



HAL
open science

Modulations épigénétiques par les remodeleurs, variants d'histones et chaperons associés : du remodelage de la chromatine à ses dérégulations

Pernelle Klein

► **To cite this version:**

Pernelle Klein. Modulations épigénétiques par les remodeleurs, variants d'histones et chaperons associés : du remodelage de la chromatine à ses dérégulations. Génétique humaine. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ054 . tel-03934666

HAL Id: tel-03934666

<https://theses.hal.science/tel-03934666>

Submitted on 11 Jan 2023

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.

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
&
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS UMR 7104, INSERM U 1258
Département de Biologie Structurale Intégrative

Thèse présentée par :

Pernelle KLEIN

Soutenue le : **18 décembre 2020**

Pour l'obtention du grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Modulations épigénétiques par les remodeleurs,
variants d'histones et chaperons associés : du
remodelage de la chromatine à ses dérégulations

THÈSE dirigée par :

Dr. Christophe ROMIER

Directeur de recherche, IGBMC, Illkirch, France

RAPPORTEURS :

Dr. Françoise OCHSENBEIN

Directrice de recherche, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France

Dr. Matthieu GERARD

Directeur de recherche, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France

Dr. Carlo PETOSA

Directeur de recherche, Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, France

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. Katia ZANIER

Chargée de recherche, UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire (BSC), Illkirch, France

MEMBRES INVITÉS :

Dr. Christelle GOLZIO

Chargée de recherche, IGBMC, Illkirch, France

Merci !

Par où commencer ? Il y a tant de personnes à remercier, tant de personnes qui m'ont permis d'y arriver ! J'ai tellement de chance de vous avoir et vous remercie tous d'avoir fait partie de cette belle aventure hors du commun !

J'aimerais tout d'abord vivement remercier les membres de mon jury, Dr. Françoise Ochsenbein, Dr. Carlo Petosa, Dr. Matthieu Gerard et Dr. Katia Zanier. Merci à vous d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'avoir fait preuve de bienveillance dans cette période particulière de Covid-19. Merci à mon directeur de thèse le Dr. Christophe Romier de m'avoir permis de travailler au sein de son équipe et de m'avoir accompagnée dans cette aventure.

J'aimerais également remercier mes collaboratrices le Dr Christelle Golzio et le Dr. Maria Nicla Loviglio pour m'avoir fait découvrir l'univers du poisson zèbre et pour nos enrichissants échanges. Je tenais également à remercier la région Grand Est et l'ANR pour avoir financé mes 3 premières années de thèse, ainsi que la FRM qui m'a soutenue lors de cette quatrième année.

Un grand merci également à mon comité de mi-thèse : Dr. Natacha Rochel, Dr. Daniel Metzger et Dr. Pr. Bruno Chatton pour avoir écouté et aiguillé mes travaux.

Merci tout particulièrement à Bruno Chatton et à Mariel Donzeau, d'avoir cru en moi et de m'avoir accompagnée depuis de nombreuses années durant mon évolution et ma progression dans le monde scientifique.

Merci également à Renaud Wagner pour sa constante bienveillance et son IMPReSsionnant soutien avant et tout au long de cette thèse.

C'est dans le travail d'équipe qu'une thèse prend tout son sens. J'aimerais donc remercier tous les membres, anciens et actuels, de mon équipe qui m'ont accompagnée tout au long de cette thèse : Pierre Antony, Marie-Laure Diebold-Durand, Marina Vitoria Gomes, Elizabeth Ramos Morales, Edouard Troesch, Pauline Landwerlin, Régis Back, Martin Marek, Tajith Baba Shaik et Natalia Aleksandrova. Merci pour vos conseils avisés et votre bonne humeur au quotidien.

Je souhaiterais remercier les membres d'autres équipes qui m'ont eux aussi apporté leur aide lors de ce parcours : Claire Bâtisse, Alastair Mc Ewen, Kareem Mohideen Abdul, Eduardo Bruch, et Adam Ben Shem. Merci d'avoir partagé avec moi un peu de votre savoir !

Merci à mon lunch crew, Ayesha, Béa, Pau, Torben, Jordi, Xènia, Christophe et Robert pour les repas et *cafécitos* partagés. Ces moments de convivialités me manqueront (même si je ne suis pas si sûre de pouvoir dire la même chose de la nourriture du resto U). J'espère que vous continuerez tous à penser au « bien, pas bien » lorsque vous rentrerez dans une cantine. Vous allez

me manquer mes Ola bébé et Baguettes! Un special thanks to my Baguette Robert and my Lovely Ayesha.

Comme promis rien que pour toi CriCri, tu as ton propre paragraphe ! Merci d'avoir été « la Suisse » et notre expert « *diabitas* ». Merci pour tes « Ca te dit pas un DoMac ? » ou « Tarte flambée ce soir ? » Car oui, beaucoup de nourriture il faut pour terminer une thèse !

Merci aux Doudous, Anna et Camille, pour votre soutien sans faille, votre amitié au quotidien et les verres de rhum lors des coups durs !

Merci également au Choubi Syrine, surtout pour sa discrétion au quotidien (et surtout au restaurant) et son rire communicatif !

Ma Nata d'amour, aussi communément appelée Senior Advanced PostDoc Nata, merci pour toutes tes expertises, tes conseils, ton soutien et merci d'avoir toujours cru en moi. морква & поцілунки!

Ma best collègue forever Pauline ak(t)a PauPau ! (Haha akta une bonne blague que je voulais caser depuis un certain temps ^^) Merci pour ton amitié et d'avoir été mon pilier au quotidien. Nos déjeuners à la table de l'III me manqueront (c'était pour ne pas dire que tu me manqueras plus encore).

Merci à toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de rencontrer durant ces années et qui ont de près ou du loin partagé cette aventure : Ni(e)ls, Rachelle, Marcel, Sandra, Jin, Severine, Vincent et bien d'autres !

Valérie, merci pour les moments d'aquagym même si la Covid a eu raison de nos séances !

Je remercie mes Minions, Marion et Sarah, qui continuent toujours à me supporter depuis de nombreuses années.

Pour finir, je voudrais remercier les membres de ma famille : mes grands-parents, ma mamou, mon papa, ma sœur, ma belle-sœur, et bien d'autres encore...

Spécial dédicace à ma Omi que j'aime plus que tout, merci de m'avoir forcée à faire des dictées me permettant à présent d'avoir une grammaire acceptable, même si je suis sûre que tu trouveras encore des fautes dans ce manuscrit.

Merci aussi à ma Mamounette pugnace pour son intervention inoubliable lors de ma mi-thèse. Merci pour ton soutien et ton amour (je sais qu'à l'heure où j'écris ces lignes tu dois être encore plus stressée que moi).

Pour finir, un grand merci à mon Homme, que je vais bientôt pouvoir officiellement appeler comme ça (mouvement frénétique d'agitation de bague) ! Merci à toi Jean, depuis le temps que tu attends que je finisse mes études ! Merci d'avoir été auprès de moi tous les jours dans les moments joyeux et les moments plus difficiles. Tu es vraiment trop Djomb !

A vous tous je vous dédie ce manuscrit !

Comme à mon habitude je termine ces remerciements par « Bisous », mais de loin Covid oblige :)

"Pâte à modeler et chaperon rouge"
interprétation de mon titre de thèse selon Valérie Heck

Table des matières

Merci !.....	3
Table des matières.....	7
Liste des figures	15
Liste des tableaux.....	19
Liste des annexes	21
Liste des abréviations	23
Préambule :.....	29
Résumé de thèse.....	31
Publications scientifiques et communications orales.....	37
Chapitre 1 : Introduction	41
I. De l'ADN au chromosome en passant par la chromatine	41
A. L'ADN : support de l'information génétique.....	41
B. Organisation génomique sous forme de chromatine	42
1. La chromatine, dans tous ses états	43
2. Organisation 3D du génome.....	45
3. Le nucléosome : élément fonctionnel de base de la chromatine	47
II. Modulation épigénétique de la structure de la chromatine	55
A. L'épigénétique, l'au-dessus de la génétique.....	55
1. Définition	55
2. Une vision moléculaire	56
3. Dérégulation et épimédicaments.....	58
B. Méthylation de l'ADN.....	60
1. Writers	61
2. Readers	62
3. Erasers	62
4. Rôles clés et cancérogénèse.....	63
C. Les modifications post-traductionnelles des histones.....	63
1. La phosphorylation des histones.....	66

2.	L'acétylation des lysines	67
3.	Méthylation des histones	69
4.	ADP-ribosylation	70
5.	Le code histone.....	71
D.	Les variants d'histones et chaperonnes associées.....	73
1.	Les variants d'histones	73
2.	Les chaperons d'histones	76
3.	Catalogue des variants	79
4.	Notion de code nucléosome.....	81
E.	Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants (remodeleurs).....	83
1.	SWI / SNF	86
2.	ISWI.....	89
3.	CHD	92
4.	INO80.....	100
5.	Un mécanisme unifié de translocation.....	111
F.	Objectifs de la thèse.....	113
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....		117
I.	Techniques de biologie moléculaire et constructions	117
A.	Les vecteurs d'expression de la suite pET-MCN.....	117
B.	Méthodes de clonage.....	120
1.	Clonage par assemblage Gibson.....	120
2.	Sous-clonage par restriction/ligation	123
3.	Concaténations polycistroniques	123
4.	Mutagenèse dirigée par « Rolling circle »	124
C.	Liste des constructions plasmidiques réalisées et utilisées	125
II.	Tests d'expression et de purification à petite échelle	127
A.	Principe.....	127
B.	Procédure expérimentale des Minitests :.....	128
1.	Expression.....	128
2.	Purification.....	130

3.	Analyse des résultats	131
III.	Expression et purification de protéines recombinantes à grande échelle ou « <i>large scale</i> »	133
A.	Production	133
1.	Transformation	133
B.	Méthodologie de purification	134
1.	Lyse cellulaire	134
2.	Purification d'affinité	134
3.	Purification par échangeuse d'ions	136
4.	Chromatographie d'exclusion stérique	136
5.	Concentration et vérification	137
6.	Inconvénients et avantages du système d'expression <i>E. coli</i>	137
IV.	Caractérisation biophysique	138
A.	Caractérisation des interactions protéine-protéine (ipp).....	138
1.	Principe de la caractérisation et la quantification de ipp.....	138
2.	Comparaison des techniques biophysiques existantes.....	140
B.	Titration calorimétrique isotherme ou ITC	142
C.	La résonance plasmonique de surface (SPR)	143
D.	La diffusion dynamique de la lumière (DLS)	144
E.	Nano fluorimétrie à balayage différentiel ou NanoDSF.....	144
F.	Ultracentrifugation analytique ou AUC.....	145
V.	Caractérisation structurale	146
A.	Cristallisation	146
1.	Essais de cristallisation pour CHD1L.....	146
2.	Traitement du jeu de données du chaperon ANP32E6 -LRR.....	146
B.	Microscopie électronique en coloration négative	147
Chapitre 3 : Interaction du variant d'histone H2A.Z avec ses chaperons YL1 et ANP32E		151
I.	Introduction	151
A.	Le variant d'histone H2A.Z	151
1.	Vue d'ensemble	151

2. Structure	152
3. Les isoformes de H2A.Z	152
4. Rôles et localisation génomique de H2A.Z	154
5. PTMs	158
6. Implication dans les maladies.....	159
B. Dépôt et éviction de H2A.Z	162
1. Modèle proposé chez la levure	162
2. Modèle proposé chez les mammifères	166
3. YL1 vs ANP32E	178
C. Objectifs	179
II. Résultats.....	180
A. Criblage des constructions pour ANP32E et YL1.....	180
B. Purifications des protéines.....	181
1. Purification des paires d'histones H2A/H2B ΔN_{ter} tails et variante H2A.Z/H2B ΔN_{ter} tails	181
2. Purification des chaperons et des différents domaines des chaperons :	183
C. Etude comparative d'ANP32E et YL1 avec la paire d'histone variante H2A.Z/H2B.....	187
1. Caractérisation de l'interaction ANP32E-ZID avec H2A.Z/H2B en ITC	187
2. Comparaison avec YL1	189
3. Caractérisation en AUC.....	191
4. Caractérisation de l'interaction ANP32E-ZID avec H2A.Z/H2B en ITC avec une autre étiquette	193
D. Etude comparative d'ANP32E et YL1 avec les paires d'histones H2A.Z-like/H2B et H2A-like/H2B	195
1. Les mutants de H2A qui sont H2A.Z-like	195
2. Les mutants de H2A.Z qui sont H2A-like	198
E. Etude de la partie N-terminale d'ANP32E et de son rôle potentiel dans la fonction de chaperonnage :	201
1. Structure cristallographique d'ANP32E LRR.....	201
2. Mise en évidence biochimique du rôle d'ANP32E LRR	203

F.	Préparation du nucléosome	204
1.	Préparation de l'ADN Widom 601 de 147 pb	205
2.	Approche 1 : préparation de l'octamère	205
3.	Approche 2 : Purification de la paire d'histones et du tétramère séparément	207
G.	Etude comparative d'ANP32E et YL1 en condition nucléosomique	211
1.	Mesure d'affinités des interactions par résonance des plasmons de surface (SPR)	211
2.	Essai de retardation sur gel	212
III.	Discussion	214
A.	Comparaison de l'interaction de YL1 ZID et ANP32E1 ZID avec la paire d'histones H2A.Z/H2B	214
B.	Comparaison de l'interaction de YL1 ZID et ANP32E1 ZID avec des mutants de la paire d'histones variante et canonique	216
C.	Structure ANP32E LRR – Un potentiel rôle du domaine LRR dans la fonction de chaperonnage	220
1.	Structure du domaine LRR	220
2.	Simulation moléculaire	221
D.	Comparaison de l'interaction de YL1 ZID et ANP32E1 ZID en contexte nucléosomique	223
1.	Préparation du nucléosome	223
2.	Test de l'interaction chaperon-nucléosome	224
E.	Ouverture sur un modèle spéculatoire	226
Chapitre 4 : CHD1L, un remodeleur unique et un acteur dans les phénotypes associés aux réarrangements chromosomiques de la région 1q21.1., incluant des troubles du spectre autistique.		
I.	Introduction	231
A.	Polymorphisme génétique et CNVs	231
B.	Le trouble du spectre autistique (TSA)	233
C.	La région chromosomique 1q21.1	234
1.	Composition	234
2.	Phénotypes associés aux CNVs	236
3.	Un phénotype miroir de la région 1q21.1 distale	237

