souris témoins et de souris KO pour H2A.Z. De place en place, dans le cas des souris KO pour H2A.Z, des « niches » de cellules épidermiques sont dépourvues de H2A.Z (Figure IV.3–5, a). L'analyse de l'expression de H2A.Z dans les follicules pileux, de la peau thoracique ventrale d'une souris

témoin et KO, montre que chez les souris KO pour H2A.Z un nombre élevé de cellules folliculaires n'expriment plus H2A.Z, et ceci dans la plupart des follicules pileux (Figure IV.3– 5, b). Il reste cependant quelques cellules exprimant H2A.Z dans le follicule (Figure IV.3–5, b).



Figure IV.3–5 – Les kératinocytes dépourvus de protéine H2A.Z se trouvent localisés dans quelques niches de l'épiderme interfolliculaire et sont principalement localisés au niveau des follicules pileux.

Peau ventrale de souris âgées de 6 à 8 mois, 21 jours après la première injection de tamoxifène. Alors que chez le témoin, H2A.Z s'exprime dans toutes les cellules, **(a)** au niveau de l'IFE, des niches regroupent des kératinocytes KO pour H2A.Z. **(b)** Ceci est également le cas dans les follicules pileux. Les accolades et flèches rouges indiquent les régions KO pour H2A.Z. Microscopie à épifluorescence : H2A.Z (anticorps anti-H2A.Z, vert), ADN (Hoechst, bleu). Couche basale (CB), derme (D), épiderme (E), follicule pileux (HF), glandes sébacées (SG).

# IV.3.4 Impact de l'invalidation des gènes H2afz et H2afv sur la différenciation de l'épiderme

L'hyperplasie de l'épiderme provoquée par la perte d'expression de l'histone variante H2A.Z est-elle due à un déséquilibre dans la balance entre le processus de prolifération et de différenciation ? La perte de H2A.Z provoque-t-elle un défaut ou un arrêt de la différenciation ? Afin de répondre à ces questions, j'ai réalisé des analyses d'immunofluorescence en utilisant des anticorps permettant de détecter les protéines spécifiques de chacune des couches de l'épiderme, puis comparé la peau de souris témoin et de souris KO afin de caractériser le rôle de l'histone variante H2A.Z dans la différenciation terminale des kératinocytes.

La loricrine s'exprime spécifiquement dans les kératinocytes de la couche granuleuse et de la couche cornée. On retrouve des kératinocytes exprimant la loricrine, dans l'épiderme des souris témoins ainsi que dans l'épiderme des souris KO pour H2A.Z. L'épiderme des souris témoins est extrêmement fin et il est difficile de distinguer la couche granuleuse de la couche cornée. Nous pouvons tout de même faire la différence entre les couches de cellules vivantes, visibles par les noyaux des cellules, et la couche de cellules mortes qu'est la cornée, anucléée (Figure IV.3–6, a). Dans le cas de l'épiderme des souris KO pour H2A.Z, nous distinguons la couche granuleuse ainsi que les couches du dessous, la couche épineuse et la couche basale. La couche granuleuse des souris KO pour H2A.Z se compose de 2 à 3 couches de cellules. Les cellules en dessous, qui n'expriment pas la loricrine, correspondent aux kératinocytes épineux et basaux et sont environ au nombre de 3 niveaux de cellules (Figure IV.3–6, a).

La kératine 10 forme avec la kératine 1 le couple de kératines spécifique de la couche épineuse de l'épiderme. Son expression débute à partir de la couche épineuse, au dépend de l'expression de K5/K14, lorsque les cellules d'amplification transitoire (TA) commencent leur processus de différenciation terminale et migrent depuis la couche de prolifération. La couche épineuse de l'épiderme témoin n'est formée que d'environ 1 à 2 cellules en épaisseur, alors que la couche épineuse de l'épiderme KO pour H2A.Z est constituée de 2 à 3 cellules en épaisseur (Figure IV.3–6, b). Toutes les cellules de l'épiderme situées en dessous de la couche épineuse, exprimant la kératine 10, sont des kératinocytes épidermiques de la couche basale, n'exprimant pas la kératine 10. La couche basale, formée d'une seule couche de cellules dans l'épiderme témoin, est dans l'épiderme KO pour H2A.Z formée de 2 à 3 cellules en épaisseur.



Figure IV.3–6 – Expression des marqueurs de différenciation spécifiques des couches épineuse et granuleuse de l'épiderme dans la peau de souris témoin et de souris KO pour H2A.Z

Peau ventrale de souris âgées de 6 à 8 mois, 21 jours après la première injection de tamoxifène. (a) L'expression de la loricrine est spécifique de la couche granuleuse et de la couche cornée. Les cellules n'exprimant pas la loricrine sont les kératinocytes de la couche épineuse et basale. Chez la souris KO, la couche granuleuse s'épaissie et passe de 1 à 2 cellules, pour la souris témoin, à 2 à 3 cellules. (b) L'expression de la kératine 10 (K10) est caractéristique des couches suprabasales de l'épiderme et débute par la couche épineuse. Les cellules qui n'expriment pas la K10, en dessous de la couche épineuse, correspondent aux kératinocytes basaux. Chez la souris KO, la couche basale ainsi que la couche épineuse s'épaississent et passent, chacune, de 1 à 2 cellules, pour la souris témoin, à 2 à 3 cellules. Couche basale (CB), couche cornée (CC), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), derme (D), épiderme (E), follicule pileux (HF). Microscopie à épifluorescence : K10 (anticorps anti-K10, rouge), loricrine (anticorps anti-loricrine, rouge), ADN (Hoechst, bleu). Les pointillés blancs délimitent l'ensemble de la couche basale et épineuse en (a) ainsi que la couche basale en (b).
### IV.3.5 Impact de l'invalidation des gènes H2afz et H2afv sur la prolifération des kératinocytes basaux épidermiques

Le facteur de transcription p63 est essentiel au développement de l'épiderme (Koster and Roop, 2004). Chez adulte, l'expression de ce facteur est prédominante au niveau de la couche basale, où il est considéré comme un marqueur d'hyperprolifération, puis son expression diminue progressivement au fur et à mesure de la stratification de l'épiderme (Koster and Roop, 2004). De plus, p63 est essentiel au maintien de la capacité proliférative des kératinocytes basaux (Koster and Roop, 2004). Ainsi, la région où l'expression de p63 est la plus forte correspond à la localisation des cellules TA prolifératives, au niveau de la couche basale, qui subissent ensuite le processus de différenciation terminale jusqu'à leur mort ou cornification.

L'épaisseur totale de l'épiderme thoracique ventral de la peau de souris témoin est extrêmement fine et se compose de 1 à 2 cellules en épaisseur. Le facteur de transcription p63, traduisant des cellules en prolifération, s'exprime dans la couche basale de la souris témoin sur 1 (à 2) cellules en épaisseur (Figure IV.3–7, a). Par contre, l'épiderme ventral de la souris KO pour H2A.Z, composé de 4 à 6 couches de cellules nucléées, exprime le marqueur de prolifération p63 sur une épaisseur 3 à 4 cellules au-dessus de la membrane basale (Figure IV.3–7, a).

La kératine K6 (type II) a une expression limitée dans l'épithélium sain. L'expression de la kératine 6 est induite lorsque l'homéostasie de la peau est perturbée, dans une situation de stress particulier pour la peau, ou dans des conditions d'hyperprolifération, comme dans le cas du psoriasis (Navarro et al., 1995; Leigh et al., 1995). Alors que les kératinocytes de l'épiderme de souris témoin expriment de manière physiologique la kératine 6 dans 1 à 2 couches de cellules en épaisseur, le nombre de kératinocytes de l'épiderme KO pour H2A.Z qui expriment K6 augmente. Ceci est corrélé à l'augmentation du nombre de cellules et à l'hyperplasie qui caractérise le phénotype de l'épiderme KO pour H2A.Z (Figure IV.3–7, b).

Ce résultat vient appuyer le résultat précédent selon lequel le phénotype hyperplasique observé sur l'épiderme des souris KO pour H2A.Z serait dû à l'hyperprolifération de la couche basale. Quel rôle l'histone variante H2A.Z pourrait-elle jouer sur la prolifération cellulaire ? Cela implique-t-il les cellules souches épidermiques et folliculaires ? Qu'en est-il du maintien du caractère souche des cellules ?



Figure IV.3–7 – Expression des marqueurs d'hyperprolifération dans la peau de souris témoin et de souris KO pour H2A.Z.

Peau ventrale de souris âgées de 6 à 8 mois, 21 jours après la première injection de tamoxifène. (a) Augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et du nombre de cellules de la couche basale exprimant le marqueur p63, passant de 1-2 cellules (témoin) à 3-4 cellules (KO). (b) La kératine 6, surexprimée dans l'épiderme de souris KO, témoigne d'une hyperprolifération cellulaire. Microscopie à épifluorescence : p63 (anti-p63 en rose), K6 (anticorps anti-K6), ADN (Hoechst en bleu). Les pointillés blancs délimitent l'épaisseur de l'épiderme souligné par l'accolade. Derme (D), épiderme (E), follicule pileux (HF).

### IV.3.6 Détection des cellules en mitose, après l'invalidation des gènes H2afz et H2Afv, par la présence de l'histone H3Ser10P

Les cellules en cours de division peuvent être identifiées grâce à l'anticorps reconnaissant l'histone H3 phosphorylée sur le résidu de la sérine en position 10 (H3Ser10P). Dans les cellules mitotiques de mammifères, cette modification post-traductionnelle a lieu initialement au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique en interphase, en fin de phase G2, puis s'étend uniformément sur la totalité de la chromatine au cours de la condensation des chromosomes au cours de la mitose. La phosphorylation diminue puis disparait en fin d'anaphase et début de télophase (Prigent and Dimitrov, 2003).

Chez la souris témoin, la peau de la région ventrale montre la localisation de l'histone H3 phosphorylée sur la Ser10 dans l'épiderme interfolliculaire et le follicule pileux en anagène, plus particulièrement au niveau du bulbe ainsi que de la gaine externe folliculaire (ORS) (Figure IV.3– 8). Chez la souris KO pour H2A.Z, on note un changement dans le profil d'expression de H3Ser10P. On constate une disparition quasi-totale des cellules H3Ser10P positives au niveau de la couche basale interfolliculaire de même qu'au niveau du follicule pileux. En revanche, on note un très fort marquage de H3Ser10P au niveau des couches suprabasales de l'épiderme, au niveau de la couche épineuse (Figure IV.3–8).

À partir de ces résultats nous pouvons affirmer que les cellules TA de la couche basale, où la quantité de protéine H2A.Z est totalement absente, ont perdu leur capacité de prolifération puisqu'elles ne sont plus phosphorylées sur la Ser10 de H3. Ceci est également le cas au niveau des follicules pileux concernant les cellules TA matricielles, au niveau du bulbe, ainsi que les cellules TA de l'ORS.



Figure IV.3–8- Impact de l'invalidation génétique de H2afz et H2afv sur la capacité mitotique des kératinocytes basaux de l'épiderme.

Peau ventrale de souris, âgées de 6-8 mois, 21 jours après la première injection de tamoxifène. L'histone H3 phosphorylée sur la sérine 10 s'exprime dans les cellules en cours de division. Chez la souris témoin, les cellules H3Ser10P+ sont localisées au niveau des follicules pileux, au niveau du bulbe et de l'ORS, ainsi qu'au niveau de la couche basale de l'épiderme interfolliculaire. Dans le cas de la souris KO, on note une diminution quasi totale des cellules H3Ser10P+ au niveau du follicule pileux et de l'assise basale de l'épiderme interfolliculaire, alors qu'une accumulation significative des cellules H3Ser10P+ est visible dans les couches suprabasales. Microscopie à épifluorescence: H3Ser10P (anticorps anti-H3Ser10P, rouge). ADN (Hoechst, bleu). Bulbe (Bb), bulge (Bg), couche basale (CB), couche cornée (CC), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), derme (D), épiderme (E), follicule pileux (HF), gaine folliculaire externe (ORS) et tige du poil (HS).

# IV.3.7 Impact de la perte d'expression de H2A.Z sur le maintien du caractère souche des cellules épidermiques et folliculaires

Nous nous sommes posé la question de savoir si la perte d'expression de H2A.Z dans les kératinocytes épidermiques basaux, chez les souris adultes, avait un impact sur la maintenance du réservoir de HFSCs ainsi que sur le déroulement des cycles des follicules pileux. Nous avons précédemment noté une diminution quasi-totale de l'expression de l'histone variante H2A.Z au niveau de « niches » de l'épiderme interfolliculaire ainsi qu'au niveau des follicules pileux (Figure IV.3–5, Figure IV.3–9, a.1, b.1). Quelques cellules expriment encore H2A.Z, au niveau du follicule pileux, ainsi qu'au niveau de ce qui semblent être les glandes sébacées. Dans le bulge se trouvent des cellules souches en quiescence, qui ne se divisent pas. Dans le bulbe se trouvent des cellules d'amplification transitoire (TA), jeunes et âgées, le nombre de divisions des cellules TA jeunes étant plus élevé que pour les cellules TA âgées. L'expression de l'histone variante H2A.Z diminue au cours des divisions des cellules TA. Compte tenu du fait que les cellules quiescentes ont un cycle de division extrêmement long, il est normal que la protéine H2A.Z y soit encore exprimée. Les HFSCs sont toujours Sox9+ donc, à ce moment, la quiescence des HFSCs n'est pas affectée par l'invalidation des gènes H2afz et H2afv (Figure IV.3-9, a et b). Cependant, ayant montré précédemment que le KO de H2A.Z engendre une hyperprolifération cellulaire, et que les follicules pileux semblent être de diamètre plus épaissi, il est probable que le KO de H2A.Z engendre des problèmes au niveau de l'émergence du poil ou de la croissance du poil lors des cycles suivants.

Chez les souris témoins, les HFSCs expriment CD34 au niveau du bulge des follicules et cette expression est perdue lorsque les HFSCs deviennent des cellules d'amplification transitoire (TA) (Figure IV.3–10, a). Chez les souris KO, on constante une disparition complète du marquage CD34 au niveau du follicule pileux (Figure IV.3–10, a).

Dans l'épiderme des souris témoins, l'expression de K15 accompagne celle de CD34 au niveau des HFSCs du bulge et des SCs de l'épiderme interfolliculaire (Figure IV.3–10, b). Suite au KO de H2A.Z, on note une disparition complète de l'expression de la kératine 15 au niveau de l'épiderme interfolliculaire. L'expression de la K15 diminue également au niveau du bulge du follicule pileux mais ne disparait pas complètement (Figure IV.3–10, b).

Alors que chez les souris témoins, la protéine H2A.Z est exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les cellules de l'épiderme interfolliculaire et folliculaire (Figure IV.3–10, a), dans le cas de la souris KO, l'expression de H2A.Z est fortement diminuée dans certaines niches de l'épiderme interfolliculaire, et cette diminution est pratiquement totale au niveau des follicules

pileux (Figure IV.3–5, b et Figure IV.3–9, a.1, b.1). Il ne reste qu'un nombre très faible de cellules au niveau de la gaine folliculaire externe qui expriment toujours H2A.Z (Figure IV.3–10, a). Que peut-on conclure en ce qui concerne l'impact du KO de H2A.Z sur les cellules souches ?



H2A.Z, Sox 9, ADN

Figure IV.3-9 - Expression de H2A.Z et de Sox9 dans l'épiderme de souris adulte après le KO de H2A.Z

Peau thoracique ventrale de souris âgées de 6 à 8 mois, 21 jours après la première injection de tamoxifène. **(a.1-b.1)** Le KO de H2A.Z est pratiquement complet au niveau des follicules pileux, principalement au niveau du bulge du follicule pileux. **(a.2-b.2)** Sox9 n'est pas exprimé dans l'IFE mais seulement dans les follicules pileux. Chez la souris KO, les HFSCs sont Sox9+. Microscopie à épifluorescence : H2A.Z (anticorps anti-H2A.Z, vert), Sox9 (anticorps anti-Sox9, rouge), noyaux (Hoechst, bleu). Les pointillés blancs délimitent la membrane basale. Couche basale (CB), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), couche cornée (CC), épiderme (E), derme (D), follicule pileux (HF), glandes sébacées (SG).