4.	Résultats collaboratifs : Quel(s) gène(s) de la région 1q21.1 distale est(ont) responsable(s) des phénotypes miroirs ?	238
D.	Le facteur de remodelage de la chromatine CHD1L	239
1.	CHD1L vs CHD1	239
2.	Composition et isoformes de CHD1L.....	241
3.	Mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L	243
4.	Rôles de CHD1L.....	247
5.	Développement	249
E.	Objectifs de thèse.....	250
II.	Résultats.....	251
A.	Objectifs 1 : Obtention d'information structurale	251
1.	Alignement de séquence et découpage	251
2.	Minitests des différentes constructions.....	252
3.	Purification pilote - 1 L.....	258
4.	Purification à grande échelle – 6L	265
B.	Objectif 2 : Etude de l'interaction impliquée dans le mécanisme d'auto-inhibition entre la tête ATPase et le macrodomaine.....	268
1.	Validation de l'interaction CHD1L CterFL + Nter par Minitests.....	268
2.	<i>Large scale</i> et optimisations pour GST-CHD1L Nter + CterFL.....	271
3.	Analyse des parties du Nter de CHD1L impliquées dans l'interaction avec le domaine Cter.....	275
4.	Vérification de l'interaction entre le lobe 2 de la partie Nter et la partie CterFL en <i>large scale</i>	276
5.	Stabilité des complexes	278
6.	Test de l'interaction entre la construction CHD1L Nter + Cter et le nucléosome....	280
C.	Objectif 3 : Etude d'une mutation provenant d'un cas clinique.....	282
1.	Minitests sur les constructions longues de CHD1L	282
2.	Minitests sur le complexe imitant le mécanisme d'auto-inhibition avec la mutation R392H.....	284
III.	Résultats de mes collaborateurs.....	287
A.	En parallèle des objectifs 1 et 2.....	287

B.	En parallèle de l'objectif 3 - cas clinique.....	288
IV.	Discussion et perspectives	289
A.	Objectif 1 : obtenir des informations structurales sur CHD1L.....	289
1.	CHD1L long et isoforme court	289
2.	CHD1L Nter (tête ATPase).....	290
3.	CHD1L Cter.....	290
B.	Objectif 2 : Etude du mécanisme d'auto-inhibition entre la tête ATPase et le macrodomaine.....	294
1.	CHD1L Nter + CterFL.....	294
2.	CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL.....	295
3.	Stabilisation du complexe CHD1L Nter + CterFL	296
4.	Remarques sur le lobe2 et l'activation de CHD1L.....	297
5.	Liaison au nucléosome	298
C.	Objectif 3 : Effet de la mutation R392H.....	300
1.	Mutations de CHD1L disponibles dans la littérature.....	300
2.	Rôle de la mutation R392H sur CHD1L et sur le mécanisme d'auto-inhibition	301
3.	Localisation de la mutation	301
D.	Ouverture sur la famille CHD	303
	Conclusion.....	307
	Annexes.....	313
	Bibliographie	325
I.	Articles scientifiques et revues.....	325
II.	Sitographies et ouvrages utilisés	360

Liste des figures

Figure 1 : Structure schématique de la double hélice d'ADN.....	42
Figure 2 : Représentation schématique des niveaux de compaction de la chromatine	44
Figure 3 : Organisation 3D du génome	46
Figure 4 : Composition et assemblage <i>in vitro</i> du nucléosome de cœur	49
Figure 5 : Le patch acide de la particule de cœur	50
Figure 6 : Deux modèles pour l'histone de liaison.....	54
Figure 7 : Modulation de la structure de la chromatine par différents mécanismes épigénétiques	56
Figure 8 : Vision globale des mécanismes épigénétiques, des techniques utilisées et des informations disponibles sur le site ENCODE	58
Figure 9 : Méthylation de la cytosine de l'ADN	61
Figure 10 : Représentation schématique des PTMs d'histones.....	65
Figure 11 : Les variants d'histones et leur pourcentage d'identité avec les histones canoniques	74
Figure 12 : Les histones canoniques et variants, leurs architectures, leurs chaperons et remodeleurs associés, ainsi que leurs distributions génomiques et implications fonctionnelles	79
Figure 13 : Représentation schématique de la notion de code nucléosome	82
Figure 14 : Organisation des sous-unités catalytiques des différentes familles et mécanismes d'action des différents remodeleurs.	85
Figure 15 : Modèle cryo-EM de la sous-unité catalytique Snf2 de levure en complexe avec un nucléosome.....	87
Figure 16 : Modèle cryo-EM du complexe SWI/SNF de levure en complexe avec le nucléosome en présence d'ADP-BeFx	88
Figure 17 : Structure du corps catalytique d'ISWI en condition apo.....	91
Figure 18 : Modèle structural de ISW1 lié au nucléosome.....	92
Figure 19 : Structure des chromodomains et de la tête ATPase de CHD1 de levure	95
Figure 20 : Modèle structural de CHD1 de levure lié au nucléosome	96
Figure 21 : Modèle de CHD4 humain lié au nucléosome	98
Figure 22 : Structure du remodeleur INO80 humain.....	104
Figure 23 : Structure du remodeleur SWR1 de levure.....	106
Figure 24 : Représentation schématique de l'évolution des complexes humains p400/Tip60 et SRCAP à partir des complexes NuA4 et SWR1 de levure.....	107
Figure 25 : Structure du remodeleur SRCAP humain	110

Figure 26 : Deux modèles pour la translocation de l'ADN.....	111
Figure 27 : Présentation des vecteurs de la série pET-MCN.....	119
Figure 28 : Principe de la réaction d'assemblage de Gibson	122
Figure 29 : Principe de la concaténation des vecteurs de la série pET-MCN basée sur le site de restriction <i>I-CeuI</i>	123
Figure 30 : Principe des tests d'expressions et de purifications à petite échelle et à moyen/haut débit	128
Figure 31 : Interprétation des résultats des Minitests	132
Figure 32 : Principe de la titration calorimétrique de l'appareillage à l'analyse des données ..	143
Figure 33 : Alignement de séquence entre hH2A et hH2A.Z.....	151
Figure 34 : Structure du nucléosome H2A.Z.....	152
Figure 35 : Alignement des isoformes humains de H2A.Z.....	153
Figure 36 : Modifications post- traductionnelles de H2A.Z.....	158
Figure 37 : Etude structurale de l'interaction entre Swr1-Z et H2A.Z/H2B.....	164
Figure 38 : Structure de Chz1 en complexe avec H2A.Z/H2B.....	165
Figure 39 : Mécanisme d'échange d'H2A.Z sur la chromatine	167
Figure 40 : Alignements d'ANP32E et de la famille ANP32	170
Figure 41 : Changement conformationnel de l'hélice α C de H2A.Z lié à la reconnaissance spécifique de ANP32E-ZID	171
Figure 42 : Etude structurale de l'interaction entre ANP32E-ZID et H2A.Z/H2B.....	173
Figure 43 : Etude structurale de l'interaction entre YL1-ZID et H2A.Z/H2B.....	175
Figure 44 : Découpage de la protéine ANP32E en différentes constructions.	180
Figure 45 : Gels SDS-PAGE et chromatogrammes des purifications des paires d'histones H2A.Z/H2B Δ N _{ter} tails et H2A/H2B Δ N _{ter} tails	182
Figure 46 : Résultats de purification des différentes constructions d'ANP32E.....	184
Figure 47 : Purification d'His6-YL1 ZID.....	185
Figure 48 : Purification d'His6-YL1 ZID.....	186
Figure 49 : Thermographes d'ITC pour les diverses constructions d'ANP32E avec la paire d'histone canonique ou variante H2A.Z	188
Figure 50 : Comparaison de l'interaction entre ANP32E1 ZID et YL1 ZID avec la paire d'histone variante H2A.Z.....	190
Figure 51 : Données d'AUC-SV pour les échantillons (A) His10-TRX-ANP32E1 et (B) His10-TRX-ANP32E1 + H2A.Z/H2B Δ Ntails	192
Figure 52 : Thermographes d'ITC pour l'interaction entre His10-SUMO-ANP32E1-ZID et H2A.Z/H2B Δ Nter tails.....	194
Figure 53 : Récapitulatifs des expériences réalisées avec les mutants H2A.Z-like/H2B.....	197

Figure 54 : Courbes d'ITC obtenues pour les interactions YL1-ZID et ANP32E ZID avec le quadruple mutant de H2A (H2A.Z-like)/H2B.....	197
Figure 55 : Design des mutants H2A-like et résultats des minitests	199
Figure 56 : Structure d'ANP32E LRR.....	202
Figure 57 : Résultats des étapes d'affinités permettant de tester l'interaction entre xH4-His6/xH3 et GST-ANP32E6 (LRR)	203
Figure 58 : ADN de positionnement 601 obtenu.....	205
Figure 59 : Reconstitution des octamères canonique et H2A.Z variant par co-expression chez <i>E.coli</i>	207
Figure 60 : Reconstitution des nucléosomes.....	210
Figure 61 : Expérience de retardation sur gel testant la liaison d'ANP32E1-ZID au nucléosome H2A.Z humain.....	213
Figure 62 : Comparaison des profils thermodynamiques des liaisons His6-YL1-ZID – H2A.Z/H2B et His10-SUMO-YL1-ZID – H2A.Z/H2B. Les différents paramètres sont exprimés en kcal/mol.	215
Figure 63 : Prédiction des régions intrinsèquement désordonnées des chaperons ANP32E et YL1	219
Figure 64 : Modélisation de l'interaction entre ANP32E LRR et xH3/xH4.....	222
Figure 65 : Modèle intégrant les domaines LRR et ZID d'ANP32E.....	227
Figure 66 : Composition et réarrangements de la région 1q21.1	235
Figure 67 : Alignement de séquence entre hCHD1 (en minuscule) et hCHD1L (en majuscule).	240
Figure 68 : Organisation schématique de la protéine humaine de CHD1L	241
Figure 69 : Les isoformes de CHD1L.....	243
Figure 70 : Modèle d'activation de CHD1L	244
Figure 71 : Architecture et structures de macrodomaines.....	246
Figure 72 : Les différentes constructions de CHD1L réalisées pour cette étude.....	251
Figure 73 : Résultats des minitests pour les constructions longues de CHD1L	253
Figure 74 : Résultats des minitests pour la partie N-terminale de CHD1L	255
Figure 75 : Résultats des minitests pour les parties C-terminale de CHD1L	257
Figure 76 : Résultats des purifications (1L) pour les constructions sélectionnées du domaine CterC de CHD1L.....	260
Figure 77 : Résultats des purifications (1L) pour les constructions sélectionnées du domaine CterFL de CHD1L	262
Figure 78 : Résultats des purifications (1L) pour les constructions sélectionnées du domaine CterN de CHD1L.....	264
Figure 79 : Résultats de la purification (6L) de GST-CHD1L CterFL.....	266
Figure 80 : Résultats des minitests pour l'interaction entre la N-terminale de CHD1L et les différentes constructions de la partie C-terminale	270

Figure 81 : Résultats des purifications 6L pour les constructions GST-CHD1L Nter+CterFL et GST-CHD1L Nter+CterM	274
Figure 82 : Résultats des minitests pour la N-terminale de CHD1L.....	276
Figure 83 : Résultats des purifications à grande échelle (3L) pour les tests d'interactions entre les différentes parties N-terminale et la partie C-terminale de CHD1L.....	277
Figure 84 : Gel SDS PAGE et stabilité thermique des différents complexes.....	279
Figure 85 : Expérience de retardation sur gel testant la liaison de CHD1L Nter+CterFL au nucléosome canonique de <i>xénopus</i>	281
Figure 86 : Résultats des minitests pour les constructions longues de CHD1L +/- R392H.....	284
Figure 87 : Résultats des minitests pour le complexe d'auto-inhibition avec uniquement le Lobe2 de la tête ATPase, en présence ou absence de la mutation R392H.....	285
Figure 88 : Prédiction des régions intrinsèquement désordonnées de la protéine CHD1L en utilisant l'interface en ligne d'IUPred (iupred2a.elte.hu).....	291
Figure 89 : Alignement de séquence entre le CterN (région charnière) de hCHD1L et le domaine SANT/SLIDE de hCHD1	291
Figure 90 : Modèle initial d'interaction pour le mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L	294
Figure 91 : Structure de scChd1 centrée sur le résidu R525 équivalent du résidu R392 de hCHD1L	302

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des épimédicaments approuvés par la FDA	60
Tableau 2 : Exemples de PTMs, de leurs acteurs et de leurs effets sur la chromatine. Adapté de (Quénet 2018).....	66
Tableau 3 : L'alphabet du code histone.....	72
Tableau 4 : Les variants d'histones état de l'art - Tableau sur les deux pages suivantes.....	79
Tableau 5 : Composition des complexes de SWI/SNF de levure et humain Adapté de (Clapier et Cairns 2009)	86
Tableau 6 : Les complexes de remodelage de la famille ISWI	90
Tableau 7 : Les membres de CHD1 et NuRD.....	93
Tableau 8 : Composition de la famille INO80	101
Tableau 9 : Amorces permettant la création des régions homologues aux vecteurs de la série pET-MCN pour le clonage de Gibson	120
Tableau 10 : Amorces universelles de concaténation	124
Tableau 11 : Liste des principaux plasmides générés et utilisés	125
Tableau 12 : Comparaison de différentes techniques biophysiques pour la caractérisation des ipp	141
Tableau 13 : Plan de la manipulation pour les approches SPR.....	211
Tableau 14 : Tampons de purification.....	259
Tableau 15 : Tampons de purification pour le large scale de GST-CHD1L CterFL	266
Tableau 16 : Tampons de purification pour GST-CHD1L Nter + CterFL	271

Liste des annexes

Annexe 1 : Posters réalisés au cours de la thèse	313
Annexe 2 : Réactifs utilisés en routine au laboratoire.....	316
Annexe 3 : Tableau des données cristallographiques d'ANP32E-LRR	318
Annexe 4 : Procédure d'assemblage NEB du nucléosome à petite échelle	319

Liste des abréviations

	<p>% : Pourcentage Cm : Centimètre ng : Nanogramme nm : Nanomètre rpm : Rotations par minute µg : Microgramme µL : Microlitre</p>
	<p>3C : HRV 3C Protéase / PreScission 3C 5-mC : 5'-méthylcytosine 5caC : 5-carboxycytosine 5fC : 5-formylcytosine 5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine</p>
A	<p>A : Adénine Ac : Groupement acétyle ACF : ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor ACTL6A : Actine Like 6A ADNr : ADN ribosomique ADP : Adénosine diphosphate ADPr : Mono-ADP-ribose Amp : Ampicilline AMP-PNP : Adényly-imidodiphosphate ANP32E : Acidic leucine-rich Nuclear Phosphoprotein 32 family member E ANSM : Agence Nationale de sécurité du médicament Ar : ADP-ribosylation ARP : Actin Related Protein ASF-1 : Anti-Silencing Function 1 Ash2L : Absent, small or homeotic 2-like ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated ATP : Adénosine triphosphate ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein ATRX : Alpha-Thalassaemia X-linked mental Retardation AUC : Ultracentrifugation analytique AURKB : Aurora kinase B</p>
B	<p>BAF : BRG1- or BRM-associated factors BeFx : Beryllium fluoride BER : Excision des bases BET : <i>Bromodomain</i> and Extra-Terminal motif BLC2 : B-cell Lymphoma 2 BLI : <i>Bio-Layer Interferometry</i> BRCA1 : Breast Cancer 1 BRCT : BRCA1 C Terminus</p>

	BRK : Brahma and Kismet Bu : Butyrylation
C	C : Cytosine CABIN1 : Calcineurin-binding protein cabin-1 CAF1 : Chromatin Assembly Factor 1 CBP : CREB binding protein CENP-A : Histone H3 like centromeric protein A CHCT : CHD1 helical C-terminal CHD : Chromodomains Helicase DNA Binding CHD1L : Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1-Like Chl : Chloramphénicol CHRAC : CHROMatin Accessibility Complex protein 1 CIP : Alkaline Phosphatase (Calf Intestinal) Cit : Citrullination CNV : Variabilité du nombre de copies (copie number variation) Co2+ : Cobalt CoA : Coenzyme A Cr : Crotonylation cryoEM : Cryo-microscopie électronique CT : Territoire chromosomique CTCF : CCCTC-binding factor CTD : Domaine C-terminal
D	Da : Dalton DAXX : Death domain-associated protein DLS : Diffusion dynamique de la lumière DMAP1 : DNA methyltransferase 1-associated protein 1 DNMT : DNA methyltransferase DNMTi : Inhibiteur de DNMT dNTPs : DéoxyNucléotides Tri-Phosphate DO : Densité optique dsDNA : ADN double brin
E	EGF : Facteur de croissance épidermique EM : Microscopie électronique ES : cellule souche embryonnaire ET : Extrait total
F	FA : Anisotropie de fluorescence FACT : Facilitates chromatin transcription FDA : American Food and Drug Administration FHS : Syndrome de Floating-Harbour Fo : Formylation FT : Flow through
G	G : Energie libre de Gibbs G : guanine

	<p>GAS41 : Glioma-Amplified Sequence 41 Glc : Glycation GNAT : Glycine N Acetyltransferase like protein GSH : Glutathion GST : Glutathion-S-transférase</p>
H	<p>H : Enthalpie H2A.Bbd : H2A Barr body deficient H2BFWT : Histone H2B type WT H3K27me3 : Tri-diméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 H3K36me3 : Tri-diméthylation de la lysine 36 de l'histone H3 H3K4me(2/3) : (Di-/Tri-)méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 H3K9me(3) : (Tri-)diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 H3S10ph : Phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 HATs : Histone Acetyltransferases HCl : Acide hydrochloridrique HDACi : Inhibiteurs d'HDAC HDACs : Histone Decacetylase HFD : Région centrale des histones HIRA : Histone Regulator A His : Histidine HJURP : Holliday Junction Recognition Protein HKMT : Histone lysine methyltransferase Hox : Homeobox HP1 : Heterochromatin Protein 1 HSA : Helicase SANT-associated</p>
I	<p>IGBMC : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire IHEC : International Human Epigenome Consortium IMAC : Immobilized Metal Affinity Chromatography ING3 : Inhibitor of growth protein 3 INO80 : INOitol requiring 80 Ipp : Interaction protéine-protéine IPTG: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside ISWI : Imitation switch ITC : Titration calorimétrique isotherme</p>
J	<p>JMJC : Jumonki domain-containing protein</p>
K	<p>K_A : Constante d'association Kan : Kanamycin KDM : Lysine demethylase K_D : Constante de dissociation à l'équilibre K_{off} : Constante cinétique de dissociation K_{on} : constante cinétique d'association</p>
L	<p>LB : Luria Bertani</p>

	<p>LINE : Long interspersed nuclear element lncRNAs : Long non-coding RNAs LRR : Région riche répétée en leucine LSD : Lysine-specific histone demethylase LTR : Long Terminal Repeat</p>
M	<p>M : mol/L MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase mRNA: ARN messenger MBD : Methyl CpG binding domain MBT : Malignant Brain Tumor MCS: Multiple Cloning Site Me : Méthylation miARN : Micro-ARN MLL1 : Mixed lineage leukaemia protein 1 MNase : Micrococcal nuclease MOZ : Monocytic leukaemia Zinc finger protein MSK : Mitogen and Stress Activated Protein Kinase MST : Thermophorèse à micro-échelle</p>
N	<p>NaCl : Chlorure de sodium NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide NanoDSF : Nano-fluorimétrie à balayage différentiel NAP1 : Nucleosome Assembly Protein 1 NCP : Nucleosome Core Particle NDR : Nucleosome-depleted region NEB : New England Biolabs Ni²⁺ : Nickel NLS: Nuclear localization signal NoRC : Nucleolar Remodeling Complex NTD : Domain N-terminal NuRD : Nucleosome Remodelling and Deacetylase NuRD : Nucleosome Remodeling Deacetylase NURF : Nucleosome Remodeling Factor</p>
O	<p>O/N : <i>over night</i> OH : hydroxylation</p>
P	<p>PAR : poly-ADP-ribose PARG : poly-ADP-ribose Glycohydrolase PARP1 : poly-ADP-ribose polymerase 1 PBAF : Association of polybromo-associated BAF PBZ : Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger PCR : Polymerase Chain Reaction PDB: Protein Data Bank</p>

	<p>PEG : Polyéthylène glycol Ph : Phosphorylation pH : Potentiel hydrogène PHD : Homéodomaine de plantes PKC : Protein Kinase C PMT : Protein Methyl Transferase PP1 : Protein Phosphatase 1 Pr : Propionylation PRC1/2 : Protein Regulator of cytokinesis 1/2 PRMTs : Protein Arginine Methyltransferases PTM : Modification post-traductionnelle</p>
R	<p>RbBp5 : Retinoblastoma Binding Protein 5 RBS : Site de liaison aux ribosomes RMN : Résonance Magnétique Nucléaire RSC : Remodeling the Structure of Chromatin RSF1 : Remodeling and Spacing Factor 1 RU : Unité de résonance</p>
S	<p>S : Entropie SAM : S-adenosylméthionine SANT : Swi3, Ada2, N-Cor and TFIIIB Sas2 : Something About Silencing 2 SDS : Sodium Dodecyl Sulfate SE : Equilibre de sédimentation SHL : Localisation superhélicoïdale SINES : short interspersed nuclear element SLIDE : SANT-like domain Sp : Spectinomycine SPR : résonance plasmonique de surface SRCAP : SNF2-Related CBP Activator Protein SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier SV : Vitesse de sédimentation SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable SWR1 : SWI2/SNF2-Related 1 Chromatin Remodeling Complex</p>
T	<p>T : Thymine TAD : Domaines topologiquement associés TAF : TATA-binding protein associated factor TARG1 : Terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TB : Terrific Broth TET : Ten-eleven translocation TGD : Thymine ADB glycosylate Th : Thrombine Tm : Température de demi-dénaturation</p>

	<p>TRD : Transcriptional repression domain</p> <p>Tris : 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1, 3-propanediol</p> <p>TRX : Thiorédoxine</p> <p>TSH2B : Testis-specific histone H2B</p>
U	<p>Ub : Ubiquitination</p> <p>UBN1 : Ubinuclein-1</p>
W	<p>WDR5 : WD repeat-containing protein 5</p> <p>WICH : WSTF-SNF2h</p> <p>WSTF : William Syndrome Transcription Factor</p>
Y	<p>YL1 : Vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog</p>
Z	<p>ZID : Domaine d'interaction avec 2A.Z (H2A.Z interacting domain)</p> <p>ZNHIT1 : Zinc finger HIT domain-containing protein 1</p>

Préambule :

Lors de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler sur trois sujets passionnants et challenging ! Mon premier projet portait sur le récepteur nucléaire HNF4 α et son implication dans le diabète de type MODY1. Ce projet a malheureusement dû être abandonné à la fin de ma deuxième année, suite aux conseils avisés de mon comité de mi-thèse. Ainsi, et pour des soucis de cohérence de plan, ce dernier ne sera pas présenté dans ce manuscrit. Le poster 1, « nuclear receptor HNF4a » présenté dans l'Annexe 1 résume de manière succincte les différents travaux réalisés sur ce projet. Ma thèse s'axe donc sur deux projets principaux :

- **Le variant d'histone H2A.Z et ses chaperons YL1 et ANP32E, qui interagissent physiquement et fonctionnellement avec les remodeleurs P400/TIP60 et SRCAP**
- **Le remodeleur CHD1L qui est un acteur dans les phénotypes associés aux réarrangements chromosomiques de la région 1q21.1., incluant des troubles du spectre autistique.**

Ces projets variés ont une thématique commune qui est la régulation épigénétique et impliquent tous des facteurs de remodelage de la chromatine.

Mon **premier chapitre** est ainsi une introduction générale basée sur les différents effecteurs et les différents mécanismes de la régulation épigénétique.

Ensuite un **second chapitre** décrit les méthodologies qui ont été utilisées.

Cette thèse est principalement axée sur la biochimie et les interactions protéines-protéines. J'attire votre attention sur le fait que j'ai commencé plusieurs projets de zéro, et que de ce fait il n'y a que très peu de « biologie structurale » en soit dans cette étude.

Le **troisième chapitre** se concentre sur mon premier projet, à savoir sur le variant d'histone H2A.Z et plus particulièrement sur la caractérisation de son chaperon ANP32E et de ses différents domaines.

Ce chapitre est encore divisé en sous-parties, avec notamment une introduction spécifique au projet avec des objectifs détaillés, suivis des résultats principaux et de leurs discussions. Le **quatrième chapitre** est une collaboration avec l'équipe du Dr. Christelle Golzio. Ce travail a été débuté à la moitié de ma troisième année et suit la même construction que le chapitre 3.

Je vous souhaite à tous une bonne lecture, en espérant que ce travail vous plaira (ou en tout cas ne vous déplaira pas !).

Résumé de thèse

La chromatine, forme condensée de l'ADN dans le noyau eucaryote, régit l'accès à l'information génétique. La modulation de la structure de la chromatine est possible grâce aux effecteurs épigénétiques. Ces effecteurs régulent l'expression des gènes, la réparation de l'ADN, ainsi que de nombreux processus nucléaires, contrôlant ainsi la stabilité du génome. Ces effecteurs sont de plusieurs types, tels que les enzymes de modifications covalentes des histones et de l'ADN, les variants d'histones, les chaperons d'histone, ou encore les facteurs de remodelage de la chromatine, appelés remodeleurs.

Ainsi, la flexibilité des mécanismes épigénétiques, par opposition à la stabilité de l'information génétique, fournit un moyen efficace de réguler l'homéostasie des cellules. La dérégulation de ces mécanismes épigénétiques est liée à de nombreuses pathologies, allant des maladies inflammatoires, neurologiques et développementales aux cancers.

Ces effecteurs sont donc des cibles thérapeutiques de choix. Il est ainsi essentiel de mieux comprendre en termes moléculaires leur interaction et leur mode d'action.

Mon sujet de thèse s'insère dans cette problématique, l'objectif principal étant de caractériser les interactions entre plusieurs de ces effecteurs épigénétiques :

- 1. Le variant d'histone H2A.Z et ses chaperons YL1 et ANP32E, qui s'associent aux remodeleurs SRCAP et P400/TIP60,**
- 2. Le remodeleur unique CHD1L.**

Mes travaux impliquent l'utilisation d'approches biochimiques, biophysiques et structurales complémentaires.

1. Le variant d'histone H2A.Z et ses chaperons YL1 et ANP32E :

Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine, il est formé par 147 paires de bases d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones, lui-même composé sous forme canonique de deux dimères d'H2A/H2B et d'un tétramère d'H3/H4.