H2A.Z, K15, Hoechst

Figure IV.3–10 – Comparaison de l'expression des marqueurs caractéristiques des cellules souches épidermiques et folliculaires, CD34 et K15, après le KO de H2A.Z.

(a) Le KO provoque une perte complète de l'expression du marqueur CD34 dans le bulge du follicule pileux. (b) Le KO provoque une perte complète de l'expression du marqueur K15 dans l'épiderme interfolliculaire. L'expression de K15 au niveau du bulge diminue mais ne disparait pas complètement. Peau thoracique ventrale d'une souris adulte, âgée de 6 à 8 mois, 21 jours la première injection de tamoxifène. Microscopie à épifluorescence, H2A.Z (anticorps anti-H2A.Z, vert (a) et rouge (b)), CD34 (anticorps anti-CD34, vert), K15 (anticorps anti-K15, rouge) et les noyaux (Hoechst, bleu). Les pointillés blancs délimitent la membrane basale.

### <u>Chapitre IV.4</u> Impact de la perte d'expression de H2A.Z sur la formation de la peau au cours de l'embryogénèse

La formation de la peau au cours du développement embryonnaire se déroule en plusieurs étapes (section 2.4.1). Nous nous sommes focalisés sur le développement embryonnaire à partir de l'étape d'engagement à E9.5, au cours de laquelle les cellules ectodermiques remplacent l'expression des kératines K8/K18 par l'expression des kératines K5/ K14. Ce remplacement est à l'origine de l'engagement des cellules ectodermiques dans la lignée de cellules épidermiques.

L'invalidation des gènes H2afz et H2afv au cours de l'embryogénèse a été effectué par deux méthodes différentes. La première méthode utilise la Recombinase-Cre inductible par l'injection de tamoxifène, CreER<sup>T2</sup>. Pour cela, les souris gravides ont été traitées par injection de tamoxifène entre E8.5 et E12.5, puis nous avons récupéré les embryons à E.17.5. La deuxième méthode utilise la Recombinase-Cre constitutive, Cre. Puisque la Recombinase exprimée par le transgène K14CreER<sup>T2</sup> n'est à 100% activée seulement que pendant les 24 heures après l'injection, et pour éviter d'injecter le tamoxifène à des nouveau-nés, le KO a été réalisé au cours de l'embryogénèse, grâce au transgène K5Cre dont l'activité est constitutive, pour étudier l'effet périnatal et postnatal du KO de H2A.Z.

### IV.4.1 Impact de l'invalidation des gènes H2afz et H2Afv, induite par l'activité de la CreER<sup>T2</sup>, sur le développement de la peau embryonnaire

# IV.4.1.1 Phénotype macroscopique à 17.5 jours de développement embryonnaire

L'expression de la Recombinase-Cre débute en concomitance avec l'expression du couple de kératines K5/K14. À partir de E14.5, les cellules de la couche basale, exprimant K5/K14, vont proliférer et la maturation de l'épiderme se fait entre E15.5 et E19.5. À E17.5 la stratification est pratiquement terminée. Afin d'élucider l'impact de la perte d'expression de l'histone variante H2A.Z au cours du développement embryonnaire, nous avons étudié des embryons âgés de 17.5 jours de gestation (E17.5), car à ce stade la stratification est pratiquement terminée. L'observation macroscopique de la peau des embryons témoins ou des embryons KO pour H2A.Z à E.17.5 n'a montré aucun phénotype détectable.

### IV.4.1.2 L'injection de tamoxifène chez la souris gravide induit la perte d'expression de H2A.Z par les kératinocytes basaux de l'embryon à E17.5

*In-vivo*, dans notre modèle de souris transgénique, la quantité de protéine H2A.Z disponible pour l'incorporation dans la chromatine des kératinocytes basaux épidermiques diminue progressivement au cours des divisions cellulaires successives et donc au fil des jours. En comparaison avec les embryons témoins (E17.5) qui expriment H2A.Z dans l'ensemble des cellules de l'épiderme, les embryons KO pour H2A.Z (E17.5) n'expriment la protéine H2A.Z pratiquement que dans les cellules du derme (Figure IV.4–1). On constate une perte quasi-totale de l'expression de l'histone variante H2A.Z par les kératinocytes basaux épidermiques ainsi que par les kératinocytes formant le bourgeon pileux (Figure IV.4–1). Quelques cellules expriment toujours H2A.Z et sont plutôt localisées au centre du bourgeon pileux et seront éliminées par la suite (Figure IV.4–1).

Chez les embryons, à 15.5 jours de gestation, nous n'observons pas le phénotype d'hyperplasie de l'épiderme qui avait été observé dans le cas de la délétion de H2A.Z à l'âge adulte (Figure S. 3). Chez les embryons, à 17.5 jours de gestation, l'épaisseur de l'épiderme témoin et de l'épiderme KO pour H2A.Z est équivalente (Figure IV.4–1). Lorsque l'on compare l'épaisseur de la couche basale, où les kératinocytes expriment K14, nous ne remarquons pas de différence significative entre les embryons témoins et les embryons KO pour H2A.Z (Figure S. 4).

Chez l'embryon, l'expression physiologique de p63 est maximale au niveau des kératinocytes basaux puis diminue progressivement au fur et à mesure que les kératinocytes s'engagent dans le processus de stratification de l'épiderme. On note que l'expression de p63 par les kératinocytes basaux est similaire entre l'embryon témoin (E17.5) et l'embryon KO pour H2A.Z (Figure S. 5).

Les embryons KO pour H2A.Z ne montrent aucun changement dans l'épaisseur totale de l'épiderme, ni dans l'épaisseur de la couche basale. Le KO de H2A.Z ne semble pas perturber la prolifération des kératinocytes de la couche basale ni l'initiation de la stratification de l'épiderme. Qu'en est-il du développement et de l'homéostasie de la peau d'un souriceau âgé de quelques jours ? Pour répondre à cette question il fallait laisser naître les embryons témoins et les embryons KO et suivre le développement périnatal des souriceaux.



Figure IV.4-1 - Confirmation du knock-out de H2A.Z dans les kératinocytes basaux embryonnaires à E.17.5.

À 17.5 jours de gestation embryonnaire, la délétion de H2A.Z au niveau des kératinocytes basaux est quasiment totale. Cette délétion est particulièrement nette au niveau des bourgeons pileux. L'épaisseur de l'épiderme est similaire dans le cas de la peau témoin et de la peau KO. Peau d'embryon ventrale (E17.5). Microscopie à épifluorescence : H2A.Z (anticorps anti-H2A.Z, en vert), ADN (Hoechst, en bleu). Bourgeon du poil (BP), couche basale (CB), derme (D), épiderme (E).

### IV.4.2 Impact de l'invalidation des gènes H2afz et H2afv, induite par l'activité de la K5Cre constitutive, sur le développement postnatal de la peau

#### IV.4.2.1 Phénotype macroscopique observé après la naissance

Afin d'obtenir des souriceaux dont les kératinocytes épidermiques basaux ont le génotype souhaité, à savoir H2afz<sup>-/-</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>, nous avons croisé des femelles (H2afz<sup>-/-</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>) avec un mâle (H2afz<sup>+/fl</sup>; H2afv<sup>+/fl</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup>). Nous obtenons dans une même portée différents génotypes et nous avons 1 chance sur 8 d'obtenir un souriceau H2afz<sup>-/-</sup> H2afv<sup>-/-</sup> K5Cre<sup>tg/+</sup>. À leur naissance, les souriceaux KO pour H2A.Z présentent le même phénotype que les souriceaux témoins de la même portée, à savoir un phénotype macroscopique de peau saine. Cependant, aux alentours du 5<sup>ème</sup> jour après la naissance, les souriceaux KO pour H2A.Z développent un phénotype particulier : une peau très sèche, épaisse et craquelée, plus rouge que celle des souriceaux témoins (Figure IV.4–2, a.1, a.2). On note un retard de croissance des souriceaux KO pour H2A.Z: à J8 le souriceau KO qui est légèrement plus petit que le souriceau

témoin (Figure IV.4–2, a.1). Ce phénomène devient flagrant à J12 (Figure IV.4–2, a.2). De plus, un retard de l'émergence du poil chez les souriceaux KO pour H2A.Z par rapport aux souriceaux témoins de la même portée a été noté (Figure IV.4–2, a.1, a.2). En moyenne les souriceaux KO pour H2A.Z finissent par décéder entre le 9<sup>ème</sup> (souris en a.1) et le 13<sup>ème</sup> jour (souris en a.2) après la naissance. Le jour avant le décès, les souriceaux sont très maigres, plus petits que les souriceaux témoins et présentent des signes d'hypokinésie. Afin de diminuer leur souffrance, nous avons fixé le point final de l'expérimentation, l'euthanasie des souriceaux, entre J6 et J12 après la naissance suivant la gravité du phénotype développé par le souriceau. La caractérisation du phénotype réalisée au cours de cette partie a donc été effectuée sur des coupes de peau d'une souris âgée de 6 à 12 jours.

Le génotypage des souriceaux a été réalisé en utilisant de l'ADN génomique extrait à partir d'une biopsie de queue. Le génotype de des cellules de la queue a été vérifié par PCR. On teste l'état des deux allèles des gène H2afz et H2afv (*wild-type* (<sup>+/+</sup>), floxé (<sup>fl/fl</sup>) et/ou délété (<sup>-/-</sup>)) ainsi que la présence ou non du transgène de la Recombinase-Cre (<sup>tg/+ ou +/+</sup>). Ci-après nous comparons deux souriceaux, nommés (1) et (2).

Les souriceaux (1) n'ont pas le transgène de la Cre (Cre<sup>+/+</sup>) et par conséquent ils sont H2afz<sup>fl/fl</sup>; H2afv<sup>fl/fl</sup> (Figure IV.4–2, b). Le génotypage des souriceaux (1) explique pourquoi ils n'ont pas développé de phénotype sur la peau. Ainsi les souriceaux (1) peuvent être utilisés comme témoins.

Les souriceaux (2), ont développé le phénotype (Figure IV.4–2, a). Le génotype de ses souriceaux est H2afz<sup>-/-</sup>; H2afv<sup>-/-</sup>; K5Cre<sup>tg/+</sup> (Figure IV.4–2, b). Le développement de ce phénotype macroscopique caractéristique est donc confirmé par le génotype des souriceaux (2) qui sont invalidés pour les gènes H2afz et H2afv (Figure IV.4–2, b).

L'apparition de ce phénotype est récurrente puisque tous les souriceaux nés avec le génotype H2afz -/- ; H2afv -/- ; K5Cre <sup>tg/+</sup> ont montré les mêmes problèmes de peau contrairement aux souriceaux témoins de chaque même portée dont la peau était intacte.





Figure IV.4–2 – Résultat de l'invalidation génétique *in-vivo* des deux gènes, H2afz et H2afv, chez souriceaux âgés de 8 et 12 jours.

Phénotype macroscopique des souriceaux, âgés de 8 et 12 jours, après KO de H2A.Z lors de la formation de l'épiderme au cours de l'embryogénèse (a.1 et a.2). Le phénotype développé par les souriceaux KO est ubiquitairement distribué sur la peau. (a.1) La peau d'un souriceau KO, âgé de 8 jours, devient plus épaisse, craquelée et rouge. On note un retard de l'émergence du poil. Ce souriceau est décédé au 9<sup>ème</sup> jour après la naissance. (a.2) La peau du souriceau KO, âgé de 12 jours, devient de plus en plus rouge, asséchée et ridée. On note également un ralentissement dans l'émergence des poils ainsi qu'un retard de croissance flagrant en comparaison avec le souriceau témoin de la même portée (colonne de droite). Ce souriceau est décédé au 13<sup>ème</sup> jour après la naissance. (b) Confirmation des génotypes du souriceau témoin (1) et du souriceau KO (2) pour les gènes H2afz, H2afv et la Recombinase-Cre.

# IV.4.2.2 Impact de l'invalidation des gènes H2afz et H2afv sur la différenciation de l'épiderme chez le souriceau

L'invalidation des gènes H2afz et H2afv dans les kératinocytes basaux, effectuée au cours de l'embryogénèse lors en concomitance avec l'expression de la kératine 5, induit une perte quasi-totale de l'expression de la protéine H2A.Z, ce qui provoque l'apparition d'un phénotype macroscopique caractéristique aux alentours du 5<sup>ème</sup> jour périnatal. Qu'en est-il de l'impact de cette forte perte d'expression de H2A.Z par les kératinocytes basaux sur la différenciation cellulaire et la mise en place des différentes couches structurant l'épiderme ?

L'invalidation des gènes H2afz et H2afv au niveau de l'épiderme embryonnaire formé d'une seule couche ne perturbe pas la stratification ultérieure. L'expression de la kératine 14, spécifique de la couche basale proliférative, est identique entre la couche basale des souriceaux témoins et celle des souriceaux KO pour H2A.Z. Il n'existe pas de différence significative en ce qui concerne l'épaisseur de la couche basale (Figure S. 6). De même, l'invalidation des gènes H2afz et H2af ne semble pas affecter la différenciation des kératinocytes épidermiques basaux en kératinocytes épineux. En effet, l'expression de la kératine 10 par les kératinocytes de la couche épineuse est identique entre les souriceaux témoins et les souriceaux KO pour H2A.Z (Figure IV.4-3, a). Par contre, une différence significative concerne la différenciation des kératinocytes épineux en kératinocytes granuleux puis en cornéocytes. Le marquage pour la loricrine, spécifiquement exprimée par les kératinocytes de la couche granuleuse et de la couche cornée, nous permet d'évaluer l'épaisseur de ces deux couches. La perte d'expression de H2A.Z provoque un épaississement de la couche granuleuse et de la couche cornée d'un facteur de 2,5, passant d'une épaisseur d'environ 20 µm chez les souriceaux témoins à environ 55 µm chez les souriceaux KO pour H2A.Z (Figure IV.4-3, b). Une accumulation des cornéocytes dans la couche morte de l'épiderme, qui ne sont pas éliminés, donne lieu au phénotype macroscopique caractérisé par une peau plus épaisse, sèche et desquamante. Ce phénomène traduit une dérégulation de l'homéostasie entre la prolifération et la différenciation.



Figure IV.4–3 - Expression des marqueurs de différenciation spécifiques de la couche épineuse et de la couche granuleuse, chez les souriceaux témoins et les souriceaux KO pour H2A.Z effectué au cours de l'embryogénèse.

Peau de queue de souriceau âgé de 8 jours. (a) L'expression de la kératine 10 est spécifique des cellules de la couche épineuse et nous permet d'évaluer son épaisseur. L'épaisseur la couche épineuse est identique entre les souriceaux témoins et les souriceaux KO pour H2A.Z. (b) L'expression de la loricrine est spécifique des cellules de la couche granuleuse et cornée et nous permet d'évaluer leur épaisseur. Les couches granuleuse et cornée des souriceaux KO pour H2A.Z sont 2 à 3 fois plus épaisses que celles des souriceaux témoins. Microscopie optique à épifluorescence : K10 (anticorps anti-K10, rouge), loricrine (anticorps anti-loricrine, rouge), noyaux (Hoechst, bleu). La GFP (en vert) nous permet de confirmer l'activité de la Recombinase-Cre. Couche basale (CB), couche cornée (CC), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), derme (D), épiderme (E), follicule pileux (HF).

### IV.4.2.3 Impact de l'invalidation des gènes H2afz et H2afv sur la prolifération de l'épiderme chez le souriceau

L'épaississement des couches granuleuse et cornée observé à J8 et J12 postnatal chez les souriceaux KO pour H2A.Z est-il dû à un excès de prolifération ?

Nous avons analysé la capacité des cellules à proliférer, puis ensuite leur capacité à s'engager dans la voie de différenciation afin de donner lieu aux cellules de la couche épineuse. La peau dorsale des souriceaux témoins et des souriceaux KO pour H2A.Z, tous deux âgés de 8 jours, ne montre aucune différence significative en ce qui concerne le nombre de cellules exprimant p63 dans les couches basales et suprabasales (Figure S. 7). Le KO de H2A.Z, réalisé pendant la formation de la peau embryonnaire, n'a donc pas d'impact sur la capacité de prolifération des cellules de la couche basale, ni sur leur engagement dans le processus de différenciation afin de former les couches suprabasales.