H2A.Z est un variant de l'histone canonique H2A, qui peut être introduit à la place de H2A dans le nucléosome. Le variant d'histone H2A.Z est très conservé au cours de l'évolution. Il contrôle des événements nucléaires majeurs, comme la régulation de la transcription, la délimitation de la chromatine, la réparation de l'ADN et la ségrégation chromosomique. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de H2A.Z dans des cancers, notamment dans les mélanomes, les carcinomes hépatocellulaires et le cancer du sein, où H2A.Z est surexprimé. H2A.Z a aussi été proposé comme étant un biomarqueur potentiel de prédiction et de diagnostic dans le cancer du sein.

Les travaux préliminaires de mon équipe ont permis de caractériser deux chaperons d'histones humains impliqués dans les échanges entre H2A et H2A.Z sur la chromatine : YL1 et ANP32E. Ces chaperons interagissent physiquement et fonctionnellement avec les facteurs de remodelage de la chromatine SRCAP et P400/TIP60. Plus précisément, YL1-SRCAP est responsable du dépôt de la paire d'histones variantes H2A.Z/H2B dans le nucléosome, tandis qu'ANP32E-p400/TIP60 est responsable de son éviction.

Mon équipe a montré que YL1 et ANP32E, malgré leurs rôles fonctionnels opposés, reconnaissent H2A.Z de manière similaire à l'aide de petits domaines, en induisant un changement conformationnel majeur dans l'hélice α carboxy-terminale (hélice α C) de H2A.Z. Ces domaines ont été nommés « H2A.Z-Interacting Domains » ou ZID.

YL1 et ANP32E contiennent également d'autres domaines qui participent potentiellement à la reconnaissance d'H2A.Z/H2B en coopération avec leur domaine ZID, pouvant ainsi mieux expliquer les fonctions opposées de ces deux protéines. Notamment, la protéine ANP32E est composée de deux domaines conservés, un domaine N-terminal possédant une région riche répétée en leucine (LRR) et en C-terminal, une région acide de faible complexité, contenant le domaine ZID.

Mon objectif a été de caractériser l'interaction d'ANP32E et d'YL1 et de leurs différents domaines avec :

- (i) la paire d'histones H2A.Z/H2B**
- (ii) les nucléosomes canoniques et H2A.Z-variants.**

Au cours de ma thèse, j'ai pu caractériser l'affinité des deux chaperons YL1 et ANP32E avec H2A.Z/H2B par titration calorimétrique isotherme (ITC). Les résultats obtenus soulignent une différence entre YL1 et ANP32E. Plus précisément, deux événements de liaison sont observés pour ANP32E-ZID, tandis qu'un seul est observé pour YL1-ZID. Cette différence n'est pas détectée au niveau structural. Des expériences d'ultracentrifugation analytique (AUC) ont été réalisées, afin de confirmer et d'élucider ce double événement de liaison pour ANP32E-ZID et H2A.Z/H2B. L'AUC a permis de proposer un modèle incluant une dimérisation d'ANP32E-ZID qui pourrait expliquer le fait que l'un des deux événements observé en ITC correspondrait à une perte de la dimérisation avant que H2A.Z/H2B puisse être fixé.

Cette dimérisation ne semble cependant pas correspondre à une réalité biologique, étant donné qu'un changement d'étiquette de purification pour ANP32E permet la disparition de cette dimérisation.

Des expériences d'AUC-SV ont également permis de caractériser l'hétéro-complexe ANP32E-ZID - H2A.Z/H2B permettant de quantifier et confirmer sa constante de dissociation à l'équilibre.

Ainsi, l'affinité de la liaison d'YL1-ZID à H2A.Z/H2B serait dix fois plus forte que celle d'ANP32E à H2A.Z/H2B, avec des K_D de 2.3 à 4.4 nM et de 18 à 30 nM respectivement. Ce résultat est en accord avec la plus grande surface d'interaction observée entre YL1 et H2A.Z/H2B. Cette caractéristique est potentiellement liée aux fonctions biologiques opposées de ces chaperons, bien que ces deux interactions restent très affines.

J'ai également étudié l'affinité de nombreux mutants de H2A/H2B par ITC, permettant une meilleure compréhension des résidus importants pour la liaison des deux chaperons. Pour ce faire j'ai muté les résidus de H2A en résidus équivalents de H2A.Z impliqués dans la liaison au ZID. Tandis que YL1-ZID peut reconnaître un mutant de H2A qui n'incorpore que quatre résidus spécifiques à H2A.Z, ANP32E-ZID en est incapable, confirmant encore leurs différences. Une approche de mutation inverse, consistant à muter H2A.Z en H2A a également été réalisée.

J'ai aussi déterminé la structure de la région N-terminale d'ANP32E (LRR) par cristallographie aux rayons X avec une résolution de 1,1 Å. La structure globale d'ANP32E LRR est conservée par rapport aux autres membres de la famille ANP32, présentant une forme de fouet avec six feuillets bêta, formant la partie concave, et six hélices alpha dans la partie convexe. Le domaine LRR d'ANP32E présente cependant des propriétés physico-chimiques et structurales spécifiques par rapport aux autres membres de la famille ANP32.

Les études biochimiques que j'ai réalisées sur ce domaine fournissent de nouvelles informations : ANP32E LRR pourrait non seulement participer coopérativement à la fonction de chaperon pour H2A.Z/H2B, mais également se fixer sur H3/H4.

J'ai ensuite commencé l'étude des complexes chaperon-nucléosome. Pour ce faire, j'ai purifié et reconstitué du nucléosome canonique H2A et variant H2A.Z. Le nucléosome H2A.Z a été reconstitué dans l'optique de tester son interaction avec les chaperons ANP32E et YL1. Le nucléosome canonique quant à lui a été reconstitué dans le but de tester son interaction potentiel avec YL1.

Les résultats préliminaires, obtenus par gel de retardation, nous montrent que ANP32E-ZID n'est pas capable de se lier seul au nucléosome-H2A.Z. Des expériences sont encore nécessaires pour vérifier la liaison du domaine LRR d'ANP32E au nucléosome et à son ADN. Le domaine LRR d'ANP32E pourrait être responsable de la reconnaissance du tétramère H3/H4 du nucléosome, permettant par la suite l'éviction du dimère H2A.Z/H2B par le domaine ANP32E-ZID. Les interactions entre YL1 et les nucléosomes canonique/H2A.Z variant restent à caractériser.

Les résultats ainsi obtenus m'ont permis de comparer les deux chaperons YL1 et ANP32E et de caractériser leurs différences. J'ai pu également poser les bases d'un modèle d'éviction d'H2A.Z par ANP32E. Ce travail contribue donc à une meilleure compréhension de processus de régulation épigénétiques fondamentaux, permettant d'aborder les aspects mécanistiques et fonctionnels de la biologie d'H2A.Z.

2. Le facteur de remodelage de la chromatine CHD1L

Le polymorphisme génétique est à l'origine des variabilités génétiques au sein de différents locus dans une population. Les effets de ces variations sont souvent neutres, mais peuvent également entraîner des conséquences fonctionnelles. La variabilité du nombre de copies (*copy number variation*, CNV) d'un gène ou d'une région génomique contribue de façon majeure à ces déséquilibres génomiques.

La région chromosomique 1q21.1 distale, dans laquelle se situe le gène codant pour le remodeleur *CHD1L* (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1-Like), est sujette aux délétions ou duplications. Ces réarrangements sont associés à de nombreux phénotypes, tels que des cardiopathies congénitales, de la schizophrénie, ainsi que des anomalies de la circonférence de l'encéphale et de la stature. On les retrouve notamment, chez des patients atteints de troubles du spectre autistique, où des duplications et des délétions ont été observées dans cette région 1q21.1.

Nos collaboratrices C. GOLZIO et MN. LOVIGLIO à l'IGBMC travaillent sur les réarrangements chromosomiques dans les troubles neuro-développementaux et notamment les troubles du spectre autistique (TSA).

Leurs récents résultats suggèrent que le gène *CHD1L* est un contributeur majeur aux phénotypes neuro-développementaux associés au CNV en position 1q21.1, incluant des atteintes au niveau du volume crânien et de la stature.

Les expériences de complémentations *in vivo* chez le poisson zèbre, menées par nos collaboratrices, ont permis de montrer l'implication de la forme entière de *CHD1L*, mais également celle d'un isoforme plus court de *CHD1L*, qui permettent tous deux le sauvetage des poissons *CHD1L*^{-/-}. Cet isoforme court est d'un intérêt particulier. En plus d'être l'isoforme le plus exprimé au niveau du cerveau, cet isoforme ne possède pas le premier lobe du domaine ATPase de *CHD1L*. Il est ainsi potentiellement incapable de fixer l'ATP et d'effectuer une fonction de remodelage canonique et pourrait donc avoir un rôle méconnu dans ce processus.

De plus, l'étude de la pathogénicité d'un variant homozygote (R392H) dans *CHD1L* menée par nos collaboratrices nous indique qu'une perte partielle de fonction de ce gène muté serait également responsable des troubles du spectre autistique identifiés chez l'individu porteur de ce variant.

CHD1L est un remodeleur unique de la famille SNF2 et de la sous-famille CHD. Dans cette sous-famille, des chromodomains maintiennent les remodeleurs dans une conformation inactive, cette inhibition conformationnelle étant supprimée par la liaison au nucléosome. Ce mécanisme d'auto-inhibition se retrouve également dans la sous-famille de remodeleurs ISWI,

où le domaine AutoN vient bloquer la sous-unité ATPasique en conformation inactive, en absence de liaison au nucléosome.

De manière surprenante, CHD1L ne contient pas de chromodomaine dans sa partie N-terminale. CHD1L est ainsi composé, dans sa partie N-terminale, d'une tête ATPase de type SNF2 formée de deux lobes (1 et 2) RecA-like, suivie d'un signal de localisation nucléaire au sein d'un lieur peptidique (linker) et, dans sa partie C-terminale, d'un macrodomaine. Ce macrodomaine est unique parmi les remodeleurs de la famille SNF2. En 2017, il a été mis en évidence que ce macrodomaine joue un rôle auto-inhibiteur pour CHD1L, en interagissant avec la partie N-terminale (tête ATPase). Seule la liaison au macrodomaine de tri-ADPribose ou d'un substrat avec une poly-ADP-ribosylation permet de lever cette inhibition, entraînant l'activation du remodeleur. Les bases structurales de cette inhibition restent à ce jour inconnues.

Ainsi, CHD1L possède une activité de remodelage de la chromatine poly(ADP-ribose) ou (PAR)-dépendante, qui semble faciliter les réactions de réparation de l'ADN. Le remodelage du nucléosome par CHD1L dépendrait de la formation d'un complexe intermédiaire entre le macrodomaine de CHD1L, la poly (ADP-ribose) polymérase, PARP1 modifiée par une ADP ribosylation (PARylated PARP1) et le nucléosome.

Nous avons voulu comprendre comment CHD1L contribue aux phénotypes neuro-développementaux. Mon objectif a été d'aider à mieux interpréter ces phénotypes et l'implication des deux isoformes de CHD1L, en effectuant des études biochimiques, biophysiques et structurales. Cette dernière est cruciale, étant donné qu'il n'existe à ce jour aucune donnée structurale sur le remodeleur CHD1L.

Pour ce faire j'ai étudié :

(i) les isoformes long et court de CHD1L, ainsi que les domaines séparés de CHD1L par des approches biochimiques et structurales.

(ii) le mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L et la présence potentielle de ce mécanisme dans l'isoforme court. J'ai également étudié l'effet de ce mécanisme sur la fixation au nucléosome.

(iii) l'impact d'une mutation clinique R392H sur les isoformes long et court, ainsi que son effet potentiel sur le mécanisme d'auto-inhibition.

J'ai cherché à comprendre comment l'isoforme court, composé uniquement du lobe 2 de la tête ATPase et du macrodomaine, permet le sauvetage du phénotype chez le poisson zèbre. La tête ATPase étant incomplète et donc a priori non fonctionnelle, ma première hypothèse a été que le macrodomaine pourrait être suffisant au sauvetage du phénotype. Cette hypothèse a été testée par nos collaboratrices, chez le poisson zèbre, générant des phénotypes identiques à ceux de

CHD1L^{-/-}. La même observation a été réalisée avec la tête ATPase seule. Il semblerait donc que le lobe 2 de la tête ATPase et le macrodomaine soient tous deux nécessaires au sauvetage du phénotype.

Je me suis alors intéressée au mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L. Le macrodomaine seul s'est avéré insoluble, lorsqu'il est exprimé chez *E. coli*. En revanche, l'utilisation d'une construction plus longue du macrodomaine contenant une partie du linker et l'ajout de la tête ATPase, ont permis de solubiliser ce macrodomaine. De plus, seule la présence du lobe 2 est nécessaire à l'interaction avec le macrodomaine. Mes travaux ont donc permis de mettre en évidence un complexe stable entre la partie C-terminale (macrodomaine) et N-terminale (tête ATPase ou lobe 2). Ces résultats soulignent que le lobe 2 semble suffisant à la mise en place du mécanisme d'auto-inhibition, ce qui pourrait expliquer le sauvetage du phénotype par l'isoforme court de CHD1L.

J'ai ensuite testé la fixation du complexe d'auto-inhibition, à savoir CHD1L tête ATPase et macrodomaine, au nucléosome. Mes premiers résultats montrent que ce complexe est capable de fixer le nucléosome en présence d'un analogue non hydrolysable de l'ATP. La liaison du PARylated PARP1 ne semble donc pas nécessaire à la fixation de CHD1L au nucléosome. En revanche, plusieurs études ont montré que la présence du PARylated PARP1 permettrait de lever l'auto-inhibition et d'activer le remodeleur. De ce fait, CHD1L semble se distinguer des autres remodeleurs, pour lesquels les mécanismes d'auto-inhibition sont levés par la reconnaissance au nucléosome.