#### IV.4.2.4 Détection des cellules en mitose de l'épiderme du souriceau après le KO de H2A.Z par la présence de l'histone H3Ser10P

Nous avons montré que toutes les couches différenciées de l'épiderme chez les souriceaux KO pour H2A.Z semblent d'être d'épaisseur identique à celles des souriceaux témoins, sauf la couche cornée qui est plus épaisse chez les souriceaux KO pour H2A.Z que chez les souriceaux témoins (Figure IV.4–3). L'accumulation de cornéocytes dans la couche morte traduit un déséquilibre dans la balance entre la prolifération et la différenciation. Nous n'observons pas d'épaississement global des couches vivantes de l'épiderme (Figure IV.4–4).

Nous avons utilisé la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 afin d'étudier le nombre de cellules en division chez les souriceaux témoins et chez les souriceaux KO pour H2A.Z et donc étudier l'impact de la perte d'expression de H2A.Z sur la mitose des cellules de la couche basale (Figure IV.4–4). Chez les souriceaux témoins, âgé de 7 jours, l'expression de H3Ser10P est localisée principalement au niveau du follicule pileux, principalement au niveau du bulbe et de l'ORS, où sont localisées les cellules d'amplification transitoire (TA) qui ont la capacité de proliférer (Figure IV.4–4). L'absence de H2A.Z, provoque l'apparition de quelques cellules H3Ser10P+ dans l'assise basale de l'IFE (Figure IV.4–4).



Figure IV.4-4 - Impact de l'absence de H2A.Z sur la capacité des kératinocytes basaux à proliférer chez le souriceau.

Chez le souriceau témoin, les cellules en mitose se situent dans les follicules pileux, principalement dans le bulbe et l'ORS. Chez le souriceau KO, les cellules en mitose sont localisées au niveau des follicules pileux mais apparaissent également localisées au niveau de l'épiderme interfolliculaire (flèches). Peau ventrale de souriceaux, âgés de 7 jours. La ligne en pointillé jaune délimite la membrane basale de l'épiderme interfolliculaire. Microscopie à épifluorescence: H3Ser10P (anticorps anti-H3Ser10P, rouge), ADN (Hoechst, bleu).

#### IV.4.2.5 Localisation des kératinocytes dépourvues en H2A.Z

L'analyse de la structure de la peau de souriceaux, âgés de 9 jours et 7 jours postnatal, montre une augmentation du nombre de cellules constituant l'épaisseur de l'épiderme des souriceaux (J9 et J7), témoin et KO pour H2A.Z, par rapport à celle de l'épiderme des embryons (E17.5), témoin et KO pour H2A.Z (Figure IV.4–1, Figure IV.4–5). On note, chez les embryons à E17.5 ainsi que chez les souriceaux à J7 KO pour H2A.Z, que la protéine H2A.Z a quasiment totalement disparu (Figure IV.4–1, Figure IV.4–5). Au cours du développement embryonnaire le nombre de cellules en prolifération est plus important qu'à l'âge adulte, donc le pourcentage de protéine H2A.Z présente dans le noyau diminue rapidement. Le KO au cours de l'embryogénèse impactant toutes les cellules en cours de prolifération et il est donc plus « efficace » lorsqu'il est réalisé pendant la formation de la peau embryonnaire que lorsqu'il est réalisé à l'âge adulte.



Figure IV.4-5 - L'invalidation de H2afz et H2afv réalisée au cours de l'embryogénèse persiste après la naissance.

Peau ventrale de deux souriceaux de génotype différents et âgés de (a) 9 jours et de (b) 7 jours. (a-b) Chez le souriceau témoin, l'expression de H2A.Z est ubiquitaire dans l'épiderme, le KO de H2A.Z est quasi-total au niveau de l'épiderme interfolliculaire et des follicules pileux. Microscopie à épifluorescence : H2A.Z (anticorps anti-H2A.Z, en rouge), ADN (Hoechst, en bleu). La GFP (en vert) nous permet de confirmer l'activité de la Recombinase-Cre. Couche basale (CB), couche cornée (CC), couche épineuse (CE), couche granuleuse (CG), derme (D), épiderme (E), follicule pileux (HF).

# IV.4.2.6 Impact de la perte d'expression de H2A.Z sur le maintien du caractère souche des kératinocytes épidermiques et folliculaires

Quel est l'effet de l'invalidation des gènes H2afz et H2afv, réalisée au cours de la formation embryonnaire de la peau, sur le maintien de la population de cellules souches de l'épiderme interfolliculaire et folliculaire ?

Lorsque débute le développement du poil, les cellules souches ségrégent au niveau des placodes à l'origine des follicules pileux et expriment Sox9 (Nowak et al., 2008). Chez les souriceaux KO pour H2A.Z, âgés de 7 jours (Figure IV.4–5, b), le développement des follicules pileux semble se dérouler normalement (Figure IV.4–6). Chez les souriceaux témoins, Sox9 est exprimé par les cellules localisées au niveau du bulge (Figure IV.4–6). Chez les souriceaux KO pour H2A.Z, la localisation des cellules exprimant Sox9 semble être similaire à celle des témoins, mais le nombre de cellules Sox9+ semble diminuer légèrement (Figure IV.4–6).



Figure IV.4–6 – L'invalidation de H2afz et H2afv, au cours du développement embryonnaire de la peau, n'affecte que très légèrement les cellules souches folliculaires chez le souriceau.

Chez les souriceaux témoins et les souriceaux KO pour H2A.Z, les populations de cellules souches du follicule pileux (HFSCs) en quiescence sont Sox9+ et sont localisées au niveau du bulge (Bg) des follicules pileux. Peau ventrale de souriceau âgé de 7 jours. Microscopie à épifluorescence : Sox9 (anticorps anti-Sox9, en rouge) et ADN (Hoechst, en bleu). Derme (D), épiderme (E), bulge (Bg).

Afin de localiser les HFSCs dans le réservoir du bulge et des SCs de l'épiderme interfolliculaire (IFE) nous avons étudié, en plus de l'expression de Sox9, l'expression de la kératine 15. Rappelons que la kératine 15 est exprimée par les HFSCs dans le bulge, dans le germe du poil ainsi que par les SCs de l'IFE (Plikus et al., 2012).

Chez les souriceaux témoins, nous remarquons l'expression de la K15 dans les cellules de l'épiderme interfolliculaire (Figure IV.4–7). Cependant, les cellules K15+ disparaissent complètement de l'épiderme interfolliculaire suite au KO de H2A.Z réalisé au cours de la formation de la peau embryonnaire, mais semble encore être présent au niveau du bulge (Figure IV.4–7).



Figure IV.4–7 – L'invalidation de H2afz et H2afv, effectuée au cours du développement embryonnaire de la peau, conduit à la perte des cellules souches K15+ au niveau de l'épiderme interfolliculaire chez le souriceau.

Chez les souriceaux témoins, les populations de cellules souches (K15+) sont localisées au niveau du bulge des follicules pileux ainsi qu'au niveau de la couche basale proliférative de l'épiderme. Chez les souriceaux KO pour H2A.Z, il y a une disparition totale de l'expression de K15 dans l'IFE, mais les cellules du bulge sont toujours K15+. Peau ventrale de souriceau âgé de 7 jours. Microscopie à épifluorescence : K15 (anticorps anti-K15, en rouge) et ADN (Hoechst, en bleu). Derme (D), épiderme (E), épiderme interfolliculaire (IFE), bulge (Bg).

# V.Discussion et perspectives

# <u>Chapitre V.1</u> Invalidation génique conditionnelle de H2A.Z dans la peau

Afin d'étudier le rôle de l'histone variante H2A.Z dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes épidermiques, j'ai développé un modèle de souris unique permettant d'invalider les deux gènes codant pour l'histone variante H2A.2, H2afz et H2afv, en concomitance, à un instant voulu et dans un tissu spécifique. Ce modèle de knock-out conditionnel permet d'invalider les deux isoformes au niveau de la couche basale de l'épiderme et d'étudier les effets de la délétion de H2A.Z *in-vivo*, au stade adulte ainsi qu'au stade embryonnaire de la formation de la peau, afin d'établir le rôle de cette histone.

#### V.1.1 Validation du choix de la Recombinase-Cre

Chez la souris adulte, les kératines 14 et 5 s'expriment dans la couche basale de l'épiderme mais également dans d'autres tissus épithéliaux tels que ceux des glandes salivaires, de la langue, de l'œsophage et de l'estomac (Vasioukhin et al., 1999). Entrainée par le promoteur de la K14, la Recombinase-Cre, apportée par le transgène K14CreER<sup>T2</sup>, s'exprime dans ces mêmes tissus (Vasioukhin et al., 1999) mais son expression y est très faible, la plus forte expression se trouvant localisée dans l'épiderme (Wang et al., 1997).

L'injection de 1 mg/souris de tamoxifène induit une forte toxicité de la Cre au niveau des glandes salivaires, létale pour les souris K14Cre <sup>tg/+</sup>. La lignée CreER<sup>T2</sup> est utilisée de préférence, car on l'active par une injection de tamoxifène à une concentration 10 fois moins élevée (Metzger and Chambon, 2011). Aucune différence macroscopique significative n'a été mise en évidence, entre les souris adultes témoins et les souris adultes KO pour H2A.Z, dans les glandes salivaires et la langue. Nous pouvons donc affirmer que le phénotype observé chez les souris adultes (H2afz -/- H2afv -/- K14Cre <sup>tg/+</sup>) n'est pas dû à une toxicité éventuelle de la Recombinase-Cre dans ces tissus.

### V.1.2 L'activité de la Recombinase-Cre est spécifique de la couche basale de l'épiderme et de l'ORS du follicule pileux

La présence du transgène mTmG dans le modèle de souris transgénique H2A.Z-1 H2A.Z-2 K5Cre nous permet de valider la spécificité de la Recombinase-Cre. Nous avons montré que l'activité de la Recombinase-Cre, rapportée grâce à l'expression de la GFP, est détectée dans les kératinocytes basaux de l'épiderme interfolliculaire ainsi que dans les kératinocytes de l'ORS, qui expriment le couple de kératines K14/K5. Nous avons également vérifié que le transgène K5Cre, exprime la Recombinase-Cre de manière constitutive. Sous le contrôle du promoteur K5, la Recombinase-Cre est spécifiquement exprimée par les kératinocytes basaux de peau du souriceau.

# V.1.3 La Recombinase-Cre constitutive est plus efficace dans le temps que la CreER<sup>T2</sup> inductible

L'invalidation des gènes H2afz et H2afv a été effectuée à deux stades de développement différents, au stade embryonnaire et au stade adulte. Le KO de H2A.Z au stade adulte a été réalisé grâce au transgène K14CreER<sup>T2</sup> inductible par l'action du tamoxifène, alors que le KO de H2A.Z au stade embryonnaire a été réalisé, en premier lieu, avec le transgène K14CreER<sup>T2</sup> inductible par l'action du tamoxifène et, en second lieu, avec le transgène K5Cre constitutif. Le nombre de cellules dont la quantité de H2A.Z est totalement épuisée n'est pas le même suivant le transgène utilisé (K14CreER<sup>T2</sup> ou K5Cre) ainsi que suivant le stade de développement de la souris. La CreER<sup>T2</sup> n'est à 100% activée que lors des premières 24 heures après injection du tamoxifène. L'administration de tamoxifène pendant 5 jours consécutifs permet de maintenir la CreER<sup>T2</sup> active pendant 5 jours. La CreER<sup>T2</sup> est donc active sur un court terme et peut causer un phénotype en mosaïque qui finira par s'estomper avec le temps. Le choix du transgène dont l'activité est spontanée (K5Cre), permet de maintenir une activité constante de Cre et donc d'augmenter l'efficacité du KO au cours des divisions cellulaires sur un plus long terme.

Le choix du type de Recombinase-Cre utilisée dépend de la question posée, à savoir si l'on souhaite étudier l'effet du KO de H2A.Z au cours du développement ou l'effet du KO de H2A.Z à l'âge adulte mais également si l'on souhaite observer l'effet du KO sur un court ou long terme. Les résultats obtenus permettent d'apprécier le rôle de H2A.Z dans le développement de la peau ainsi que le rôle de H2A.Z dans la régulation de l'homéostasie de la peau adulte.

### <u>Chapitre V.2</u> Suivant le stade de développement de la souris auquel est réalisée l'invalidation de H2A.Z, le phénotype développé au niveau de la peau est soit « localisé » soit « ubiquitaire »

Les gènes H2afz et H2afv sont transcrits en ARNm qui seront traduits en histones variantes H2A.Z-1 et H2A.Z-2 dans le cytoplasme. Ces protéines entrent dans le noyau et sont incorporées dans les particules de cœurs, autour desquelles s'enroule l'ADN pour former les nucléosomes. Contrairement aux histones canoniques, l'histone variante H2A.Z est synthétisée et déposée sur la chromatine péricentromérique tout au long du cycle cellulaire (Boyarchuk et al., 2014). Lors de la division cellulaire, l'ADN de la cellule mère est réparti équitablement entre les deux cellules filles et donc la quantité de H2A.Z déposée dans la chromatine sera deux fois moins élevée. De nouvelles protéines H2A.Z seront transcrites et traduites afin d'être déposées dans la nouvelle molécule d'ADN qui aura été synthétisée après la phase S.

La particularité des cellules souches (SCs) est qu'elles sont quiescentes, ce qui veut dire que leur cycle cellulaire est au repos. Pendant ce repos, les cellules ne se divisent pas et donc la quantité de protéine H2A.Z présente dans le noyau ne diminue pas au cours des divisions. Donc, même si les cellules souches ne possèdent plus les gènes codant pour H2A.Z, il reste une certaine quantité de protéine H2A.Z dans leur noyau. Par contre, si les gènes H2afz et H2afv sont invalidés par un knock-out dans les cellules prolifératives, celles-ci ne pourront pas synthétiser à nouveau de protéine H2A.Z. Ainsi, la quantité totale de H2A.Z présente dans ces cellules va diminuer au cours de divisions cellulaires, jusqu'à son épuisement total. Le knock-out de H2A.Z, lorsqu'il est réalisé chez l'embryon ou chez l'adulte, ne provoque pas l'apparition du même phénotype. Cette différence est due au fait que dans chacun des cas des populations de cellules différentes sont impliquées.

Chez la souris adulte, les cellules capables de proliférer sont les cellules TA, localisées au niveau de la couche basale de l'épiderme ainsi qu'au niveau du bulbe du follicule pileux et de l'ORS. La comparaison de l'expression de H2A.Z entre l'épiderme de souris adulte témoin et l'épiderme de souris adulte KO, âgées de 6 à 8 mois, montre une perte quasi-totale de l'expression de H2A.Z au niveau des follicules pileux, ainsi qu'une perte d'expression de H2A.Z dans des cellules regroupées dans des « niches » au niveau de l'épiderme interfolliculaire.

Au cours du développement embryonnaire, toutes les cellules de l'épiderme ont la capacité de proliférer et donc la quantité de H2A.Z diminue rapidement. Chez l'embryon à E17.5 la perte

d'expression de H2A.Z est pratiquement totale dans l'épiderme, ainsi que dans les bourgeons pileux. Le même résultat est observé chez le souriceau 7 jours après la naissance.

#### V.2.1 Caractéristiques du phénotype macroscopique « localisé » développé suite au KO de H2A.Z chez l'adulte

Les souris adultes, âgées de 6 à 8 mois, développent un phénotype localisé sur la peau thoracique ventrale, le museau et les pattes avant, 19 à 21 jours après la première injection de tamoxifène. Ce phénotype se caractérise par l'apparition de zones de rougeurs, où la peau devient extrêmement sèche et desquamante, l'apparition de plaies ainsi qu'une alopécie localisée principalement dans la peau ventrale. Quelles peuvent être la (les) raison(s) de ce phénotype localisé ?

La croissance du follicule pileux suit un cycle folliculaire composé d'une phase de croissance (anagène), d'une phase de régression (catagène) ainsi que d'une phase de repos (télogène). Chez la souris les cycles se synchronisent et se déroulent par vagues, définies comme une progression ordonnée dans le temps et l'espace des follicules pileux entrant dans la phase anagène. Le profil de ces vagues peut varier en fonction de la lignée de la souris, du genre de la souris ainsi que des hormones et stimuli environnementaux (Chase and Eaton, 1959). À partir de J12 postnatal les follicules de la région dorsale entrent graduellement en phase télogène puis aux alentours de J25 postnatal débute la vraie première phase anagène postnatale (anagène I) qui se terminera environ à J40 (Paus, 1998; Ma et al., 2003). Chez la souris mature et avec l'âge la complexité des vagues des follicules pileux s'accentue.