J'ai ensuite étudié la mutation clinique pathogène de *CHD1L*. Cette mutation, R392H, se situe dans le lobe 2 de CHD1L. Elle a été testée par nos collaboratrices en complémentation chez le poisson zèbre et ne permet qu'un sauvetage partiel des poissons CHD1L^{-/-}. D'un point de vue biochimique, cette mutation semble affecter l'expression et/ou la solubilité et/ou la stabilité de la protéine. Il est également possible que cette mutation ait un impact sur l'interaction d'auto-inhibition entre le lobe 2 de la tête ATPase et le macrodomaine.

Nos résultats collaboratifs permettent donc de confirmer que CHD1L est bien un acteur majeur associé aux phénotypes neurodéveloppementaux de la région 1q21.1 distale. De plus, mes résultats soulignent le caractère unique du remodeleur CHD1L, tant en composition, qu'en mécanisme d'action.

Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce remodeleur et de ses mutations.

Publications scientifiques et communications orales

Publications scientifiques :

Ces travaux donneront lieu à deux publications scientifiques post-soutenance :

- Le premier papier sera une publication 1^{ère} autrice, sur l'interaction du variant d'histone H2A.Z avec ses chaperons YL1 et ANP32E. Ce travail nécessite encore la finalisation d'expériences retardées par la crise de la Covid-19.
- Le second papier résultera du travail collaboratif avec l'équipe de C. Golzio et aura pour sujet le remodeleur CHD1L. Ce papier, en cours de rédaction, nécessite la finalisation d'expériences sur le mutant R392H.

Communications orales :

- Communication orale sous le format « ma thèse en 3 minutes » lors du Symposium LMB-IGBMC (MRC Laboratory of Molecular Biology - Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire) se tenant du 10 au 13 juillet 2018 à Cambridge (UK) : “Structural study and characterization of HNF4 α -TAF4-TAF12 complex”, Pernelle Klein → 1^{er} prix 3MT
- Communication orale lors d'un séminaire du département de Biologie structurale intégrative de l'IGBMC, le 29/03/2019 : « Interaction of histone variant H2A.Z with its chaperons YL1 and ANP32E: link to chromatin remodelling and disease », Pernelle Klein

Communications par affiches :

- Présentation d'une affiche lors du Symposium LMB-IGBMC se tenant du 10 au 13 juillet 2018 à Cambridge (UK) “Structural study and characterization of HNF4 α -TAF4-TAF12 complex”, Pernelle Klein et Christophe Romier
- Présentation d'une affiche lors du 1er Congrès de Biologie Structurale Intégrative se tenant du 7 au 11 septembre 2019 à Toulouse : « Interaction of histone variant H2A.Z with its chaperons YL1 and ANP32E: link to chromatin remodelling and disease », Pernelle Klein, Nataliia Aleksandrova, Martin Marek et Christophe Romier → Prix du meilleur Poster décerné par l'AFC (Association Française de Cristallographie).

Chapitre 1 :

Introduction

Chapitre 1 : Introduction

I. De l'ADN au chromosome en passant par la chromatine

A. L'ADN : support de l'information génétique

Les origines de la biologie moléculaire remontent à 1869 lorsqu'un biochimiste suisse, Friedrich MIESCHER, isola à partir de noyaux de cellules une substance alors appelée « nucléine ». Bien loin de se douter du rôle de cette substance, c'est en 1928 que Frederick GRIFFITH postula que cette substance, alors rebaptisée « acide nucléique », est un « facteur transformant » mettant en avant son caractère héréditaire. Ce n'est que seize ans plus tard que ce facteur fut identifié comme étant l'ADN (Avery, MacLeod, et McCarty 1944).

En 1900, la redécouverte des travaux de Gregor MENDEL (Mendel 1865) par Carl CORRENS, qui utilisa pour la première fois l'expression « lois de Mendel », marqua l'ère de la génétique moderne et des recherches sur l'hérédité. Chaque cellule contient l'ensemble de l'information génétique, sous forme d'ADN, permettant le développement, le fonctionnement et la reproduction des êtres vivants.

En 1953, Rosalind FRANKLIN et Maurice WILKINGS firent également une avancée majeure en démontrant, grâce à l'utilisation de rayons X, la structure hélicoïdale répétée de l'ADN. Leurs travaux ont permis par la suite à James WATSON et Francis CRICK de mettre en évidence la structure en double hélice de l'ADN (Watson et Crick 1953).

L'ADN est composé de deux chaînes polydésoxyribonucléotidiques antiparallèles. Chaque désoxyribonucléotide est composé d'une base azotée (adénine (A), thymine (T), cytosine (C) ou guanine (G)), liée à un sucre pentose, le désoxyribose, et à un groupement phosphate. Ces désoxyribonucléotides sont reliés entre eux par une liaison phosphodiester reliant l'extrémité 5' phosphate à l'extrémité 3'OH du pentose. La cohésion des 2 brins est assurée par des liaisons hydrogènes formées entre les bases complémentaires (A/T et C/G), appelées appariements de Watson-Crick. L'ADN forme ainsi une hélice de type B de 2 nm de diamètre et de 3,4 nm de pas, qui définit deux sillons, appelés grand sillon et petit sillon (**Figure 1**).

Quelques années plus tard, Francis CRICK formula le dogme central de la biologie moléculaire : « l'information génétique est transmise des acides nucléiques aux protéines, l'ADN n'étant que le support moléculaire d'une information qui s'exprime à travers les protéines ». (Crick 1970).

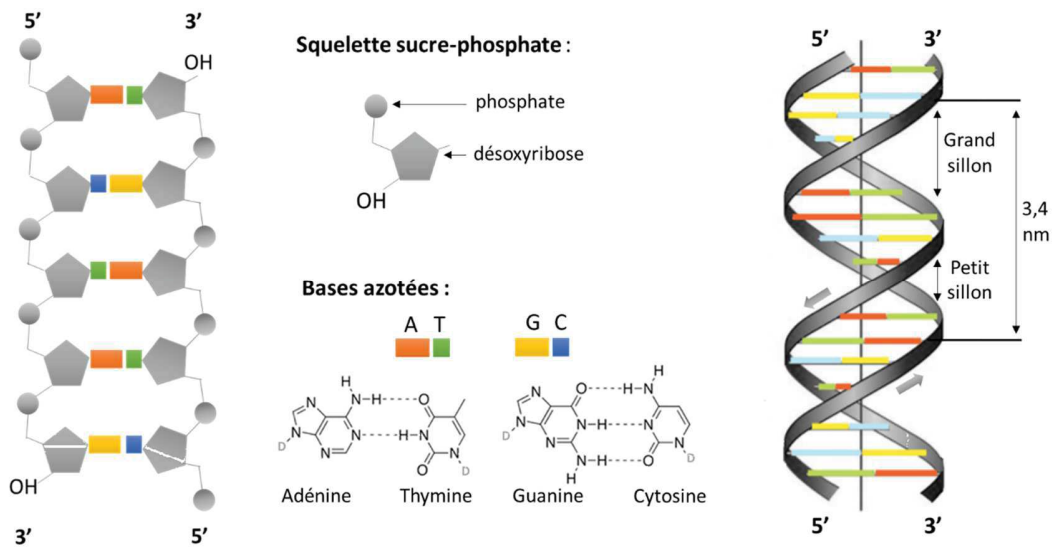


Figure 1 : Structure schématique de la double hélice d'ADN

(Panel de gauche) Structure moléculaire simplifiée mettant en avant les appariements de Watson-Crick.

(Panel de droit) Structure de l'hélice de type B

Adaptée du livre de S. Weinman et P. Méhul, *Toute la biochimie*, Dunod, 2004

Les travaux qui suivirent s'attelèrent au décryptage de ce code génétique. Ce dernier a été résolu en 1966 par NIRENBERG, KHORANA et HOLLEY. Les progrès ont été ensuite très rapides avec la naissance du génie génétique, mais également celle de grands projets de séquençage, comme le Human Genome Project, qui dans les années 2000 a permis l'obtention du premier séquençage de la partie euchromatique du génome Humain (Bentley 2000). Depuis, les génomes de nombreux organismes ont été séquencés, dévoilant leur organisation génétique et la complexité de leur architecture.

B. Organisation génomique sous forme de chromatine

Le génome Humain est composé de 3.2 milliards de paires de bases, ce qui correspond à plus de 2 mètres d'ADN. Le génome contient ainsi l'ensemble du matériel génétique, comprenant les séquences codantes (codant notamment pour l'ensemble des protéines de l'organisme, les ARN ribosomiques,...), ainsi que des séquences non codantes (promoteurs, séquences régulatrices, isolateurs, régions répétées, ARN non codants,...).

Ainsi, afin d'accommoder ces 2 mètres d'ADN, dans un noyau de 10 micromètres de diamètre, soit environ 200 000 fois plus petit, l'ADN est condensé sous forme d'une structure dynamique appelée chromatine.

C'est Walther FLEMMING qui fut le premier à utiliser ce terme en observant « une structure filamenteuse » lors de la division cellulaire, qui s'est avérée être les chromosomes.

Cette compaction de la chromatine est organisée et se fait par différents niveaux hiérarchisés, qui sont à la base de l'organisation tridimensionnelle de génome.

La compaction de la chromatine a de profonds effets sur la régulation et l'activité des gènes. En effet, la chromatine module l'accessibilité de l'ADN et restreint son accès aux différents effecteurs nucléaires. Ainsi, afin de réguler ces différents aspects et de répondre aux besoins des cellules, la chromatine est en constant remodelage et peut se trouver sous plusieurs formes dans les noyaux.

1. La chromatine, dans tous ses états

Le modèle classique de compaction de la chromatine utilisé dans les manuels scolaires est linéaire et est représenté sur la Figure 2. L'ADN est enroulé autour de protéines histones, formant ainsi une chaîne de nucléosomes, en collier de perles, de 11 nm. Le nucléosome sera détaillé dans la section 3. Cette chaîne se condense de plus en plus formant une fibre de chromatine de 30 nm, puis des fibres de 300 et 700 nm et pour finir les chromosomes mitotiques (Woodcock et Ghosh 2010) (Tonna et al. 2010). Le génome humain peut ainsi se représenter, sous sa forme la plus compacte, en 23 paires de chromosomes.

Traditionnellement, la chromatine se divise en deux territoires structurellement et fonctionnellement distincts : l'hétérochromatine et l'euchromatine.

L'euchromatine correspond à la forme la moins condensée de la chromatine et est transcriptionnellement active. Elle représente environ 4% du génome des mammifères et est principalement située dans des régions riches en gènes. L'euchromatine peut prendre la forme d'une structure en collier de perles de 11 nm (chaîne de nucléosome) (Olins et Olins 1974), comme montré dans la Figure 2 panel de droite. L'histone de liaison H1 est essentielle à la succession de nucléosomes formant cette fibre (Woodcock, Skoultchi, et Fan 2006). L'euchromatine est répliquée au début de la phase S, contrairement à l'hétérochromatine.

L'hétérochromatine correspond à une forme condensée de la chromatine. Elle est transcriptionnellement inactive, car l'ADN, compacté, est inaccessible aux ARN polymérases. Ainsi, la forme la plus compactée de la chromatine est le chromosome mitotique et sa forme la moins compactée la fibre de 30 nm (Figure 2).

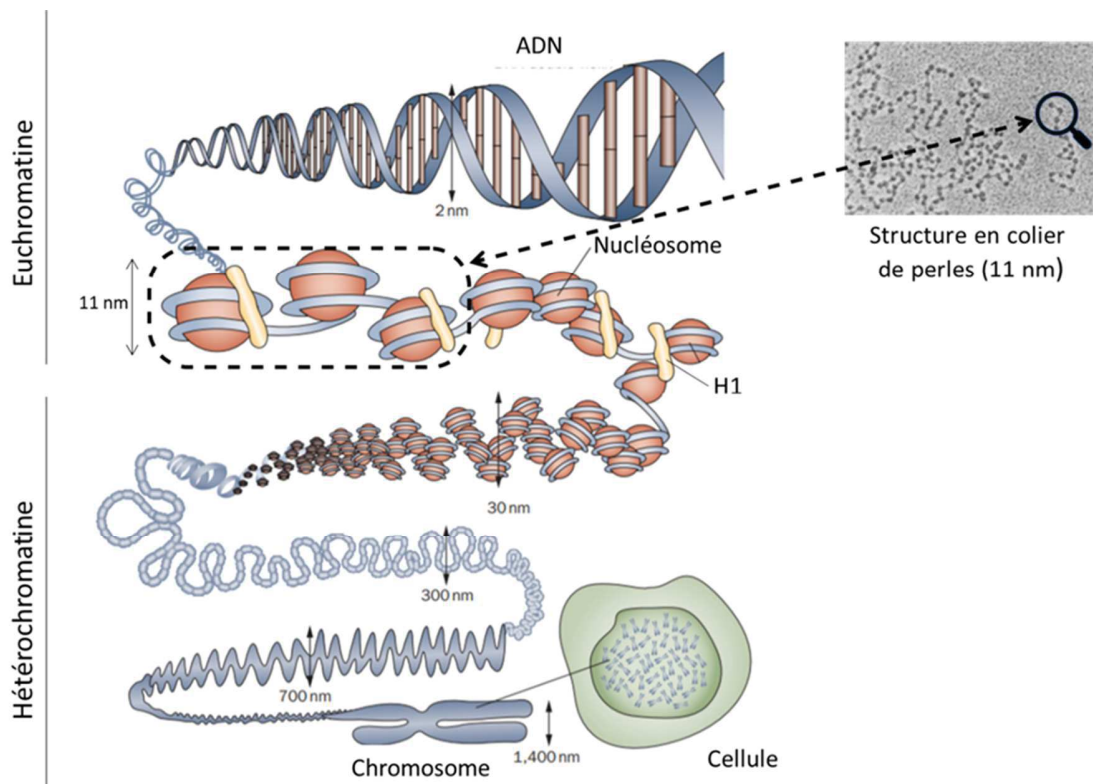


Figure 2 : Représentation schématique des niveaux de compaction de la chromatine
 Schéma adapté de (Tonna et al. 2010) et image de microscopie électronique adapté de (Thoma et Koller 1981).