Au cours de notre expérience, une alopécie localisée est présente au niveau ventral. Nous suggérons que les follicules pileux de la peau ventrale des souris expérimentées, âgées de 6 à 8 mois, se trouvaient en cours de vague anagène. Cette phase correspond à la phase de multiplication cellulaire et de croissance du poil, au cours de laquelle les cellules TA matricielles s'engagent dans une prolifération massive. La perte de la protéine H2A.Z pourrait être totale dans les follicules pileux qui se divisent activement en phase anagène et chez lesquels l'émergence du poil serait donc arrêtée. Afin de tester cette hypothèse, une prochaine expérience devrait consister à injecter le tamoxifène sur des souris adultes, quelques mois plus jeunes ou plus vieilles que 6-8 mois, afin de voir si la région affectée par l'alopécie change en fonction de la progression de la vague anagène.

### V.2.2 Caractéristiques du phénotype macroscopique « ubiquitaire » chez l'embryon, développé suite au KO de H2A.Z au cours de la formation embryonnaire de la peau

Chez l'embryon, l'invalidation génétique de H2afz et H2afv a été réalisée en premier par l'induction du transgène K14CreER<sup>T2</sup> au cours de la gestation par l'injection de la souris gravide pendant 5 jours (entre E 8.5 à E.12.5). La peau des embryons KO pour H2A.Z à E15.5 et à E17.5 ne montre aucune différence significative par rapport à celle des embryons témoins.

Lors de l'utilisation du transgène K5Cre, 5 jours après la naissance des souriceaux KO pour H2A.Z, apparaît un phénotype macroscopique « ubiquitaire ». Il se caractérise par le développement d'une peau très rouge, extrêmement sèche et desquamante. Avant l'émergence du poil, la peau des souriceaux KO pour H2A.Z apparaît très épaisse et ridée. Nous avons également constaté un retard de croissance des souriceaux KO pour H2A.Z par rapport aux témoins, ainsi qu'un retard de l'émergence du poil.

### <u>Chapitre V.3</u> L'absence de H2A.Z induit une hyperplasie chez l'adulte et une hypercornification chez l'embryon

### V.3.1 Chez l'adulte, l'hyperplasie est la conséquence d'une hyperprolifération due au stress causé par le KO de H2A.Z

L'épiderme des souris adultes témoins est extrêmement fin. On peut distinguer les couches basales et suprabasales de cellules vivantes et la couche morte de cellules anucléées de la couche cornée. La première différence marquante entre l'épiderme thoracique ventral des souris témoins et des souris KO pour H2A.Z est l'hyperplasie de l'épiderme KO pour H2A.Z. Alors que l'épiaisseur totale des cellules vivantes de l'épiderme témoin ne comporte en moyenne que 1 à 2 cellules, celle de la souris KO pour H2A.Z en comporte en moyenne 4 à 5. La couche cornée de l'épiderme est également beaucoup plus épaisse après induction du KO de H2A.Z.

Malgré une forte alopécie ventrale, les follicules pileux sont présents en profondeur dans le derme, avec un diamètre épais. L'épaississement de l'épiderme ainsi que celle du follicule pileux pourraient contrecarrer l'émergence du poil à la surface de la peau. L'arrêt de la croissance de la tige pilaire est probablement plutôt dû à l'épuisement de la protéine H2A.Z dans les follicules pileux.

En parallèle à cette hyperplasie et à l'épaississement de la couche cornée, on constate une augmentation de la taille des granules de kératohyaline atteignant environ 2,5  $\mu$ m pour les souris KO pour H2A.Z au lieu de 1 à 1,5  $\mu$ m pour les souris témoins. Le rôle de ces granules est de déshydrater la cellule et de « *cross-linker* » ses fibres de kératines au cours de la cornification. Plus il y a de kératohyaline entourant les cellules mortes et plus la barrière formée par l'imbrication des cellules mortes est épaisse, solide et imperméable. L'augmentation de la taille de ces granules dans le cas des souris KO pour H2A.Z engendrerait donc une couche cornée extrêmement compacte.

Quelle est la cause de cette hyperprolifération de l'épiderme ?

Alors que les cellules de la couche basale de l'épiderme des souris témoins sont globalement orientées parallèlement à la membrane basale, chez les souris KO pour H2A.Z on note une orientation perpendiculaire à la membrane basale. Cette orientation perpendiculaire concerne certains kératinocytes qui se trouvent regroupés dans des « niches ». Le changement de polarité des cellules, ainsi que l'orientation du fuseau mitotique, peuvent jouer sur le type de division cellulaire, et donc avoir des conséquences sur la prolifération et la différenciation. Le changement de polarité cellulaire pourrait être dû à une perturbation de l'adhérence des kératinocytes basaux à la jonction dermo-épidermique (JDE) et donc à une diminution du nombre d'hémidesmosomes. Cependant, il n'en est rien. Chez les souris sauvages, la division des kératinocytes perpendiculaire à la lame basale est observée lorsque le besoin de stratification se fait ressentir : à E12.5, lors de la formation de la couche basale, 92% des divisions sont parallèles à la membrane basale (Lechler and Fuchs, 2005), l'épiderme a alors besoin de gagner en surface proportionnellement à la croissance des autres organes de l'embryon. À partir de E15.5, et jusqu'au développement postnatal, a lieu la stratification de l'épiderme et plus de 70% des fuseaux mitotiques sont orientés perpendiculairement à la membrane basale (Lechler and Fuchs, 2005). Chez l'adulte, la division cellulaire est parallèle à la lame basale, la cellule souche donne deux cellules filles, qui restent transitoirement dans la couche basale (TA). Une des deux TA est maintenue dans le réservoir de cellules souches, alors que l'autre se détache de la lame basale et initie son programme de différenciation terminale (Lechler and Fuchs, 2005). Le phénotype développé lors du KO de H2A.Z ressemble à celui de l'épiderme embryonnaire en phase de stratification, ainsi qu'à celui du tissu psorasique résultant d'un déséquilibre entre les divisions asymétriques parallèles et perpendiculaires à la membrane basale. Dans le psoriasis l'hyperprolifération de l'épiderme provoque un déséquilibre dans la balance entre la prolifération et la différenciation cellulaire (Jia et al., 2016).

Nous avons observé par microscopie électronique et par immunofluorescence, la présence de deux types de niches dans l'épiderme de la souris KO. Premièrement, les cellules de l'IFE,

dont la quantité de protéine H2A.Z a été perdue, sont localisées dans des niches. On peut avancer que ces cellules ne peuvent plus proliférer et vont se différencier. Deuxièmement, certaines cellules de l'IFE ont une orientation perpendiculaire à la membrane basale et sont regroupées également dans des niches. Ces cellules doivent être prolifératives, donc il doit s'agir de deux types de niches différentes. Afin de valider cette hypothèse, il faut montrer que les cellules de la première niche, qui n'ont plus de protéine H2A.Z, ne se divisent pas. Inversement il faut montrer que les cellules de la deuxième niche ont toujours la protéine H2A.Z dans leur noyau et sont hautement prolifératives. La microscopie électro-immunologique à transmission pourrait nous permettre de vérifier nos hypothèses. On utiliserait pour cela des anticorps secondaires couplés à des billes d'or nous permettant de reconnaître l'anticorps primaire dirigé contre H2A.Z ou contre un marqueur de prolifération (de type ki67, PCNA, ou H3Ser10P).

L'expression du facteur de transcription p63 permet d'analyser la capacité des kératinocytes à proliférer, à maintenir le réservoir de cellules souches et à s'engager dans la différenciation terminale. P63 marque la capacité hautement proliférative des kératinocytes basaux (Pellegrini et al., 2001). Chez les souris témoins, le marqueur p63 est exprimé par 1 voir 2 cellules en épaisseur, alors que chez la souris KO les kératinocytes de la couche basale expriment le marqueur p63 sur épaisseur de 3 à 4 cellules. De même, la kératinocytes basaux augmente lorsque l'homéostasie de la peau est perturbée ainsi que dans des conditions d'hyperprolifération (Navarro et al., 1995; Leigh et al., 1995). Une augmentation significative de l'expression de K6 par les kératinocytes épidermiques KO pour H2A.Z, va de pair avec l'augmentation du nombre de cellules ainsi que l'hyperplasie de l'épiderme. L'absence d'H2A.Z sur les kératinocytes basaux a perturbé l'homéostasie de l'épiderme, provoquant un déséquilibre entre la prolifération et la différenciation des cellules épidermiques et induisant une hyperplasie de l'épiderme.

## V.3.2 L'invalidation de H2A.Z chez l'embryon n'induit pas une hyperprolifération

Chez l'embryon à E17.5 l'épaisseur de la couche basale, marquée par la kératine 14, est identique entre les embryons témoins et les embryons KO pour H2A.Z. De plus, l'expression de p63 à E17.5 montre que le KO de H2A.Z n'affecte ni la prolifération des kératinocytes basaux, ni la mise en place progressive des différentes couches suprabasales différenciées de l'épiderme.

L'épaisseur postnatale à J7 de l'épiderme des souriceaux témoins et des souriceaux KO pour H2A.Z, révèle dans les deux cas un épiderme plus épais que chez l'adulte. Il faut rappeler

que lors du développement normal de la peau de la souris, il y a un changement physiologique postnatal concernant l'épaisseur de l'épiderme, passant d'un épiderme épais à la naissance (3-4 cellules en épaisseur) à un épiderme adulte fin composé de 1 à 2 cellules en épaisseur (Sundberg et al., 2012). Contrairement au phénotype hyperplasique développé chez l'adulte et malgré le développement d'un phénotype macroscopique postnatal chez le souriceau à J7, il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne l'épaisseur de la couche vivante de l'épiderme des souris témoins et de l'épiderme des souris KO pour H2A.Z. L'épaisseur de la couche basale chez les souriceaux à J7, analysée grâce au marquage K14, ne montre pas non plus de différence avec l'épaisseur des couches basales des souriceaux témoins. Les souriceaux témoins et les souriceaux KO pour H2A.Z présentent un nombre équivalent de cellules exprimant le facteur de transcription p63, avec une épaisseur de 3 à 4 cellules au niveau de la couche basale.

L'ensemble de ces résultats montrent que la perte d'expression de H2A.Z au cours du développement embryonnaire de la peau n'a pas empêché la mise en place des différentes couches, basale et suprabasales. Cependant, les souriceaux chez lesquels les gènes H2afz et H2afv ont été invalidés meurent tous au bout de quelques jours. Que se passe-t-il donc ?

### <u>Chapitre V.4</u> L'invalidation des gènes H2afz et H2Afv n'impacte pas la différenciation des kératinocytes

L'analyse de l'expression des marqueurs protéiques de différenciation permet d'évaluer l'impact de la perte d'expression de l'histone variante H2A.Z sur la différenciation cellulaire et le renouvellement des couches suprabasales de l'épiderme.

### V.4.1 Chez les souris adultes, les nombre de cellules différenciées augmente en conséquence de l'hyperprolifération cellulaire engendrée par la perte d'expression de H2A.Z

L'expression de la kératine 10 est spécifique des couches suprabasales et débute par la couche épineuse. Ainsi, les noyaux localisés en dessous de ce marquage correspondent aux noyaux des kératinocytes basaux. Chez les souris adultes, l'épaisseur de la couche basale, qui n'exprime pas la K10, comporte 1 à 2 cellules pour les souris témoins et 2 à 3 cellules pour les souris KO pour H2A.Z. C'est le cas également pour la couche épineuse où on observe une épaisseur de 1 à 2 cellules pour les souris témoins et 2 à 3 cellules pour les souris KO pour H2A.Z. La loricrine est un marqueur protéique spécifique des kératinocytes de la couche

granuleuse et des cornéocytes, nous permettant ainsi d'évaluer le nombre de cellules qui les composent. La couche granuleuse passe de 1-2 cellules, chez les souris témoins, à 2-3 cellules d'épaisseur chez les souris KO pour H2A.Z. Chez les souris KO, puisque les cellules TA de la couche basale pour H2A.Z se sont différenciées en cellules TA des couches suprabasales nous pouvons conclure que H2A.Z n'est pas impliquée dans la différenciation des kératinocytes épidermiques à l'âge adulte.

### V.4.2 L'invalidation des gènes H2afz et H2afv, induite entre E8.5-E12.5, provoque une accumulation des cellules différenciées dans la couche cornée à 7 jours postnatal

Nous n'avons pas observé de différence significative entre les souriceaux témoin et les souriceaux KO, en ce qui concerne l'épaisseur de la couche basale visualisée grâce à l'expression de la kératine K14 par les kératinocytes basaux. De la même façon, l'expression de la kératine 10 par les kératinocytes de la couche épineuse, est identique entre la peau ventrale des souriceaux témoins et des souriceaux KO pour H2A.Z. Ainsi, l'absence de H2A.Z ne perturbe pas la mise en place de la couche basale ni la différenciation des kératinocytes basaux en kératinocytes des couches suprabasales.

Cependant, la couche granuleuse et la couche cornée, visualisées grâce à l'expression de la loricrine par les kératinocytes respectifs, sont environ 2,5 fois plus épaisses chez les souriceaux KO pour H2A.Z que chez les souriceaux témoins. La couche basale de l'épiderme embryonnaire se divisant normalement très rapidement, la quantité de H2A.Z présente dans les noyaux diminue donc également très rapidement. Les kératinocytes perdent la possibilité de se diviser, s'engagent dans le processus de différenciation et s'accumulent dans la couche cornée.

Ainsi, l'absence de H2A.Z ne perturbe pas la différenciation cellulaire et donc H2A.Z ne semble pas avoir un rôle dans la différenciation des kératinocytes épidermiques chez le souriceau.

### <u>Chapitre V.5</u> L'invalidation de H2afz et H2afv, chez l'adulte ou au cours de l'embryogénèse, provoque le blocage de la mitose

Le marquage de l'histone H3Ser10P permet l'identification des cellules en cours de division. La phosphorylation de H3 débute en fin de phase G2 du cycle cellulaire. Le taux de

phosphorylation est le plus élevé en métaphase puis diminue très rapidement en fin de cycle de division (Prigent and Dimitrov, 2003).

Chez les souris adultes témoins, l'histone H3 phosphorylé sur la serine 10 est exprimée par les kératinocytes de l'épiderme interfolliculaire ainsi qu'au niveau du bulbe et de l'ORS, ces cellules sont donc en cours de mitose. Chez les souris adultes KO pour H2A.Z, on note premièrement une perte significative du marquage au niveau folliculaire. Rappelons que nous pensons que chez l'adulte le KO de H2A.Z a eu lieu au moment de la phase anagène des follicules pileux du thorax ventral. La perte d'expression de H2A.Z au niveau des follicules provoquerait un blocage de la mitose en phase G2/M et engendrerait leur engagement dans la différenciation terminale. La mitose étant bloquée en G2/M, ces cellules H3Ser10P+ ne se diviseraient plus et seraient incapables d'assurer l'émergence de la tige pilaire. On note également, une diminution du nombre de cellules en division dans la couche basale de l'IFE au dépend d'un très fort marquage pour H3Ser10P au niveau des couches suprabasales de l'épiderme. Les kératinocytes ne se divisant plus s'engagent dans la différenciation terminale et s'accumulent dans la couche cornée. Le renouvèlement de l'IFE ne pouvant plus être assuré par les kératinocytes basaux, quelques HFSCs du bulge sortiraient du réservoir quiescent, activeraient leur cycle cellulaire et migreraient dans l'IFE pour hyperproliférer. Ces cellules migreraient dans les « niches » de l'IFE où nous avons identifié les cellules se divisant perpendiculairement à la membrane basale. Au fur et à mesure que ces cellules prolifèrent, la quantité de protéine H2A.Z diminue puis une fois la quantité de H2A.Z insuffisante à la division, elles se bloquent à leur tour en phase G2/M. Cette boucle migration, prolifération, blocage en mitose provoquerait sur le long terme l'épuisement du réservoir de cellules souches.