Cette fibre de 30 nm reste cependant source de questionnements. Rarement observée *in vivo*, son existence en devient même controversée (Eltsov et al. 2008) (G. Li et Reinberg 2011) (Luger, Dechassa, et Tremethick 2012). En effet, dans de nombreuses études cette fibre de 30 nm n'est pas détectée dans le noyau eucaryote, où la chromatine semble former des chaînes irrégulièrement pliées, avec des caractéristiques en zigzag. Cette fibre semble cependant bien visible dans certaines cellules terminalement différenciées (Boopathi et al. 2020).

Actuellement deux modèles sont privilégiés pour cette fibre de 30 nm :

- un modèle *one-start* ou solénoïde, dans lequel les nucléosomes consécutifs sont agencés côte à côte et sont disposés selon une trajectoire hélicoïdale. L'ADN de liaison est replié vers l'intérieur de la fibre (Robinson et al. 2006).
- un second modèle, *two-start* où les nucléosomes sont arrangés en zigzag avec l'ADN de liaison qui reste droit, et adoptent également une forme hélicoïdale (Dorigo et al. 2004) (F. Song et al. 2014). Ce deuxième modèle est le plus soutenu récemment.

Des modèles mixtes ont également été proposés (Grigoryev et al. 2009).

Grâce à un filament contenant une succession de six nucléosomes, les travaux d'Isabel Garcia-Saez et de ses collaborateurs ont mis en avant une structure *two-start* plate, où les nucléosomes sont empilés uniformément à la manière d'une échelle. Un changement mineur dans l'environnement ionique permet une conformation torsadée/twistée de cette fibre, qui prend alors la forme d'une fibre 30 nm (Garcia-Saez et al. 2018).

Ces résultats, ainsi que les nombreux travaux effectués sur cette fibre, mettent en avant la plasticité de la chromatine en fonction du contexte dans lequel elle se trouve (Garcia-Saez et al. 2018) (Boopathi et al. 2020). Cela sera discuté plus en détail dans la section de « L'histone H1, le chromatosome et le nucléosome » p52.

Dans le noyau, l'hétérochromatine se situe principalement dans les régions périnucléaires et dans le nucléole. Il existe deux types d'hétérochromatine, l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative (Babu et Verma 1987).

L'hétérochromatine constitutive reste inaccessible tout au long du cycle cellulaire. Elle est localisée dans des régions dénuées de gènes et riches en séquences répétées. On la retrouve notamment dans les régions péri-centromériques et télomériques des chromosomes. Cette hétérochromatine est associée aux protéines HP1 (*heterochromatin protein 1*), qui sont enrichies au niveau des marques répressives, telles que H3K9me3 (tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3) (Lachner et al. 2001) (Janssen, Colmenares, et Karpen 2018).

L'hétérochromatine facultative, quant à elle, est réversible et peut se décondenser en euchromatine. Elle permet ainsi une régulation temporelle et spatiale de certains locis et donc de réprimer l'expression de certains gènes dans un contexte précis, comme par exemple en fonction du type cellulaire ou encore du stade de développement. Elle est notamment impliquée dans l'inactivation du chromosome X surnuméraire chez la femme ou encore la régulation des gènes homéotiques *Hox* (Żylicz et Heard 2020). D'un point de vue moléculaire, l'hétérochromatine facultative est régulée par les complexes *Polycomb* (PRC1 et PRC2), qui permettent la mise en place de la marque répressive H3K27me3 (Schwartz et Pirrotta 2008). L'activation de l'hétérochromatine facultative nécessite l'action d'une protéine kinase, inhibant l'activité de PRC1 (Aranda, Mas, et Di Croce 2015).

2. Organisation 3D du génome

Au cours de ces dernières années, les progrès technologiques, notamment le développement de microscopie à haute résolution et des techniques de capture de la conformation des chromosomes (Hi-C et 5-C), ont révélé que l'empaquetage du génome dans le noyau n'est pas

aléatoire, mais qu'il est structuré de manière hiérarchique et régulé dynamiquement, comme le montre la Figure 3 (Aranda, Mas, et Di Croce 2015).

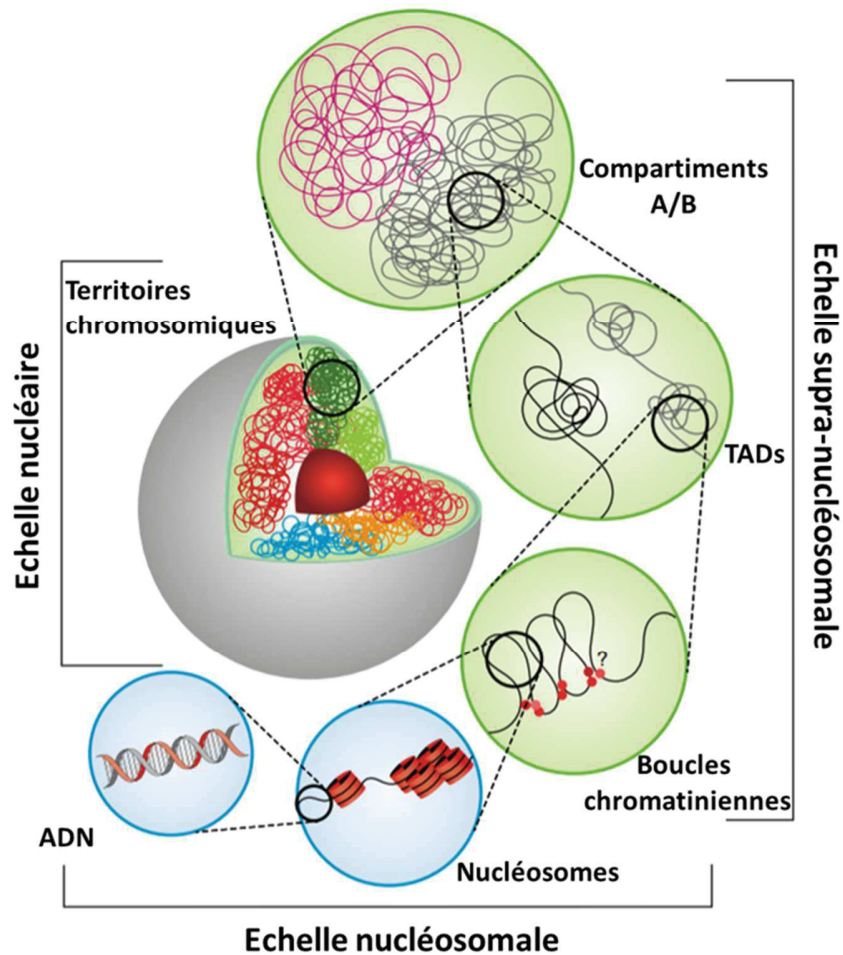


Figure 3 : Organisation 3D du génome
Adaptée de (Dogan et al 2018)

En effet, durant l'interphase, la fibre chromatinienne est capable de se lier aux lamines. Les chromosomes en interphase occupent des régions discrètes dans le noyau, appelées territoires chromosomiques ou CT (Cremer et Cremer 2001) (Cremer et Cremer 2010). A l'intérieur des CT, l'agencement des régions génomiques n'est pas aléatoire et est corrélé avec l'activité transcriptionnelle. Ainsi, les gènes transcriptionnellement actifs sont préférentiellement localisés en périphérie du CT (Zheng et Xie 2019).

Si nous passons à plus haute résolution, de l'ordre des mégabases, nous remarquons que ces territoires chromosomiques peuvent encore être divisés en compartiments, où des régions génomiques ayant des caractéristiques chromatiniennes similaires ont tendance à interagir entre elles. Ces compartiments, appelés "compartiment A" ("actif") et "compartiment B" ("inactif"), correspondent respectivement à des régions transcriptionnellement actives ou inactives. (Doğan et Liu 2018) (Zheng et Xie 2019).

Ces compartiments sont encore séparés en domaines topologiquement associés ou TADs, correspondant à des interactions longue distance de la chromatine ayant une taille moyenne de 1 Mb chez les mammifères (Aranda, Mas, et Di Croce 2015). Pour finir, on distingue au sein des TADs des boucles de chromatine. Ces boucles permettent de rapprocher ou d'éloigner des gènes et des éléments régulateurs, régulant ainsi l'activité transcriptionnelle. Chez les mammifères, les TADs sont généralement délimités par les protéines architecturales de la chromatine, telles que le facteur de liaison CCCTC (CTCF) et la cohésine (Zheng et Xie 2019).

3. Le nucléosome : élément fonctionnel de base de la chromatine

Comme nous venons de le voir, la chromatine est à la base de l'organisation 3D du génome. Cette chromatine est elle-même composée de nucléosomes, qui en sont l'unité fonctionnelle de base.

Le nucléosome est composé de protéines histones et d'ADN. Les histones canoniques, aux nombres de cinq, H1, H2A, H2B, H3 et H4, sont de petites protéines basiques, chargées positivement, qui interagissent avec l'ADN chargé négativement, afin de permettre sa compaction.

Le nucléosome cœur ou particule de cœur (*nucleosome core particle abrégé NCP*) est ainsi formé par 147 paires de bases (pb) d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones, qui est lui-même composé de deux dimères d'H2A/H2B et d'un tétramère d'H3/H4 (Luger et al. 1997).

a. Structure des histones (de) cœur(s)

Les histones de cœur, au nombre de quatre ; H2A, H2B, H3 et H4, sont extrêmement bien conservées au cours de l'évolution. Ces histones ont une structure tridimensionnelle conservée et sont composées, en leur centre, d'une région globulaire, appelée domaine histone ou *histone fold*. Cette région est flanquée de part et d'autre d'extensions N et C-terminales principalement flexibles mais contenant également des régions organisées, comme le montre le panel au centre de la Figure 4.

Ce domaine *histone fold* d'environ 70 acides aminés est composé de trois hélices alpha (α_1 , α_2 et α_3), séparées par deux boucles (L1 et L2). Les deux hélices les plus courtes α_1 et α_3 sont repliées sur l'hélice α_2 . Chaque histone peut alors interagir, via ce domaine, à son histone complémentaire créant un motif « en poignée de main » visible sur la structure des hétérodimères H3/H4 et H2A/H2B (Figure 4 : Composition). Les surfaces convexes de ces hétérodimères portent une forte charge positive qui constitue l'élément primaire de liaison à l'ADN (McGinty et Tan 2015).

L'assemblage du nucléosome *in vitro* se fait de manière séquentielle. Un tétramère H3/H4 est à la base de cet assemblage, sur lequel vient se fixer deux dimères de H2A/H2B, pour donner la formation de l'octamère canonique. Un ADN de 147 pb, qualifié d'ADN nucléosomal, s'enroule autour de l'octamère en formant 1.65 tours en hélice gauche (Richmond et Davey 2003).

Ainsi, il y a quatorze contacts entre l'octamère et le petit sillon de l'ADN, qui assurent la stabilité de la particule de cœur. Ces interactions ont lieu au niveau des boucles L1 et L2 des deux paires d'histones dans le motif en poignée de main (créant huit contacts au total). Il y a également quatre contacts grâce à l'interaction α_1 - α_1 de chaque dimère et les deux derniers contacts se font via l'hélice α_N de H3 (McGinty et Tan 2014). La particule de cœur ainsi formée peut être représentée sous la forme d'un cylindre de 13 nm haut et de 11 nm de large (sur la tranche).

Le nucléosome contient un pseudo axe de symétrie 2, appelé axe dyadique. Ce dernier est centré sur une paire de base appelée dyade. Les brins d'ADN entrant et sortant sont situés de part et d'autre de cette dyade. Les localisations d'ADN sont désignées par des localisations superhélicoïdales ou SHL (*superhelical locations*) représentant les tours superhélicoïdals/le pas hélical de l'ADN autour de l'octamère. La dyade correspond au SHL 0, on peut ainsi se repérer tout autour du nucléosome, allant de SHL1 -7 à SHL 7 correspondant au site d'entrée et de sortie de l'ADN (McGinty et Tan 2015).

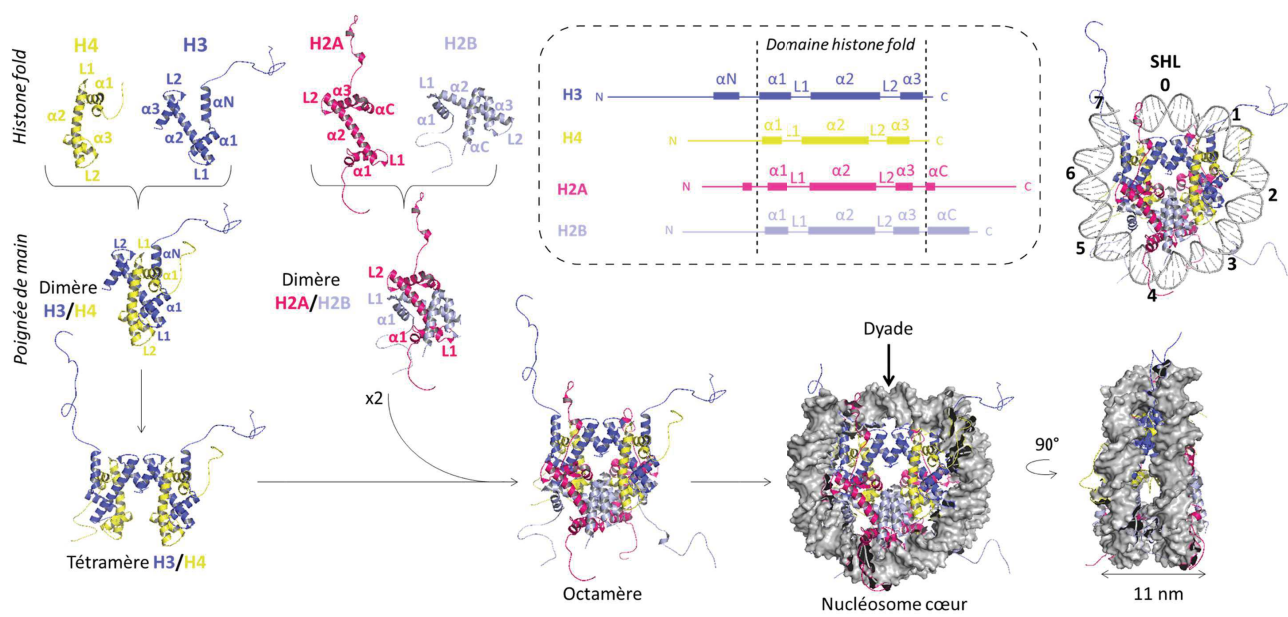


Figure 4 : Composition et assemblage *in vitro* du nucléosome de cœur
 Réalisé en utilisant le logiciel Pymol et la structure du NCP de *Xenopus laevis* (code PDB : 1KX5)

Les extrémités amino-terminales des histones, également appelées queues d'histones, sont des éléments principalement flexibles et peu structurés (dans le contexte de nucléosomes isolés). Ces queues, qui majoritairement dépassent de la particule cœur, sont riches en résidus chargés positivement, avec principalement des lysines (K) et arginines (R). Ces queues d'histones sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles ou PTMs, qui seront décrites plus en détail dans la section C de ce chapitre. H2A et H2B possèdent également une queue C-terminale, pouvant être régulée par des PTMs. Pour H2A, cette queue est d'environ 10 acides aminés, mais elle peut être plus longue pour certains variants. Ainsi, un nucléosome contient 12 queues, 8 queues N-terminales (une pour chaque histone) et 4 queues C-terminales (une pour chaque H2A et H2B).

Les queues N-terminales ont également un rôle crucial dans les interactions intra- et inter-nucléosomes. Elles permettent le maintien du nucléosome et la compaction de la chromatine. L'hélice amino-terminale de l'histone H3 interagit avec le haut de l'histone fold de H4, permettant l'organisation des sites d'entrée et de sortie de l'ADN. De même, pour l'hélice α C de H2B, qui s'intercale entre H2A/H2B et l'ADN à l'opposé de la dyade.

De plus, H2A possède dans son extension carboxy-terminale (α -C), un domaine d'amarrage. Ce domaine d'amarrage fait partie du patch acide de l'hétérodimère H2A/H2B (Luger et Richmond 1998). Ce patch acide est principalement formé par les résidus D56, D61, D64, D90, D91 et D92 de H2A, et les résidus D105 et D113 de H2B (Sundaram et Vasudevan 2020). Il est représenté sur la Figure 5.

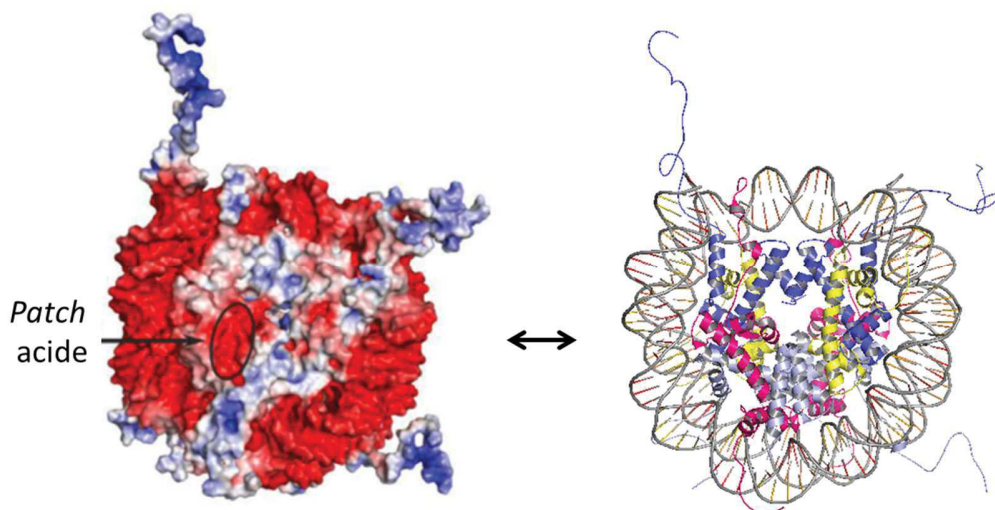


Figure 5 : Le patch acide de la particule de cœur
Echelle électrostatique -7 (rouge) à +7 (bleu) kT/e

Ce patch acide, chargé négativement dans un octamère globalement chargé positivement, est un *hot spot* pour l'interaction de partenaires protéiques liant la chromatine. Cette interaction se fait par l'intermédiaire d'une « ancre arginine » (*arginine anchor*) présente sur ces partenaires protéiques (McGinty et Tan 2015).

De plus, dans le cadre de la compaction de la chromatine, ce patch acide interagit avec les résidus basiques de la queue d'histone H4 d'un nucléosome voisin, permettant la stabilisation des interactions entre nucléosomes.

b. Séquence de positionnement

Les premières séquences d'ADN utilisées pour l'étude de la particule de cœur étaient des séquences génomiques mélangées et donc différentes. Elles provenaient de nucléosomes isolés à partir d'extraits cellulaires et de digestion de la chromatine par la MNase (*micrococcal nuclease*). Cependant, ces échantillons très hétérogènes ne permettaient pas l'obtention de structure à haute résolution. En effet, le nucléosome est capable de se fixer sur l'ensemble du génome, mais certaines séquences semblent avoir une affinité accrue pour l'octamère, augmentant alors la stabilité du nucléosome. Il s'agit de séquences de positionnement.

Dans un premier temps, des séquences naturelles de positionnement ont été utilisées, telles que le gène de l'ARN ribosomique 5S (R. T. Simpson et Stafford 1983), ainsi que l'ADN α -satellite humain répété au niveau de centromère, qui a permis de résoudre la première structure du nucléosome à haute résolution (2.8 Å) (Luger et al. 1997).

A partir des années 90, les premières séquences entièrement synthétiques ont été produites (Lowary et Widom 1998). Elles permettent une forte courbure de l'ADN, facilitant ainsi son enroulement autour de l'octamère d'histones. On retrouve dans ces séquences des motifs particuliers, qui apparaissent avec une périodicité proche de celle du pas hélical de l'ADN. Il y a ainsi une répétition des dinucléotides AA/TT/TA toutes les 10 pb. Cela permet de positionner ces dinucléotides au niveau du petit sillon de l'ADN en contact avec l'octamère. Inversement, les dinucléotides GG, GC et CG sont situés du côté du petit sillon, qui n'est pas en contact avec l'octamère.

La séquence synthétique la plus utilisée et celle considérée comme une référence est la séquence 601 ou Widom 601 contenant 147 pb et permettant l'assemblage du nucléosome de cœur. Elle possède cinq dinucléotides « TA » sur les huit positions au niveau du sillon mineur de l'ADN en contact avec l'octamère (SHL \pm 0.5, \pm 1.5, \pm 2.5, \pm 3.5). La présence de dinucléotides TA plus flexibles, en opposition aux dinucléotides GC, permet d'accommoder la pression liée à la liaison

des hétérodimères d'histones (via les boucles L1/L2 et les contacts $\alpha 1-\alpha 1$) aux groupements phosphates de l'ADN au niveau du petit sillon (McGinty et Tan 2015).

Il est également possible d'utiliser cette séquence en y ajoutant de part et d'autre de l'ADN de liaison plus ou moins long.

c. L'histone H1, le chromatosome et le nucléosome

Chaque nucléosome cœur est relié à son voisin grâce à l'ADN de liaison. Cet arrangement est répété tous les 200 ± 40 pb, en fonction du type cellulaire et du génome eucaryote considéré (McGhee et Felsenfeld 1980). On trouve typiquement ~ 20 pb de cet ADN de liaison en association avec l'histone de liaison H1 (également H5). L'histone H1 vient interagir avec l'ADN sur la dyade et aux points d'entrée/sortie de part et d'autre du nucléosome cœur. Le complexe nucléoprotéique ainsi formé, contenant le nucléosome cœur, l'histone de liaison H1 et ~ 167 pb d'ADN, est appelé le chromatosome (Robert T. Simpson 1978). Le chromatosome, avec le reste de l'ADN de liaison, forme l'unité répétitive fondamentale de la chromatine : le nucléosome. Par souci de simplification, dans la suite de cette thèse le nucléosome se référera souvent à la particule de cœur.

• L'histone de liaison H1

L'histone de liaison H1 est très différente des histones de cœur et ne contient pas de domaine *histone fold*. L'histone H1 possède au moins 11 variants chez les mammifères, pouvant être spécifiques d'un tissu donné ou d'un stade de développement (Bednar et al. 2017). L'histone H5 est un variant de l'histone H1 que l'on trouve chez le poulet.

L'histone H1 est composé de trois domaines :

- une région centrale globulaire, très conservée composée d'un domaine en « hélice ailée » (*winged-helix*).
- deux extrémités N- et C-terminales, moins conservées et non structurées. La queue C-terminale est étendue et extrêmement riche en lysine. Elle est sujette à plusieurs PTMs (Godde et Ura 2008).

Ces queues sont modérément conservées entre espèces et diffèrent également en fonction des variants, suggérant une fonction spécifique de ces variants (Izzo, Kamieniarz, et Schneider 2008).

L'histone de liaison H1 permet donc au nucléosome d'adopter une conformation plus compacte, en réduisant la flexibilité des deux brins de l'ADN de liaison et en les attirant ensemble, générant une asymétrie dans le nucléosome. Cette asymétrie est essentielle à la compaction de la chromatine et est générée par le domaine C-terminale (CTD) de H1, qui ne s'associe qu'à un seul des bras de l'ADN de liaison (Bednar et al. 2017).

- Différents modèles pour l'histone de liaison

Il existe à ce jour deux modèles de liaison pour l'histone de liaison, abrégée LH, influençant l'assemblage et la conformation de la chromatine d'ordre supérieur.

Ainsi, des chromatosomes ayant différentes histones de liaison et différentes longueurs d'ADN de liaison ont été caractérisés (B.-R. Zhou et al. 2013) (B.-R. Zhou et al. 2015) (Bednar et al. 2017) (Jang et Song 2019). Cela a permis de proposer deux modèles de liaison différents de LH avec le nucléosome :

- un modèle *on-dyad* (ou symétrique)
- un modèle *off-dyad* (ou asymétrique)

Plusieurs études sont en faveur du modèle « *on-dyad* » : elles portent sur le domaine globulaire de l'histone de liaison (H5 de poulet, H1.0 de *Xénotopus*, H1.5 et H1.0b Humain) ou sur l'histone de liaison entière (H1.0b de *Xénotopus*) et ont été réalisées par crosslinking, par footprinting de l'ADN et combinées à des études structurales. Ce modèle est illustré sur la Figure 6, A et B. Au contraire, la structure résolue par spectroscopie résonance magnétique nucléaire (RMN) de H1 de drosophile et la structure cryo-EM de H1.4 humain provenant d'une succession de nucléosomes (tétranucléosomes) supportent le modèle « *off-dyad* », Figure 6, C et D (Sundaram et Vasudevan 2020).

Ainsi, dans le modèle *on-dyad*, le domaine globulaire de l'histone de liaison se lie à l'ADN au centre de la dyade et aux deux bras de l'ADN de liaison (Sundaram et Vasudevan 2020). Le domaine CTD, quant à lui, ne lie qu'un des deux brin (Bednar et al. 2017).

Pour le modèle *off-dyad*, le domaine globulaire de l'histone de liaison se positionne loin du centre de la dyade et ne se lie qu'à un seul des bras de l'ADN de liaison (Figure 6 E) (Sundaram et Vasudevan 2020). Ces différences de liaison ont des effets différents sur la chromatine d'ordre supérieur, qui sera plus ou moins condensée (Figure 6 F) (Sundaram et Vasudevan 2020) (Jang et Song 2019). Ces différences conduisent également aux divers modèles que nous avons vus précédemment pour la fibre de 30 nm (cf. partie « La chromatine, dans tous ses états » p43).