Sachant que la phosphorylation de l'histone H3 sur la serine 10 est une modification posttraductionnelle spécifique des cellules mitotiques, comment se fait-il que ce marquage soit retrouvé au niveau des couches suprabasales post-mitotiques ? Pendant plusieurs années, la communauté scientifique pensait que la différenciation des kératinocytes était concomitante avec un arrêt de la croissance et un blocage du cycle cellulaire en phase G0. Cependant, il a été démontré que l'initiation de la différenciation terminale des kératinocytes basaux est associée avec un blocage de la mitose en phase G2/M du cycle cellulaire (Zanet et al., 2010). En effet, l'utilisation d'agents bloquant la mitose sur des kératinocytes en culture, tels que la Nocodazole ou le Paclitaxel, a montré que le blocage de la mitose s'accompagne de la différenciation terminale des kératinocytes mais que ces cellules subissent également une endo-réplication (Gandarillas et al., 2000). L'endo-réplication est une variante de la mitose où l'ADN est répliqué mais n'est pas réparti en deux cellules filles mais reste dans la même cellule et explique pourquoi les kératinocytes différenciés peuvent être plus gros que les kératinocytes basaux. Dans le cas de notre étude, nous constatons une diminution du nombre de kératinocytes mitotiques (H3Ser10P+) démontrant un blocage de la mitose en G2/M, au niveau de la couche basale de l'épiderme ainsi que du bulbe et de l'ORS lorsque les gènes H2afz et H2afv sont invalidés. L'accumulation de kératinocytes suprabasaux exprimant le marqueur mitotique H3Ser10P pourrait s'expliquer par l'endo-réplication.

Chez les souriceaux témoins à J7 postnatal, le marquage H3Ser10P est localisée au niveau du follicule pileux, principalement au niveau du bulbe et au niveau de l'ORS. Cette localisation coïncide avec la localisation des cellules TA, capables de proliférer et permettant la croissance et le renouvellement du poil. En revanche, très peu de kératinocytes basaux prolifèrent au niveau de l'IFE. Ceci est normal car la plus forte prolifération a eu lieu au cours de la formation de la peau embryonnaire. Par contre, chez les souriceaux KO pour H2A.Z, on note l'apparition de cellules H3Ser10P+ au niveau de l'assise basale de l'IFE. Les kératinocytes basaux n'expriment plus H2A.Z, ils ne peuvent donc plus proliférer et sont donc H3Ser10P-. L'apparition de kératinocytes basaux H3Ser10+ chez le souriceau KO à J7 témoignerait de la migration des cellules depuis le réservoir de cellules souches du follicule pileux jusque dans l'assise basale de l'IFE.

### <u>Chapitre V.6</u> L'invalidation des gènes H2afz et H2afv impacte la maintenance du réservoir de cellules souches

Chez l'adulte, le renouvellement de l'épiderme interfolliculaire (IFE) a lieu grâce à la prolifération des SCs localisées dans l'assise basale de l'épiderme qui donneront des cellules TA (Potten, 1974; Plikus et al., 2012). Une autre population de cellules souches (HFSCs) est localisée dans le bulge du follicule pileux. Sur une peau saine, la prolifération des SCs ne requiert pas l'apport additionnel de cellules provenant du follicule pileux (Nowak et al., 2008; Plikus et al., 2012).

Au cours de l'embryogénèse, à E12, toutes les cellules de l'assise basale ont la capacité de se diviser. Ce sont toutes des cellules prolifératives. Lors de la formation des placodes, les cellules gardant le potentiel prolifératif vont donner les cellules souches dites « adultes », elles ségrégent dans les placodes et seront localisées dans le bulge du follicule pileux (HFSCs) à l'âge adulte. Nous avons identifié chez l'adulte ainsi que chez l'embryon la population de HFSCs, grâce aux marquages pour Sox9+, CD34+ et K15+, ainsi que la population de SCs de l'IFE, grâce au marquage pour K15+ et comparé leur devenir après le KO de H2A.Z. Chez la souris, il existe

d'autres marqueurs permettant d'identifier les cellules souches interfolliculaires (SCs) tels que Lgr6 (Füllgrabe et al., 2015).

### V.6.1 L'absence de H2A.Z chez l'adulte provoquerait l'épuisement des HFSCs

Chez les souris adultes témoins et KO pour H2A.Z, nous avons vérifié que Sox9 s'exprime spécifiquement dans le follicule pileux. Rappelons que ce facteur de transcription est impliqué dans la ségrégation des cellules à potentiel prolifératif en HFSCs afin de développer le follicule pileux. L'expression de Sox9 par les HFSCs apparait identique entre les souris adultes témoins et les souris adultes KO pour H2A.Z donc ces cellules souches vont pouvoir participer à la formation d'un follicule pileux. Par contre une fois la quantité totale de H2A.Z épuisée, il n'y aura plus de cellules souches et le renouvellement du poil ne pourra avoir lieu.

Chez les souris adultes témoins, CD34 est exprimé par les HFSCs au niveau du bulge, alors que K15 est exprimé par les SCs de l'IFE ainsi que les HFSCs du bulge. Le KO de H2A.Z induit au niveau des HFSCS une perte totale de l'expression de CD34. De plus, on note la perte totale de l'expression de la K15 au niveau de l'IFE. On retrouve cette perte d'expression de la kératine 15 au niveau de l'IFE dans des conditions de dérégulation de l'homéostasie de l'épiderme telles que la tumorigénèse ou le psoriasis (Troy et al., 2011; Jia et al., 2016). Dans le cas du psoriasis, l'activation aberrante des SCs de l'IFE provoque une expansion excessive des couches suprabasales (cellules TA différenciées). Ce phénomène d'expansion des TA dans les couches suprabasales provoque l'épuisement du réservoir de SCs (Jia et al., 2016).

Dans notre modèle KO pour H2A.Z, nous pensons que les cellules TA ayant perdu l'expression de H2A.Z ne peuvent plus se diviser et que ce manque de prolifération perturbe l'homéostasie de la peau. Afin d'y palier, en premier lieu, les SCs interfolliculaires sortent de leur état de quiescence et vont apporter des cellules TA interfolliculaires afin de pouvoir renouveler l'IFE. Ceci se traduit par la disparition du marquage de la kératine 15 au niveau de l'IFE. Nous pensons qu'une fois le réservoir de SCs épidermique épuisé, un grand nombre de HFSCs sortent du réservoir au niveau du bulge, perdent l'expression des marqueurs caractérisant les cellules souches CD34 et K15, et donnent à leur tour des cellules TA qui vont débuter le processus d'hyperprolifération. Cette hyperprolifération permet de renouveler les niches de l'IFE au niveau desquelles les cellules n'exprimant plus la protéine H2A.Z sont incapables de se diviser.

La quantité de protéine H2A.Z présente dans les HFSCs quiescentes semble être suffisante pour que la cellule puisse se diviser et donner des cellules TA épidermiques et matricielles permettant, pendant un certain temps, la croissance du poil. Notre hypothèse est que l'activation des HFSCs provoque leur sortie du bulge. Les HFSCs deviennent des cellules TA prolifératives qui restent dans le follicule au niveau de la matrice ou qui migrent dans l'IFE. Leur division est possible tant que l'histone variante H2A.Z est présente. Sa quantité diminue ensuite très rapidement au fur et à mesure des divisions cellulaires. Une fois le niveau de H2A.Z trop faible, les cellules ne peuvent plus se diviser, faisant appel de nouveau aux HFSCs menant, à long terme, à l'épuisement total du réservoir de cellules souches.

#### V.6.2 L'absence de H2A.Z au cours de l'embryogénèse provoquerait l'épuisement des SCs épidermiques

Alors que les cellules épidermiques embryonnaires sont hautement prolifératives, les HFSCs adultes expriment Sox9 et sont quiescentes (Yi, 2017). Ainsi au cours du développement depuis le stade embryonnaire jusqu'à l'âge adulte les cellules passent d'une capacité de prolifération très élevée à une phase de quiescence. L'invalidation génétique de H2afz et H2afv a été réalisée au cours de l'embryogénèse donc sur les cellules épidermiques, toutes capables proliférer. Ceci a été effectué avant leur ségrégation en HFSCs dans les bourgeons pileux, à l'origine des follicules pileux. Ainsi, les HFSCs expriment encore la protéine H2A.Z dans leur noyau, même si sa quantité est réduite, et cette quantité reste inchangée tant que leur cycle cellulaire n'est pas activé.

Chez le souriceau KO pour H2A.Z, le développement des follicules pileux se déroule même si les cellules sont invalidées pour les gènes H2Afz et H2afv car une petite quantité de H2A.Z est encore présente. Chez les souriceaux témoins et chez les souriceaux KO pour H2A.Z, les cellules souches exprimant Sox9 sont localisées au niveau du bulge du follicule pileux. On note que chez le souriceau KO pour H2A.Z le nombre de HFSCs Sox9+ apparait légèrement plus faible ce qui traduirait un épuisement progressif des HFSCs.

Une absence de H2A.Z dans les cellules TA de l'IFE entraine leur incapacité à proliférer et d'où un appel des cellules souches folliculaires. Les HFSCs vont alors sortir de leur état de quiescence et donnent des cellules TA prolifératives qui migrent depuis le bulge jusqu'à l'assise basale de l'IFE. La quantité d'histone variante H2A.Z exprimée par ces cellules diminuera au cours des divisions successives. Cependant, tant qu'il reste un peu de H2A.Z, les cellules peuvent se diviser. La perte d'expression de H2A.Z n'affecte pas le déroulement du premier cycle de croissance du poil de la souris débutant à E12. Cependant, chez les souriceaux KO pour H2A.Z l'émergence du poil est retardée de quelques jours par rapport à celle des souriceaux témoins qui émerge normalement aux alentours du 5<sup>ème</sup> jour après la naissance.

L'épuisement progressif des HFSCs du bulge se produit si le besoin de re-épithéalisation de l'IFE s'avère être long (Plikus et al., 2012). Alors que chez les souriceaux témoins toutes les cellules de l'IFE expriment la K15, démontrant la présence de SCs sur l'IFE, cette expression disparait complètement chez les souriceaux KO pour H2A.Z, démontrant la perte de SCs quiescentes (K15+) sur l'IFE. Toutes les SCs épidermiques sont sorties de leur état de quiescence, devenant K15-, et ont donné des cellules TA (K15-) afin qu'elles puissent alimenter l'assise basale et renouveler l'épiderme. Ces dernières proviennent directement des HFSCs et peuvent donc se diviser, sur un court terme, car elles expriment encore un peu de H2A.Z. Chez les souriceaux témoins à J7, les HFSCs dans le bulge expriment également la K15. Cette expression est maintenue dans le bulge des follicules pileux des souriceaux KO pour H2A.Z, ce qui montre qu'à J7 postnatal le réservoir de HFSCs quiescentes est encore présent. Nous supposons que le réservoir de HFSCs finira par s'épuiser. L'épiderme devient cornifié sur toute son épaisseur et les souriceaux KO pour H2AZ ne survivent pas au-delà de 13 jours. Leur taille réduite pourrait résulter du fait qu'il sont enfermés dans un épiderme entièrement corfinifié n'excluant pas le fait que le KO de H2A.Z ait pu affecter d'autres organes expriment la K5 tels que la langue et les bronches pulmonaires.

Afin de valider l'hypothèse de la sortie et de l'épuisement des cellules souches (SCs et HFSCs) au niveau de leur réservoir il serait intéressant de suivre le devenir d'une injection de BrdU. Ce dernier s'incorpore dans l'ADN au cours de la phase S. Les HFSCs ont un cycle de division très lent donc le BrdU reste incorporé dans l'ADN pendant très longtemps et c'est pour cette raison qu'on appelle ces cellules *Long-term Retaining Cells*. Lorsque les HFSCs s'activent pour donner des cellules TA puis prolifèrent, l'ADN sera divisé et la quantité de BrdU présente dans les cellules filles sera diluée. Une diminution du marquage BrdU dans le bulge des follicules pileux témoignerait de la division et migration des HFSCs.

Une méthode *in-vitro* permettant d'étudier la clonogénicité des cellules souches consiste en un tri les HFSCs par cytométrie en flux (FACs), grâce à l'utilisation d'anticorps de surface spécifiques des cellules souches comme les intégrines ou les marqueurs de surface tels que CD34. Une fois les HFSCs mises en culture, on pourra invalider les gènes H2afz et H2afv par l'addition de hydroxytamoxifène (4-OHT) dans le milieu de culture des HFSCs. Enfin, des essais clonogéniques permettront de constater l'impact de la perte de H2A.Z sur la capacité des cellules souches à proliférer.

#### <u>Chapitre V.7</u> Conclusion générale et perspectives

Dans la littérature, l'histone variante H2A.Z a été montrée comme étant impliquée dans de nombreux processus cellulaires. La localisation très particulière des nucléosomes contenant H2A.Z lui accorde un rôle central dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation de la transcription avec un rôle activateur ou répresseur de la transcription. L'histone variante H2A.Z a également été démontrée comme étant essentielle au développement du bouton embryonnaire du blastocyste (Faast et al., 2001). Cependant, le développement du blastocyste implique à la fois des étapes de différenciation et de prolifération cellulaire et le rôle spécifique de H2A.Z dans chacune d'entre elle n'a pas été démontré. Les études permettant de mettre en évidence les rôles de H2A.Z ont pour la plupart été réalisées *in-vitro* et le processus de la transcription n'a jamais été étudié de façon individuelle en le séparant du processus de division cellulaire.

Pour la première fois dans l'histoire de la recherche sur l'histone variante H2A.Z, nous avons étudié le rôle de H2A.Z *in*-vivo grâce à un organe très spécial qu'est la peau et plus particulièrement l'épiderme, nous permettant de séparer les fonctions prolifératives et les fonctions transcriptionnelles de H2A.Z. En effet, le tissu épidermique permet d'étudier à la fois un tissu mitotique, la couche basale, et un tissu post-mitotique, les couches suprabasales. Nous avons alors pu ainsi étudier l'effet de l'invalidation des gènes H2afz et H2Afv sur la prolifération et sur la différenciation des kératinocytes épidermiques.

Nos résultats confirment que l'histone variante H2A.Z, histone variante de la famille H2A, joue un rôle essentiel au maintien de la mitose et donc au développement embryonnaire et postnatal de l'épiderme, ainsi qu'au maintien de l'homéostasie de l'épiderme chez l'adulte. Nous avons montré qu'après la perte totale de l'expression de H2A.Z, les cellules basales restent bloquées en mitose. Le manque de cellules capables de proliférer dans l'épiderme interfolliculaire (IFE) perturbe l'homéostasie de la peau. Pour pallier à ce défaut, les cellules souches folliculaires (HFSCs), qui expriment encore H2A.Z, sortent de leur quiescence, s'activent et prolifèrent afin de générer des cellules TA. Ces dernières migrent à leur tour dans l'IFE et vont pouvoir se diviser jusqu'à l'épuisement total de la quantité de H2A.Z, leur mitose est bloquée et elles sont à leur tour éliminées au cours de la différenciation. L'approvisionnement de l'assise basale interfolliculaire, en cellules TA capables de proliférer, à partir du réservoir de HFSCs n'est pas illimité. L'épuisement total de la réserve de cellules souches folliculaires serait

responsable, quelques jours après la naissance, du décès du souriceau dans le cas de l'invalidation des deux gènes H2afz et H2afv chez l'embryon au moment de la formation de l'épiderme. Ainsi, nous pouvons conclure sur le fait que l'histone variante H2A.Z joue un rôle crucial dans la progression de la mitose et donc sur la prolifération cellulaire.

Nous avons également démontré que l'absence de H2A.Z ne perturbe pas la différenciation des kératinocytes de la couche basale en kératinocytes des couches suprabasales. En effet, l'invalidation de H2A.Z et la perte totale de H2A.Z dans les kératinocytes basaux ne perturbe pas l'expression de marqueurs spécifiques des kératinocytes des couches suprabasales tels que la kératine 10 et la loricrine. Nous pouvons alors avancer que l'histone variante H2A.Z n'est pas impliquée dans le processus de transcription dans les tissus post-mitotiques.

La régulation de l'homéostasie de l'épithélium intestinal et celle de l'épithélium épidermique peuvent être mises en parallèle. L'épithélium intestinal est un épithélium unistratifié où les cellules souches intestinales sont localisées au-dessus de la base des cryptes et donnent lieu à des cellules TA qui vont proliférer activement et migrer vers l'apex des villosités en se différenciant en différentes lignées intestinales telles que les entérocytes, les cellules calciformes, les cellules entéro-endocrines et les cellules de Paneth. Ce processus est contrôlé, entre autres, par le facteur de transcription CDX2, spécifiquement exprimé dans l'épithélium intestinal et crucial pour le développement et la différenciation de cet épithélium. Récemment, des études ont montré que l'histone variante H2A.Z joue un rôle important dans la voie de signalisation Wnt et permet ainsi de contrôler l'homéostasie des cellules épithéliales intestinales (Rispal et al., 2019). Ces auteurs ont démontré un lien entre CDX2, p400, H2A.Z et la modulation de la voie de signalisation Wnt. L'utilisation d'ARN interférents (small interfering RNA ou siRNA) afin d'inhiber l'expression de H2A.Z provoque l'arrêt de la prolifération des cellules TA intestinales. Au cours de mon projet de thèse, j'ai créé un modèle unique permettant l'étude du rôle de H2A.Z *in-vivo* et en même temps dans un tissu, mitotique et post-mitotique, l'épiderme et son annexe, le follicule pileux. En 2004, le docteur Tremethick et ses collègues ont montré, in-vitro et pour la première fois, l'importance de l'histone variante H2A.Z dans la ségrégation des chromosomes mitotiques (Rangasamy et al., 2004). Ces auteurs ont montré, en utilisant des ARN interférents dirigés contre l'ARNm de H2A.Z, une instabilité génétique provoquée par de sévères défauts mitotiques, tels qu'un mauvais alignement des chromosomes en métaphase (lagging chromosomes) ainsi que des ponts chromosomiques (chromosome bridges) en anaphase. Nos résultats confirment que la division cellulaire ne peut se faire sans la présence de l'histone variante H2A.Z dans les cellules.
Dans le futur, les objectifs seront d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents mis en jeu par l'histone variante H2A.Z lors de la mitose. Une étude RNAseq permettrait d'avoir une idée de l'état transcriptionnel des cellules KO pour H2A.Z comparé aux cellules sauvages. Il serait en effet intéressant de pouvoir déterminer quels gènes verraient leur expression affectée suite à l'invalidation génique de H2afz et H2afv. Pour cela, j'ai déjà collecté des biopsies de peau de souriceaux témoins et de souriceaux KO, et séparé le derme et l'épiderme. Les données de l'étude protéomique, par spectrométrie de masse, permettront de faire un inventaire de toutes les protéines qui pourraient potentiellement être impliquées dans la cascade d'évènements responsables de la poursuite du cycle mitotique. L'idée de pouvoir extraire les HFSCs à partir de souriceaux témoins et KO pour H2A.Z afin de procéder à des essais clonogéniques pourrait également être intéressante afin confirmer de manière *in-vitro* la perte progressive de la capacité de prolifération des cellules KO pour H2A.Z mais également de pouvoir détecter par microscopie les cellules mitotiques présentant d'éventuels défauts mitotiques.

## VI.Figures supplémentaires



Souriceau KO H2afz -/- H2afv -/- K5Cre tg/+ mTmG -/+

Figure S. 1- Spécificité de l'activité du transgène K5Cre au niveau des kératinocytes basaux épidermiques ainsi que des kératinocytes folliculaires chez le souriceau à J12 postnatal.

Peau thoracique ventrale et de la queue d'un souriceau âgé de 12 jours. Microscopie à épifluorescence, Cre active (GFP), Cre inactive (Tomato), ADN (Hoechst, bleu).



Figure S. 2 - Comparaison de l'histologie des glandes salivaires des souris témoins et des souris KO pour H2A.Z, 21 jours après la première injection de tamoxifène.

Glandes salivaires de souris adultes âgées de 6-8 mois. Coloration trichromatique HES (hématoxyline, éosine et safran). Conduit salivaire (SD).



Figure S. 3 - L'invalidation des gènes H2afz et H2afv ne perturbe pas le développement de la peau au cours de l'embryogénèse.

Comparaison de la peau ventrale d'un embryon témoin et d'un embryon KO pour H2A.Z à 15.5 jours de gestation embryonnaire. Cinq injections de tamoxifène ont été réalisées chez la mère gestante entre E8.5 et E12.5. Les embryons ont été prélevés à E15.5. Coloration trichromatique HES (hématoxyline, éosine, safran).



Figure S. 4- La mise en place de la couche basale de l'épiderme au cours du développement de la peau embryonnaire n'est pas affecté par l'invalidation génique de H2afz et H2afv.

Au cours du développement embryonnaire le KO de H2A.Z n'affecte pas l'épaisseur de la couche basale, composée de 1 cellule en épaisseur chez l'embryon témoin ainsi que chez l'embryon KO. Peau ventrale d'embryon à 17.5 jours de gestation. Microscopie à épifluorescence : K14 (anticorps anti-K14, rouge), ADN (Hoechst, bleu).



Figure S. 5– L'invalidation génique de H2afz et H2afv au cours du développement de la peau embryonnaire n'affecte pas la mise en place de la couche basale de l'épiderme chez l'embryon à 17.5 jours de gestation.

Le de transcription p63 est marqueur de prolifération et un facteur essentiel à la stratification de l'épiderme. Il est exprimé par les cellules de la couche basale de l'épiderme. Cette expression est équivalente entre l'embryon témoin et l'embryon KO (E17.5). Ainsi, le KO de H2A.Z n'affecte ni la prolifération des kératinocytes basaux ni la mise en place progressive des strates de l'épiderme. Peau ventrale d'embryons à 17.5 jours de gestation. Microscopie à épifluorescence : p63 (anticorps anti-p63, rouge), ADN (Hoechst, bleu).



Figure S. 6 – L'invalidation génique de H2afz et H2afv au cours du développement de la peau embryonnaire n'affecte pas la mise en place de la couche basale de l'épiderme chez le souriceau à J8 postnatal.

L'absence de H2A.Z n'affecte pas l'épaisseur de la couche basale, composée de 1 à 2 cellules en épaisseur chez les souriceaux témoins ainsi que chez les souriceaux KO pour H2A.Z. Peau de la queue de souriceau âgé de 8 jours. Microscopie à épifluorescence : K14 (anticorps anti-K14, rouge), ADN (Hoechst, bleu). L'activité de la Recombinase-Cre est suivie par l'expression de la GFP en vert.





p63 est un marqueur de prolifération et un inducteur de la stratification épidermique. Le nombre de cellules exprimant p63 est identique entre le souriceau témoin et le souriceau KO pour H2A.Z. Peau dorsale d'un souriceau âgé de 8 jours. Microscopie à épifluorescence : p63 (anticorps anti-p63, rouge), ADN (Hoechst, bleu).

## VII.Bibliographie

12 things you don't know about Cre-lox [WWW Document], n.d. . The Jackson Laboratory. URL https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2013/september/a-dozen-facts-you-didnt-know-about-cre-lox (accessed 6.26.19).

Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., Gaudreau, L., 2001. H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. Mol. Cell. Biol. 21, 6270–6279.

Ajiro, K., Yasuda, H., Tsuji, H., 1996a. Vanadate triggers the transition from chromosome condensation to decondensation in a mitotic mutant (tsTM13) inactivation of p34cdc2/H1 kinase and dephosphorylation of mitosis-specific histone H3. Eur. J. Biochem. 241, 923–930.

Ajiro, K., Yoda, K., Utsumi, K., Nishikawa, Y., 1996b. Alteration of cell cycle-dependent histone phosphorylations by okadaic acid. Induction of mitosis-specific H3 phosphorylation and chromatin condensation in mammalian interphase cells. J. Biol. Chem. 271, 13197–13201. https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.13197

Alla, V., Engelmann, D., Niemetz, A., Pahnke, J., Schmidt, A., Kunz, M., Emmrich, S., Steder, M., Koczan, D., Pützer, B.M., 2010. E2F1 in melanoma progression and metastasis. J. Natl. Cancer Inst. 102, 127–133. https://doi.org/10.1093/jnci/djp458

Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C., Aviles, F.X., 1980. The structure of histone H1 and its location in chromatin. Nature 288, 675–679.

Allen, T.D., Potten, C.S., 1974. Fine-structural identification and organization of the epidermal proliferative unit. J. Cell. Sci. 15, 291–319.

Allis, C.D., Glover, C.V., Bowen, J.K., Gorovsky, M.A., 1980. Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, Tetrahymena thermophila. Cell 20, 609–617.

Amato, A., Schillaci, T., Lentini, L., Di Leonardo, A., 2009. CENPA overexpression promotes genome instability in pRb-depleted human cells. Mol. Cancer 8, 119. https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-119

Andrews, A.J., Chen, X., Zevin, A., Stargell, L.A., Luger, K., 2010. The histone chaperone Nap1 promotes nucleosome assembly by eliminating nonnucleosomal histone DNA interactions. Mol. Cell 37, 834–842. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.037

Andrews, A.J., Luger, K., 2011. Nucleosome structure(s) and stability: variations on a theme. Annu Rev Biophys 40, 99–117. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155329

Andrews, P.D., Knatko, E., Moore, W.J., Swedlow, J.R., 2003. Mitotic mechanics: the auroras come into view. Curr. Opin. Cell Biol. 15, 672–683.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., Moudrianakis, E.N., 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 10148–10152.

Arents, G., Moudrianakis, E.N., 1995. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 11170–11174.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K., 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell 129, 823–837. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009

Bednar, J., Garcia-Saez, I., Boopathi, R., Cutter, A.R., Papai, G., Reymer, A., Syed, S.H., Lone, I.N., Tonchev, O., Crucifix, C., Menoni, H., Papin, C., Skoufias, D.A., Kurumizaka, H., Lavery, R., Hamiche, A., Hayes, J.J., Schultz, P., Angelov, D., Petosa, C., Dimitrov, S., 2017.

Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. Mol. Cell 66, 384-397.e8. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.012

Bednar, J., Horowitz, R.A., Dubochet, J., Woodcock, C.L., 1995. Chromatin conformation and salt-induced compaction: three-dimensional structural information from cryoelectron microscopy. The Journal of Cell Biology 131, 1365–1376. https://doi.org/10.1083/jcb.131.6.1365

Beh, T.T., MacKinnon, R.N., Kalitsis, P., 2016. Active centromere and chromosome identification in fixed cell lines. Molecular Cytogenetics 9. https://doi.org/10.1186/s13039-016-0236-x

Berdasco, M., Esteller, M., 2011. DNA methylation in stem cell renewal and multipotency. Stem Cell Res Ther 2, 42. https://doi.org/10.1186/scrt83

Bergmann, J.H., Rodríguez, M.G., Martins, N.M.C., Kimura, H., Kelly, D.A., Masumoto, H., Larionov, V., Jansen, L.E.T., Earnshaw, W.C., 2011. Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. EMBO J. 30, 328–340. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.329

Biermann, K., Heukamp, L.C., Steger, K., Zhou, H., Franke, F.E., Guetgemann, I., Sonnack, V., Brehm, R., Berg, J., Bastian, P.J., Müller, S.C., Wang-Eckert, L., Schorle, H., Büttner, R., 2007. Gene expression profiling identifies new biological markers of neoplastic germ cells. Anticancer Res. 27, 3091–3100.

Black, B.E., Foltz, D.R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V.L., Cleveland, D.W., 2004. Structural determinants for generating centromeric chromatin. Nature 430, 578–582. https://doi.org/10.1038/nature02766

Black, B.E., Jansen, L.E.T., Maddox, P.S., Foltz, D.R., Desai, A.B., Shah, J.V., Cleveland, D.W., 2007. Centromere Identity Maintained by Nucleosomes Assembled with Histone H3 Containing the CENP-A Targeting Domain. Molecular Cell 25, 309–322. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.018

Blanpain, C., Fuchs, E., 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10, 207–217. https://doi.org/10.1038/nrm2636

Blanpain, C., Fuchs, E., 2007. p63: revving up epithelial stem-cell potential. Nature Cell Biology 9, 731–733. https://doi.org/10.1038/ncb0707-731

Bodor, D.L., Mata, J.F., Sergeev, M., David, A.F., Salimian, K.J., Panchenko, T., Cleveland, D.W., Black, B.E., Shah, J.V., Jansen, L.E., 2014. The quantitative architecture of centromeric chromatin. Elife 3, e02137. https://doi.org/10.7554/eLife.02137

Bönisch, C., Hake, S.B., 2012. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? Nucleic Acids Res. 40, 10719–10741. https://doi.org/10.1093/nar/gks865

Bose, A., Teh, M.-T., Mackenzie, I., Waseem, A., 2013. Keratin K15 as a Biomarker of Epidermal Stem Cells. International Journal of Molecular Sciences 14, 19385–19398. https://doi.org/10.3390/ijms141019385

Boyarchuk, E., Filipescu, D., Vassias, I., Cantaloube, S., Almouzni, G., 2014. The histone variant composition of centromeres is controlled by the pericentric heterochromatin state during the cell cycle. J Cell Sci 127, 3347–3359. https://doi.org/10.1242/jcs.148189

Brocard, J., Warot, X., Wendling, O., Messaddeq, N., Vonesch, J.L., Chambon, P., Metzger, D., 1997. Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 14559–14563. https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14559

Burgess, R.J., Zhang, Z., 2013. Histone chaperones in nucleosome assembly and human

disease. Nat. Struct. Mol. Biol. 20, 14-22. https://doi.org/10.1038/nsmb.2461

Byrne, C., Tainsky, M., Fuchs, E., 1994. Programming gene expression in developing epidermis. Development 120, 2369–2383.

Carr, A.M., Dorrington, S.M., Hindley, J., Phear, G.A., Aves, S.J., Nurse, P., 1994. Analysis of a histone H2A variant from fission yeast: evidence for a role in chromosome stability. Mol. Gen. Genet. 245, 628–635.

Carruthers, L.M., Bednar, J., Woodcock, C.L., Hansen, J.C., 1998. Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. Biochemistry 37, 14776–14787. https://doi.org/10.1021/bi981684e

Cerutti, H., Casas-Mollano, J.A., 2009. Histone H3 phosphorylation: universal code or lineage specific dialects? Epigenetics 4, 71–75. https://doi.org/10.4161/epi.4.2.7781

Chase, H.B., Eaton, G.J., 1959. The growth of hair follicles in waves. Ann. N. Y. Acad. Sci. 83, 365–368. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb40912.x

Chen, P., Zhao, J., Li, G., 2013. Histone variants in development and diseases. J Genet Genomics 40, 355–365. https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.05.001

Clarkson, M.J., Wells, J.R., Gibson, F., Saint, R., Tremethick, D.J., 1999. Regions of variant histone His2AvD required for Drosophila development. Nature 399, 694–697. https://doi.org/10.1038/21436

Commo, S., Gaillard, O., Bernard, B.A., 2000. The human hair follicle contains two distinct K19 positive compartments in the outer root sheath: a unifying hypothesis for stem cell reservoir? Differentiation 66, 157–164. https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2000.660401.x

Cotsarelis, G., Sun, T.T., Lavker, R.M., 1990. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. Cell 61, 1329–1337.

Coulombe, P.A., Kopan, R., Fuchs, E., 1989. Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. J. Cell Biol. 109, 2295–2312.

Cremer, T., Cremer, C., 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. Nat. Rev. Genet. 2, 292–301. https://doi.org/10.1038/35066075

Cremer, T., Cremer, M., 2010. Chromosome territories. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a003889. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889

D'Arcy, S., Martin, K.W., Panchenko, T., Chen, X., Bergeron, S., Stargell, L.A., Black, B.E., Luger, K., 2013. Chaperone Nap1 shields histone surfaces used in a nucleosome and can put H2A-H2B in an unconventional tetrameric form. Mol. Cell 51, 662–677. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.015

Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., Gygi, S.P., 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 10762–10767. https://doi.org/10.1073/pnas.0805139105

Dhouailly, D., Oftedal, O.T., 2016. Integument and Associated Integumentary Appendages, in: Kaufman's Atlas of Mouse Development Supplement. Elsevier, pp. 147–164. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800043-4.00012-9

Dronamraju, R., Ramachandran, S., Jha, D.K., Adams, A.T., DiFiore, J.V., Parra, M.A., Dokholyan, N.V., Strahl, B.D., 2017. Redundant Functions for Nap1 and Chz1 in H2A.Z Deposition. Sci Rep 7, 10791. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11003-8

Dryhurst, D., Ishibashi, T., Rose, K.L., Eirín-López, J.M., McDonald, D., Silva-Moreno, B., Veldhoen, N., Helbing, C.C., Hendzel, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Ausió, J., 2009. Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates. BMC Biol 7, 86. https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-86

Eirín-López, J.M., González-Romero, R., Dryhurst, D., Ishibashi, T., Ausió, J., 2009. The evolutionary differentiation of two histone H2A.Z variants in chordates (H2A.Z-1 and H2A.Z-2) is mediated by a stepwise mutation process that affects three amino acid residues. BMC Evolutionary Biology 9, 31. https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-31

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

Fan, J.Y., Rangasamy, D., Luger, K., Tremethick, D.J., 2004. H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1alpha-mediated chromatin fiber folding. Mol. Cell 16, 655–661. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.023

Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., Chambon, P., 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. Biochem. Biophys. Res. Commun. 237, 752–757. https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7124

Felsenfeld, G., Groudine, M., 2003. Controlling the double helix. Nature 421, 448–453. https://doi.org/10.1038/nature01411

Festa, E., Fretz, J., Berry, R., Schmidt, B., Rodeheffer, M., Horowitz, M., Horsley, V., 2011. Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. Cell 146, 761–771. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.019

Flanagan, T.W., Brown, D.T., 2016. Molecular dynamics of histone H1. Biochim. Biophys. Acta 1859, 468–475. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.10.005

Foltz, D.R., Jansen, L.E.T., Bailey, A.O., Yates, J.R., Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E., Cleveland, D.W., 2009. Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. Cell 137, 472–484. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.039

Fuchs, E., 2016. Epithelial Skin Biology, in: Current Topics in Developmental Biology. Elsevier, pp. 357–374. https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.033

Fuchs, E., 2008a. Skin stem cells: rising to the surface. J. Cell Biol. 180, 273–284. https://doi.org/10.1083/jcb.200708185

Fuchs, E., 2008b. Skin stem cells: rising to the surface. J. Cell Biol. 180, 273–284. https://doi.org/10.1083/jcb.200708185

Fuchs, E., Green, H., 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell 19, 1033–1042.

Fuchs, E., Weber, K., 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. Annu. Rev. Biochem. 63, 345–382. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.002021

Füllgrabe, A., Joost, S., Are, A., Jacob, T., Sivan, U., Haegebarth, A., Linnarsson, S., Simons, B.D., Clevers, H., Toftgård, R., Kasper, M., 2015. Dynamics of Lgr6+ Progenitor Cells in the Hair Follicle, Sebaceous Gland, and Interfollicular Epidermis. Stem Cell Reports 5, 843–855. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.09.013

Gandarillas, A., Davies, D., Blanchard, J.M., 2000. Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. Oncogene 19, 3278–3289. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203630

Garcia-Saez, I., Menoni, H., Boopathi, R., Shukla, M.S., Soueidan, L., Noirclerc-Savoye, M., Le Roy, A., Skoufias, D.A., Bednar, J., Hamiche, A., Angelov, D., Petosa, C., Dimitrov, S., 2018. Structure of an H1-Bound 6-Nucleosome Array Reveals an Untwisted Two-Start Chromatin Fiber Conformation. Molecular Cell. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.027

Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.-M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., Wen, D., Chapgier, A., DeKelver, R.C., Miller, J.C., Lee, Y.-L., Boydston, E.A., Holmes, M.C., Gregory, P.D., Greally, J.M., Rafii, S., Yang, C., Scambler, P.J., Garrick, D., Gibbons, R.J., Higgs, D.R., Cristea, I.M., Urnov, F.D., Zheng, D., Allis, C.D., 2010. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. Cell 140, 678–691. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003

Goutte-Gattat, D., Shuaib, M., Ouararhni, K., Gautier, T., Skoufias, D.A., Hamiche, A., Dimitrov, S., 2013. Phosphorylation of the CENP-A amino-terminus in mitotic centromeric chromatin is required for kinetochore function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110, 8579–8584. https://doi.org/10.1073/pnas.1302955110

Greaves, I.K., Rangasamy, D., Ridgway, P., Tremethick, D.J., 2007. H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. PNAS 104, 525–530. https://doi.org/10.1073/pnas.0607870104

Grewal, S.I.S., Elgin, S.C.R., 2007. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. Nature 447, 399–406. https://doi.org/10.1038/nature05914

Guillemette, B., Bataille, A.R., Gévry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F., Gaudreau, L., 2005. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. PLoS Biol. 3, e384. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030384

Guo, C., Yang, W., Lobe, C.G., 2002. A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action. Genesis 32, 8–18.

Gurard-Levin, Z.A., Quivy, J.-P., Almouzni, G., 2014. Histone chaperones: assisting histone traffic and nucleosome dynamics. Annu. Rev. Biochem. 83, 487–517. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035536

Heffner, C.S., Herbert Pratt, C., Babiuk, R.P., Sharma, Y., Rockwood, S.F., Donahue, L.R., Eppig, J.T., Murray, S.A., 2012. Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. Nature Communications 3, 1218. https://doi.org/10.1038/ncomms2186

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

Hesse, M., Zimek, A., Weber, K., Magin, T.M., 2004. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. Eur. J. Cell Biol. 83, 19–26. https://doi.org/10.1078/0171-9335-00354

Horikoshi, N., Sato, K., Shimada, K., Arimura, Y., Osakabe, A., Tachiwana, H., Hayashi-Takanaka, Y., Iwasaki, W., Kagawa, W., Harata, M., Kimura, H., Kurumizaka, H., 2013. Structural polymorphism in the L1 loop regions of human H2A.Z.1 and H2A.Z.2. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 69, 2431–2439. https://doi.org/10.1107/S090744491302252X

Houben, E., De Paepe, K., Rogiers, V., 2007. A keratinocyte's course of life. Skin Pharmacol Physiol 20, 122–132. https://doi.org/10.1159/000098163

Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P., Choo, K.H., 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 1148–1153.

Hu, G., Cui, K., Northrup, D., Liu, C., Wang, C., Tang, Q., Ge, K., Levens, D., Crane-Robinson, C., Zhao, K., 2013. H2A.Z facilitates access of active and repressive complexes to chromatin in embryonic stem cell self-renewal and differentiation. Cell Stem Cell 12, 180–192. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.003

Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., Lako, M., 2005. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. Stem Cells 23, 1035–1043. https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0080

Indra, A.K., Li, M., Brocard, J., Warot, X., Bornert, J.M., Gérard, C., Messaddeq, N., Chambon, P., Metzger, D., 2000. Targeted somatic mutagenesis in mouse epidermis. Horm. Res. 54, 296–300. https://doi.org/10.1159/000053275

Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.M., Xiao, J.H., Chambon, P., Metzger, D., 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. Nucleic Acids Res. 27, 4324–4327. https://doi.org/10.1093/nar/27.22.4324

Iouzalen, N., Moreau, J., Méchali, M., 1996. H2A.ZI, a new variant histone expressed during Xenopus early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. Nucleic Acids Res. 24, 3947–3952.

Jackson, J.D., Gorovsky, M.A., 2000. Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. Nucleic Acids Research 28, 3811.

Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J.H., Snippert, H.J., Clevers, H., Toftgård, R., 2008. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. Nat. Genet. 40, 1291–1299. https://doi.org/10.1038/ng.239

Jensen, K.B., Driskell, R.R., Watt, F.M., 2010. Assaying proliferation and differentiation capacity of stem cells using disaggregated adult mouse epidermis. Nature Protocols 5, 898–911. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.39

Jetten, A.M., Harvat, B.L., 1997. Epidermal differentiation and squamous metaplasia: from stem cell to cell death. J. Dermatol. 24, 711–725.

Jia, H.-Y., Shi, Y., Luo, L.-F., Jiang, G., Zhou, Q., Xu, S.-Z., Lei, T.-C., 2016. Asymmetric stem-cell division ensures sustained keratinocyte hyperproliferation in psoriatic skin lesions. Int. J. Mol. Med. 37, 359–368. https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2445

Jin, J., Cai, Y., Li, B., Conaway, R.C., Workman, J.L., Conaway, J.W., Kusch, T., 2005. In and out: histone variant exchange in chromatin. Trends Biochem. Sci. 30, 680–687. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.10.003

Jokelainen, P.T., 1967. The ultrastructure and spatial organization of the metaphase kinetochore in mitotic rat cells. J. Ultrastruct. Res. 19, 19–44.

Kalashnikova, A.A., Porter-Goff, M.E., Muthurajan, U.M., Luger, K., Hansen, J.C., 2013. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. Journal of the Royal Society Interface 10. https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1022

Kapoor, A., Goldberg, M.S., Cumberland, L.K., Ratnakumar, K., Segura, M.F., Emanuel, P.O., Menendez, S., Vardabasso, C., Leroy, G., Vidal, C.I., Polsky, D., Osman, I., Garcia, B.A., Hernando, E., Bernstein, E., 2010. The histone variant macroH2A suppresses melanoma

progression through regulation of CDK8. Nature 468, 1105–1109. https://doi.org/10.1038/nature09590

Knöbel, M., O'Toole, E.A., Smith, F.J.D., 2015. Keratins and skin disease. Cell Tissue Res. 360, 583–589. https://doi.org/10.1007/s00441-014-2105-4

Kornberg, R.D., 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science 184, 868–871.

Koster, M.I., Roop, D.R., 2004. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis. J. Dermatol. Sci. 34, 3–9.

Labbé, J.-P., 2005. [Centromere elasticity]. Med Sci (Paris) 21, 261–266. https://doi.org/10.1051/medsci/2005213261

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T., 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. Nature 410, 116–120. https://doi.org/10.1038/35065132

Lagana, A., Dorn, J.F., De Rop, V., Ladouceur, A.-M., Maddox, A.S., Maddox, P.S., 2010. A small GTPase molecular switch regulates epigenetic centromere maintenance by stabilizing newly incorporated CENP-A. Nat. Cell Biol. 12, 1186–1193. https://doi.org/10.1038/ncb2129

Latrick, C.M., Marek, M., Ouararhni, K., Papin, C., Stoll, I., Ignatyeva, M., Obri, A., Ennifar, E., Dimitrov, S., Romier, C., Hamiche, A., 2016. Molecular basis and specificity of H2A.Z-H2B recognition and deposition by the histone chaperone YL1. Nat. Struct. Mol. Biol. 23, 309–316. https://doi.org/10.1038/nsmb.3189

Lechler, T., Fuchs, E., 2005. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. Nature 437, 275–280. https://doi.org/10.1038/nature03922

Lee, J., Kang, S., Lilja, K.C., Colletier, K.J., Scheitz, C.J.F., Zhang, Y.V., Tumbar, T., 2016. Signalling couples hair follicle stem cell quiescence with reduced histone H3 K4/K9/K27me3 for proper tissue homeostasis. Nature Communications 7. https://doi.org/10.1038/ncomms11278

Leigh, I.M., Navsaria, H., Purkis, P.E., McKay, I.A., Bowden, P.E., Riddle, P.N., 1995. Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. Br. J. Dermatol. 133, 501–511.

Li, G., Reinberg, D., 2011. Chromatin higher-order structures and gene regulation. Curr. Opin. Genet. Dev. 21, 175–186. https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.01.022

Li, Y., Choi, P.S., Casey, S.C., Felsher, D.W., 2014. Activation of Cre Recombinase Alone Can Induce Complete Tumor Regression. PLoS One 9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107589

Li, Z., Gadue, P., Chen, K., Jiao, Y., Tuteja, G., Schug, J., Li, W., Kaestner, K.H., 2012. Foxa2 and H2A.Z Mediate Nucleosome Depletion during Embryonic Stem Cell Differentiation. Cell 151, 1608–1616. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.018

Liu, S., Zhang, H., Duan, E., 2013. Epidermal Development in Mammals: Key Regulators, Signals from Beneath, and Stem Cells. International Journal of Molecular Sciences 14, 10869–10895. https://doi.org/10.3390/ijms140610869

Lohe, A.R., Hilliker, A.J., Roberts, P.A., 1993. Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of Drosophila melanogaster. Genetics 134, 1149–1174.

Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurençon, A., Karr, T.L., Couble, P., 2005. The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. Nature 437, 1386–1390. https://doi.org/10.1038/nature04059

Lu, C., Fuchs, E., 2014. Sweat gland progenitors in development, homeostasis, and wound repair. Cold Spring Harb Perspect Med 4. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015222

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature 389, 251–260. https://doi.org/10.1038/38444

Luger, K., Richmond, T.J., 1998. DNA binding within the nucleosome core. Curr. Opin. Struct. Biol. 8, 33–40.

Ma, L., Liu, J., Wu, T., Plikus, M., Jiang, T.-X., Bi, Q., Liu, Y.-H., Müller-Röver, S., Peters, H., Sundberg, J.P., Maxson, R., Maas, R.L., Chuong, C.-M., 2003. "Cyclic alopecia" in Msx2 mutants: defects in hair cycling and hair shaft differentiation. Development 130, 379–389. https://doi.org/10.1242/dev.00201

Madison, K.C., Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W., Downing, D.T., 1987. Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum. J. Invest. Dermatol. 88, 714–718.

Marshall, O.J., Marshall, A.T., Choo, K.H.A., 2008. Three-dimensional localization of CENP-A suggests a complex higher order structure of centromeric chromatin. J Cell Biol 183, 1193–1202. https://doi.org/10.1083/jcb.200804078

Marzluff, W.F., Gongidi, P., Woods, K.R., Jin, J., Maltais, L.J., 2002. The human and mouse replication-dependent histone genes. Genomics 80, 487–498.

Mascré, G., Dekoninck, S., Drogat, B., Youssef, K.K., Broheé, S., Sotiropoulou, P.A., Simons, B.D., Blanpain, C., 2012. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. Nature 489, 257–262. https://doi.org/10.1038/nature11393

Matoltsy, A.G., 1975. Desmosomes, filaments, and keratohyaline granules: their role in the stabilization and keratinization of the epidermis. J. Invest. Dermatol. 65, 127–142.

Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, I.P., Li, X., Venters, B.J., Zanton, S.J., Tomsho, L.P., Qi, J., Glaser, R.L., Schuster, S.C., Gilmour, D.S., Albert, I., Pugh, B.F., 2008. Nucleosome organization in the Drosophila genome. Nature 453, 358–362. https://doi.org/10.1038/nature06929

Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A.A., Allis, C.D., 2014. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. Nat. Rev. Genet. 15, 259–271. https://doi.org/10.1038/nrg3673

McBryant, S.J., Park, Y.-J., Abernathy, S.M., Laybourn, P.J., Nyborg, J.K., Luger, K., 2003. Preferential binding of the histone (H3-H4)2 tetramer by NAP1 is mediated by the amino-terminal histone tails. J. Biol. Chem. 278, 44574–44583. https://doi.org/10.1074/jbc.M305636200

Meneghini, M.D., Wu, M., Madhani, H.D., 2003. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. Cell 112, 725–736.

Metzger, D., Chambon, P., 2011. Generation of Spatio-Temporally Controlled Targeted Somatic Mutations in the Mouse. Curr Protoc Mouse Biol 1, 55–70. https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo100128

Moll, R., Divo, M., Langbein, L., 2008. The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol 129, 705–733. https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6

Moore, K.A., Lemischka, I.R., 2006. Stem cells and their niches. Science 311, 1880–1885. https://doi.org/10.1126/science.1110542

Morris, R.J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J.S., Sawicki, J.A.,

Cotsarelis, G., 2004. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. Nat. Biotechnol. 22, 411–417. https://doi.org/10.1038/nbt950

Moudrianakis, E.N., Arents, G., 1993. Structure of the histone octamer core of the nucleosome and its potential interactions with DNA. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 58, 273–279.

Müller-Röver, S., Foitzik, K., Paus, R., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmüller, S., McKay, I.A., Stenn, K.S., 2001. A Comprehensive Guide for the Accurate Classification of Murine Hair Follicles in Distinct Hair Cycle Stages. Journal of Investigative Dermatology 117, 3–15. https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01377.x

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., Luo, L., 2007. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. genesis 45, 593–605. https://doi.org/10.1002/dvg.20335

Nagpal, H., Fukagawa, T., 2016. Kinetochore assembly and function through the cell cycle. Chromosoma 125, 645–659. https://doi.org/10.1007/s00412-016-0608-3

Nasmyth, K., Haering, C.H., 2009. Cohesin: its roles and mechanisms. Annu. Rev. Genet. 43, 525–558. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134233

Navarro, J.M., Casatorres, J., Jorcano, J.L., 1995. Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation-associated keratin K6. J. Biol. Chem. 270, 21362–21367. https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21362

Nowak, J.A., Polak, L., Pasolli, H.A., Fuchs, E., 2008. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. Cell Stem Cell 3, 33–43. https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.05.009

Obri, A., Ouararhni, K., Papin, C., Diebold, M.-L., Padmanabhan, K., Marek, M., Stoll, I., Roy, L., Reilly, P.T., Mak, T.W., Dimitrov, S., Romier, C., Hamiche, A., 2014. ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. Nature 505, 648–653. https://doi.org/10.1038/nature12922

Olins, A.L., Olins, D.E., 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). Science 183, 330-332.

Olins, D.E., Olins, A.L., 2003. Chromatin history: our view from the bridge. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4, 809–814. https://doi.org/10.1038/nrm1225

Oudet, P., Gross-Bellard, M., Chambon, P., 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. Cell 4, 281–300.

Palmer, D.K., O'Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S., Margolis, R.L., 1987. A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. J. Cell Biol. 104, 805–815.

Panchenko, T., Sorensen, T.C., Woodcock, C.L., Kan, Z., Wood, S., Resch, M.G., Luger, K., Englander, S.W., Hansen, J.C., Black, B.E., 2011. Replacement of histone H3 with CENP-A directs global nucleosome array condensation and loosening of nucleosome superhelical termini. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 16588–16593. https://doi.org/10.1073/pnas.1113621108

Pandey, N.B., Marzluff, W.F., 1987. The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability. Mol. Cell. Biol. 7, 4557–4559.

Paus, R., 1998. Principles of hair cycle control. J. Dermatol. 25, 793-802.

Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., De Luca, M., 2001. p63 identifies keratinocyte stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 3156–3161. https://doi.org/10.1073/pnas.061032098

Perpelescu, M., Nozaki, N., Obuse, C., Yang, H., Yoda, K., 2009. Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex. J. Cell Biol. 185, 397–407. https://doi.org/10.1083/jcb.200903088

Plikus, M.V., Chuong, C.-M., 2008. Complex hair cycle domain patterns and regenerative hair waves in living rodents. J Invest Dermatol 128, 1071–1080. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701180

Plikus, M.V., Gay, D.L., Treffeisen, E., Wang, A., Supapannachart, R.J., Cotsarelis, G., 2012. Epithelial stem cells and implications for wound repair. Semin. Cell Dev. Biol. 23, 946–953. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.10.001

Potten, C.S., 1974. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. Cell Tissue Kinet 7, 77–88.

Potten, C.S., Kovacs, L., Hamilton, E., 1974. Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. Cell Tissue Kinet 7, 271–283.

Prigent, C., Dimitrov, S., 2003. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? Journal of Cell Science 116, 3677–3685. https://doi.org/10.1242/jcs.00735

Purba, T.S., Haslam, I.S., Poblet, E., Jiménez, F., Gandarillas, A., Izeta, A., Paus, R., 2014. Human epithelial hair follicle stem cells and their progeny: current state of knowledge, the widening gap in translational research and future challenges. Bioessays 36, 513–525. https://doi.org/10.1002/bies.201300166

Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., Madhani, H.D., 2005. Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. Cell 123, 233–248. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.002

Ramirez, A., Page, A., Gandarillas, A., Zanet, J., Pibre, S., Vidal, M., Tusell, L., Genesca, A., Whitaker, D.A., Melton, D.W., Jorcano, J.L., 2004. A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. Genesis 39, 52–57. https://doi.org/10.1002/gene.20025

Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P., Tremethick, D.J., 2003. Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. EMBO J. 22, 1599–1607. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg160

Rangasamy, D., Greaves, I., Tremethick, D.J., 2004. RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. Nature Structural & Molecular Biology 11, 650–655. https://doi.org/10.1038/nsmb786

Ray-Gallet, D., Almouzni, G., 2010. Nucleosome dynamics and histone variants. Essays Biochem. 48, 75–87. https://doi.org/10.1042/bse0480075

Ribeiro, S.A., Gatlin, J.C., Dong, Y., Joglekar, A., Cameron, L., Hudson, D.F., Farr, C.J., McEwen, B.F., Salmon, E.D., Earnshaw, W.C., Vagnarelli, P., 2009. Condensin regulates the stiffness of vertebrate centromeres. Mol. Biol. Cell 20, 2371–2380. https://doi.org/10.1091/mbc.e08-11-1127

Rispal, J., Baron, L., Beaulieu, J.-F., Chevillard-Briet, M., Trouche, D., Escaffit, F., 2019. The H2A.Z histone variant integrates Wnt signaling in intestinal epithelial homeostasis. Nat Commun 10. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09899-z

Robinson, P.J.J., Fairall, L., Huynh, V.A.T., Rhodes, D., 2006. EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 6506–6511. https://doi.org/10.1073/pnas.0601212103

Rosenfeld, J.A., Wang, Z., Schones, D.E., Zhao, K., DeSalle, R., Zhang, M.Q., 2009.

Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. BMC Genomics 10, 143. https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-143

Roulland, Y., Ouararhni, K., Naidenov, M., Ramos, L., Shuaib, M., Syed, S.H., Lone, I.N., Boopathi, R., Fontaine, E., Papai, G., Tachiwana, H., Gautier, T., Skoufias, D., Padmanabhan, K., Bednar, J., Kurumizaka, H., Schultz, P., Angelov, D., Hamiche, A., Dimitrov, S., 2016. The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity. Mol. Cell 63, 674–685. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.023

Saffery, R., Sumer, H., Hassan, S., Wong, L.H., Craig, J.M., Todokoro, K., Anderson, M., Stafford, A., Choo, K.H.A., 2003. Transcription within a functional human centromere. Mol. Cell 12, 509–516.

Santamaria, A., Wang, B., Elowe, S., Malik, R., Zhang, F., Bauer, M., Schmidt, A., Silljé, H.H.W., Körner, R., Nigg, E.A., 2011. The Plk1-dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle. Mol. Cell Proteomics 10, M110.004457. https://doi.org/10.1074/mcp.M110.004457

Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., Smith, M.M., 2000. Histone H2A.Z regulats transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. Cell 103, 411–422.

Schepeler, T., Page, M.E., Jensen, K.B., 2014. Heterogeneity and plasticity of epidermal stem cells. Development 141, 2559–2567. https://doi.org/10.1242/dev.104588

Schweizer, J., Bowden, P.E., Coulombe, P.A., Langbein, L., Lane, E.B., Magin, T.M., Maltais, L., Omary, M.B., Parry, D.A.D., Rogers, M.A., Wright, M.W., 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. J. Cell Biol. 174, 169–174. https://doi.org/10.1083/jcb.200603161

Sims, R.J., Nishioka, K., Reinberg, D., 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. Trends Genet. 19, 629–639. https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.09.007

Song, F., Chen, P., Sun, D., Wang, M., Dong, L., Liang, D., Xu, R.-M., Zhu, P., Li, G., 2014. Cryo-EM Study of the Chromatin Fiber Reveals a Double Helix Twisted by Tetranucleosomal Units. Science 344, 376–380. https://doi.org/10.1126/science.1251413

Steven, A.C., Bisher, M.E., Roop, D.R., Steinert, P.M., 1990. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. J. Struct. Biol. 104, 150–162.

Sullivan, B.A., Karpen, G.H., 2004. Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. Nat. Struct. Mol. Biol. 11, 1076–1083. https://doi.org/10.1038/nsmb845

Sullivan, K.F., Hechenberger, M., Masri, K., 1994. Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. J. Cell Biol. 127, 581–592.

Sundberg, J.P., 2004. CHAPTER 12 - Skin and Adnexa of the Laboratory Mouse, in: Hedrich, H.J., Bullock, G. (Eds.), The Laboratory Mouse. Academic Press, London, pp. 195–206. https://doi.org/10.1016/B978-012336425-8/50065-0

Sundberg, J.P., Nanney, L.B., Fleckman, P., King, L.E., 2012. Skin and Adnexa, in: Comparative Anatomy and Histology. Elsevier, pp. 433–455. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00023-8

Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., Luger, K., 2000. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. Nat. Struct. Biol. 7, 1121–1124. https://doi.org/10.1038/81971

Syed, S.H., Goutte-Gattat, D., Becker, N., Meyer, S., Shukla, M.S., Hayes, J.J., Everaers, R., Angelov, D., Bednar, J., Dimitrov, S., 2010. Single-base resolution mapping of H1nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 9620–9625. https://doi.org/10.1073/pnas.1000309107

Szenker, E., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., 2011. The double face of the histone variant H3.3. Cell Res. 21, 421–434. https://doi.org/10.1038/cr.2011.14

Tachiwana, H., Kagawa, W., Shiga, T., Osakabe, A., Miya, Y., Saito, K., Hayashi-Takanaka, Y., Oda, T., Sato, M., Park, S.-Y., Kimura, H., Kurumizaka, H., 2011. Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. Nature 476, 232–235. https://doi.org/10.1038/nature10258

Thakar, A., Gupta, P., Ishibashi, T., Finn, R., Silva-Moreno, B., Uchiyama, S., Fukui, K., Tomschik, M., Ausio, J., Zlatanova, J., 2009. H2A.Z and H3.3 histone variants affect nucleosome structure: biochemical and biophysical studies. Biochemistry 48, 10852–10857. https://doi.org/10.1021/bi901129e

Toivola, D.M., Boor, P., Alam, C., Strnad, P., 2015. Keratins in health and disease. Current Opinion in Cell Biology 32, 73–81. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.008

Tomonaga, T., Matsushita, K., Yamaguchi, S., Oohashi, T., Shimada, H., Ochiai, T., Yoda, K., Nomura, F., 2003. Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. Cancer Res. 63, 3511–3516.

Tremethick, D.J., 2007. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. Cell 128, 651–654. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.008

Trempus, C.S., Morris, R.J., Bortner, C.D., Cotsarelis, G., Faircloth, R.S., Reece, J.M., Tennant, R.W., 2003. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. J. Invest. Dermatol. 120, 501–511. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12088.x

Troy, T.-C., Arabzadeh, A., Turksen, K., 2011. Re-Assessing K15 as an Epidermal Stem Cell Marker. Stem Cell Reviews and Reports 7, 927–934. https://doi.org/10.1007/s12015-011-9243-9

Truong, A.B., Khavari, P.A., 2007. Control of keratinocyte proliferation and differentiation by p63. Cell Cycle 6, 295–299. https://doi.org/10.4161/cc.6.3.3753

Tsukiyama, T., 2002. The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 422–429. https://doi.org/10.1038/nrm828

Tumbar, T., 2004. Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. Science 303, 359–363. https://doi.org/10.1126/science.1092436

van Holde, K., Zlatanova, J., 1999. The nucleosome core particle: does it have structural and physiologic relevance? Bioessays 21, 776–780. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199909)21:9<776::AID-BIES9>3.0.CO;2-Z

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

Vardabasso, C., Gaspar-Maia, A., Hasson, D., Pünzeler, S., Valle-Garcia, D., Straub, T., Keilhauer, E.C., Strub, T., Dong, J., Panda, T., Chung, C.-Y., Yao, J.L., Singh, R., Segura, M.F., Fontanals-Cirera, B., Verma, A., Mann, M., Hernando, E., Hake, S.B., Bernstein, E., 2015. Histone variant H2A.Z.2 mediates proliferation and drug sensitivity of malignant melanoma. Mol Cell 59, 75–88. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.009

Vardabasso, C., Hake, S.B., Bernstein, E., 2016. Histone variant H2A.Z.2: A novel driver of melanoma progression. Mol Cell Oncol 3, e1073417. https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1073417

Vardabasso, C., Hasson, D., Ratnakumar, K., Chung, C.-Y., Duarte, L.F., Bernstein, E., 2014. Histone variants: emerging players in cancer biology. Cell. Mol. Life Sci. 71, 379–404. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1343-z

Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B., Fuchs, E., 1999. The magical touch: Genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 8551–8556.

Wang, B.C., Rose, J., Arents, G., Moudrianakis, E.N., 1994. The octameric histone core of the nucleosome. Structural issues resolved. J. Mol. Biol. 236, 179–188. https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1127

Wang, J., Qiao, M., He, Q., Shi, R., Loh, S.J.H., Stanton, L.W., Wu, M., 2015. Pluripotency Activity of Nanog Requires Biochemical Stabilization by Variant Histone Protein H2A.Z. Stem Cells 33, 2126–2134. https://doi.org/10.1002/stem.2011

Wang, X., Zinkel, S., Polonsky, K., Fuchs, E., 1997. Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 219–226. https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.219

Warburton, P.E., 2004. Chromosomal dynamics of human neocentromere formation. Chromosome Res. 12, 617–626. https://doi.org/10.1023/B:CHRO.0000036585.44138.4b

Winkler, D.D., Luger, K., 2011. The Histone Chaperone FACT: Structural Insights and Mechanisms for Nucleosome Reorganization. The Journal of Biological Chemistry 286, 18369. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.180778

Winkler, D.D., Zhou, H., Dar, M.A., Zhang, Z., Luger, K., 2012. Yeast CAF-1 assembles histone (H3-H4)2 tetramers prior to DNA deposition. Nucleic Acids Res. 40, 10139–10149. https://doi.org/10.1093/nar/gks812

Woodcock, C.L., Dimitrov, S., 2001. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 130–135.

Woodcock, C.L., Skoultchi, A.I., Fan, Y., 2006. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. Chromosome Res. 14, 17–25. https://doi.org/10.1007/s10577-005-1024-3

Workman, J.L., 2006. Nucleosome displacement in transcription. Genes Dev. 20, 2009–2017. https://doi.org/10.1101/gad.1435706

Yan, H., Ito, H., Nobuta, K., Ouyang, S., Jin, W., Tian, S., Lu, C., Venu, R.C., Wang, G.-L., Green, P.J., Wing, R.A., Buell, C.R., Meyers, B.C., Jiang, J., 2006. Genomic and genetic characterization of rice Cen3 reveals extensive transcription and evolutionary implications of a complex centromere. Plant Cell 18, 2123–2133. https://doi.org/10.1105/tpc.106.043794

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D., McKeon, F., 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. Mol. Cell 2, 305–316.

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., McKeon, F., 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature 398, 714–718. https://doi.org/10.1038/19539

Yi, R., 2017. Mechanisms of Quiescent Hair Follicle Stem Cell Regulation. Stem Cells.

https://doi.org/10.1002/stem.2696

Youssef, K.K., Van Keymeulen, A., Lapouge, G., Beck, B., Michaux, C., Achouri, Y., Sotiropoulou, P.A., Blanpain, C., 2010. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. Nature Cell Biology 12, 299–305. https://doi.org/10.1038/ncb2031

Zanet, J., Freije, A., Ruiz, M., Coulon, V., Sanz, J.R., Chiesa, J., Gandarillas, A., 2010. A mitosis block links active cell cycle with human epidermal differentiation and results in endoreplication. PLoS ONE 5, e15701. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015701

Zhou, B.-R., Feng, H., Ghirlando, R., Li, S., Schwieters, C.D., Bai, Y., 2016. A Small Number of Residues Can Determine if Linker Histones Are Bound On or Off Dyad in the Chromatosome. Journal of Molecular Biology 428, 3948–3959. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.016

Zhou, B.-R., Feng, H., Kato, H., Dai, L., Yang, Y., Zhou, Y., Bai, Y., 2013. Structural insights into the histone H1-nucleosome complex. PNAS 110, 19390–19395. https://doi.org/10.1073/pnas.1314905110

Zhou, B.-R., Jiang, J., Feng, H., Ghirlando, R., Xiao, T.S., Bai, Y., 2015. Structural Mechanisms of Nucleosome Recognition by Linker Histones. Mol. Cell 59, 628–638. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.025

Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., Travers, A., Muyldermans, S., 1998. Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. Nature 395, 402–405. https://doi.org/10.1038/26521

Zlatanova, J., Thakar, A., 2008. H2A.Z: view from the top. Structure 16, 166–179. https://doi.org/10.1016/j.str.2007.12.008