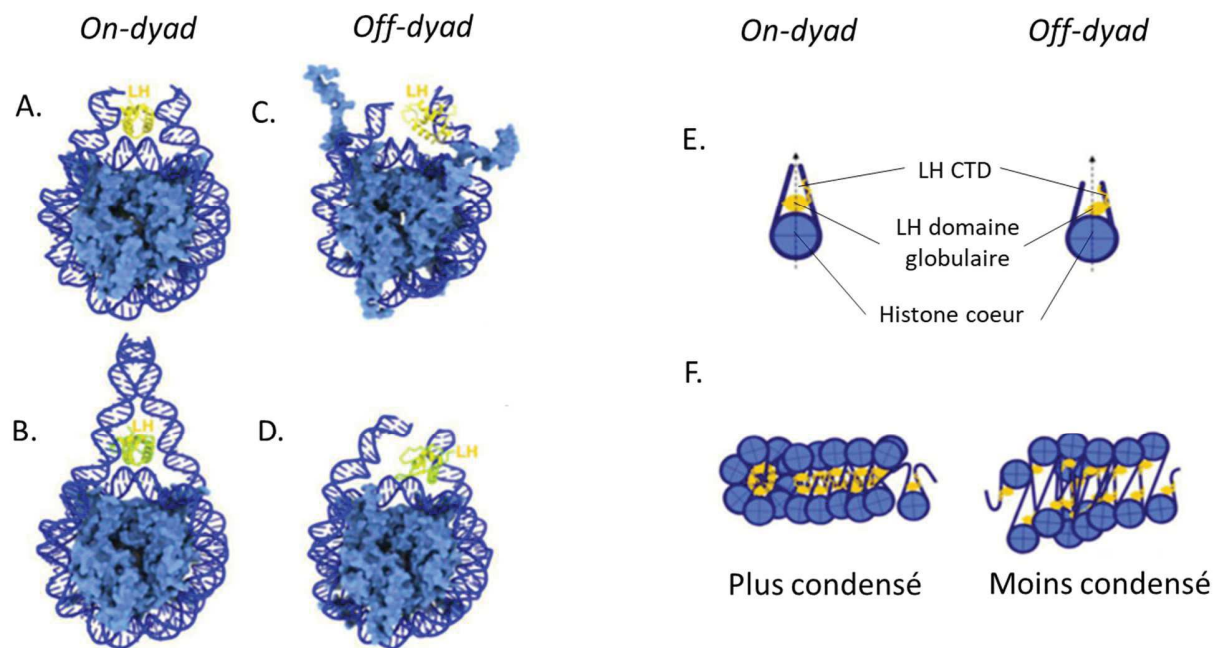


Figure 6 : Deux modèles pour l'histone de liaison

A. Structure cristallographique du chromatosome avec le domaine globulaire de H5 de poulet (code PDB : 4QLC)(B.-R. Zhou et al. 2015).

B. Structure cristallographique du chromatosome avec le domaine globulaire de xenopus H1 (PDB : 5NL0) (Bednar et al. 2017).

C. Structure RMN du chromatosome avec le domaine globulaire de H1 de drosophile (B.-R. Zhou et al. 2013).

D. Structure cryo-EM du chromatosome avec le domaine globulaire de H1.4 humain (F. Song et al. 2014).

E. Représentation schématique des deux modèles de liaison sur le chromatosome.

F. Représentation schématique de l'implication des deux modèles dans la formation de la fibre d'ordre supérieur.

Adaptée de (Sundaram et Vasudevan 2020).

L'architecture de la chromatine semble être sensible à un grand nombre de facteurs, comme la longueur de l'ADN de liaison, le type d'histone de liaison, les conditions ioniques, ... Cette structure peut également être régulée par différents effecteurs épigénétiques, notamment par la présence de PTMs, de variants d'histones ou encore de facteurs de remodelage de la chromatine. Ces effecteurs sont discutés dans la deuxième partie introductive.

II. Modulation épigénétique de la structure de la chromatine

A. L'épigénétique, l'au-dessus de la génétique

1. Définition

La notion d'épigénétique est utilisée pour la première fois au début des années 1940 par Conrad Waddington afin de décrire les changements graduels au cours du développement des animaux. Il introduit alors une nouvelle branche de la biologie, qui permet de comprendre la causalité entre le génotype, constituant héréditaire d'un organisme, et les différents phénotypes, correspondant aux caractéristiques visibles d'un organisme qui peuvent en résulter, nommés plus tard « épigénotypes » (Waddington 1942) (Waddington 2012).

L'épigénétique est alors restreinte à la description des processus développementaux et de différenciations cellulaires menant au développement d'un individu. Elle décrit le découplage entre la stabilité de l'information génétique, où toutes les cellules possèdent le même patrimoine génétique, et la variété des nombreux phénotypes observés, avec notamment la différenciation en centaines de types cellulaires, qui expriment ce même matériel génétique de manière très variée.

A partir des années 80 et 90, cette définition évolue et se complète notamment grâce aux travaux de Robin Holliday, qui ajoute la notion d'hérédité à cette définition (Holliday 1987). En 1994, ce dernier propose deux définitions de l'épigénétique (i) « L'héritage nucléaire, qui n'est pas basé sur des différences dans la séquence d'ADN » et (ii) « L'étude des changements dans l'expression des gènes, qui se produisent dans les organismes avec des cellules différenciées, et dans l'hérédité mitotique de certains motifs d'expression génique ». Ces deux définitions sont incomplètes lorsqu'elles sont prises séparément, mais couvrent tous les processus épigénétiques actuellement reconnus lorsqu'elles sont combinées (Deans et Maggert 2015). Au début des années 2000, Wu et Morris combinent ces deux définitions pour en faire une version plus actuelle. L'épigénétique est alors définie par « l'étude des changements dans la fonction des gènes, qui sont héréditaires de manière mitotique et/ou méiotique et qui n'entraînent pas de changement dans la séquence d'ADN » (C. -t Wu et Morris 2001). Aujourd'hui, bien que cette définition soit toujours acceptée, les progrès constants, avec notamment la compréhension du cycle cellulaire, mais également la découverte de la méthylation de l'ADN chez le mammifère (Hotchkiss 1948) et des modifications post-traductionnelles des histones et de leur rôle sur l'expression des gènes, ont fait évoluer notre définition de l'épigénétique vers une vision plus moléculaire.

2. Une vision moléculaire

De nos jours, l'épigénétique décrit alors les modifications réversibles et transmissibles qui permettent d'adapter l'expression des gènes sans changer la séquence en acide nucléique. Ces modifications sont des interrupteurs épigénétiques qui jouent un rôle primordial dans la dynamique de la chromatine, et dans tous les mécanismes nucléaires qui y sont associés, tels que la régulation de la transcription ou la réparation de l'ADN.

Il existe différents mécanismes épigénétiques impliqués dans cette régulation/modulation, comme décrit sur la Figure 7.

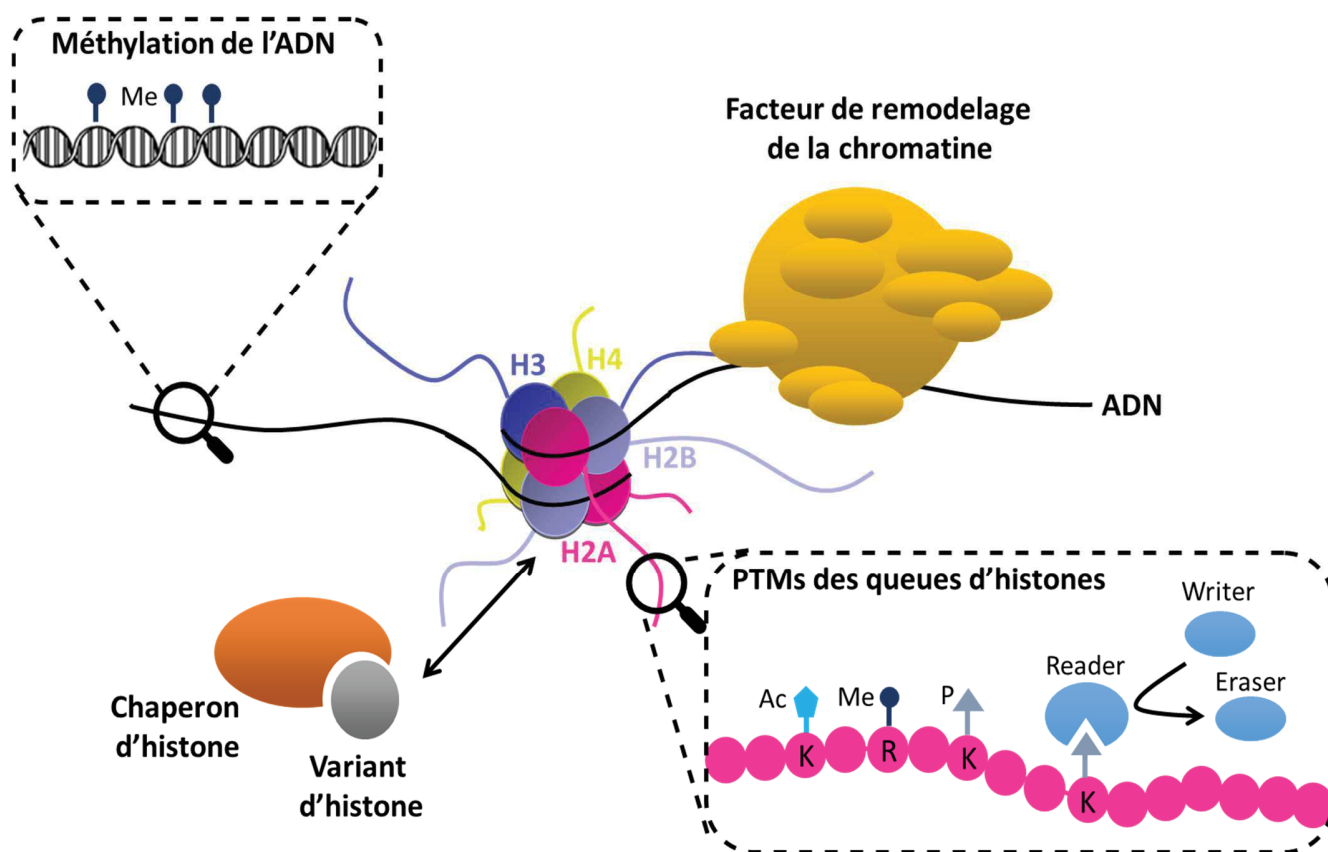


Figure 7 : Modulation de la structure de la chromatine par différents mécanismes épigénétiques

Ac : acétylation, Me : méthylation, P : phosphostylation, K : lysine, R : arginine.

En plus de l'organisation 3D du génome, il existe ainsi plusieurs moyens de réguler la structure de la chromatine (Felsenfeld et Groudine 2003) (Pande 2016) :

- **la méthylation de l'ADN,**
- **les modifications post-traductionnelles des queues d'histones,**
- **l'insertion de variants d'histones grâce à leurs chaperons spécifiques, qui remplace une ou plusieurs histones canoniques,**
- **le remodelage des nucléosomes/chromatine par des effecteurs épigénétiques ; les facteurs de remodelage de la chromatine,**
- **les ARNs non codants** (ne figurant pas sur ce schéma).

Ces différents mécanismes et effecteurs coopèrent les uns avec les autres, régulant la structure de la chromatine et les processus nucléaires, afin d'orchestrer l'expression des gènes de manière temporelle et spatiale. Ces modifications épigénétiques fournissent ainsi un niveau de régulation supplémentaire à la chromatine.

Ces modifications épigénétiques peuvent être ajoutées par des *writers* ou écrivains, lues par des *readers* ou lecteurs et effacées par des *erasers* ou effaceurs. Ces fonctions de *writers/readers/erasers* sont réalisées par des effecteurs et complexes épigénétiques, qui peuvent cumuler plusieurs de ces fonctions.

De nombreuses études se sont attelées à l'étude de ces marques épigénétiques sur le génome, nommé épigénome, en conditions physiologique et pathologique. Un exemple de cette démarche est le « International Human Epigenome Consortium (IHEC) » (<http://ihec-epigenomes.org/>), qui est un effort collectif international pour réaliser des cartes de référence de plus de 1000 épigénomes humains, incluant différents types cellulaires/tissus et des échantillons physiologiques, ainsi que pathologiques. Les résultats de ces études sont regroupés dans l'encyclopédie ENCODE (<https://www.encodeproject.org/>). Ils comprennent des informations sur la cartographie des protéines de liaison à l'ADN (les facteurs de transcription, les modifications des histones et les variants d'histones), la transcription des gènes, l'accessibilité de l'ADN, les protéines de liaison de l'ARN, la méthylation de l'ADN, le *timing* de la réplication, la structure tridimensionnelle de la chromatine et la structure des ARNs. Ces données et les technologies utilisées pour ces études sont présentées dans la Figure 8.

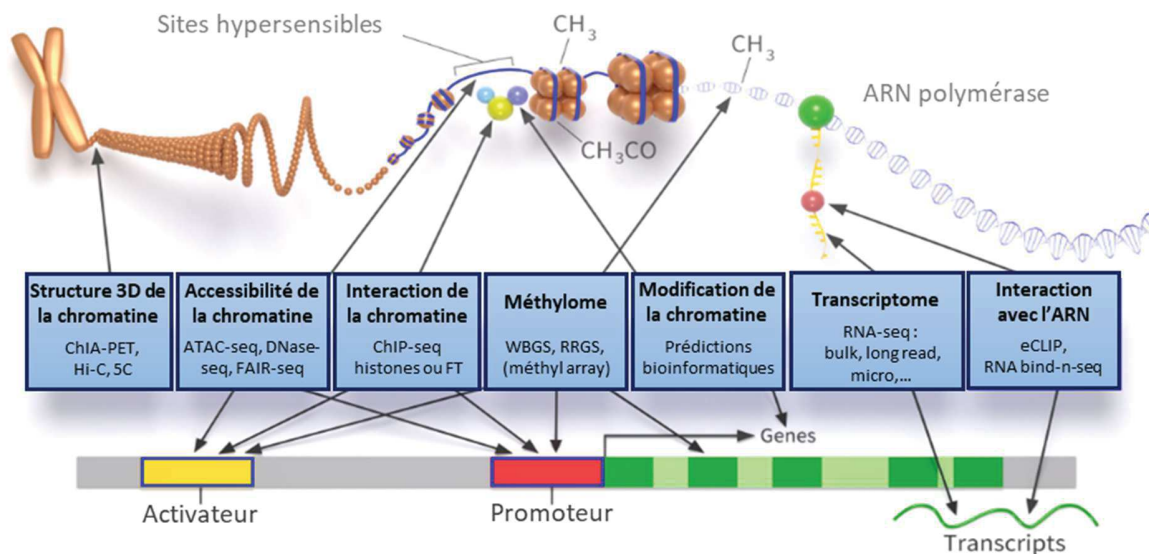


Figure 8 : Vision globale des mécanismes épigénétiques, des techniques utilisées et des informations disponibles sur le site ENCODE

Adaptée du site web d'ENCODE -juillet 2020- (<https://www.encodeproject.org/>) et de (Hesson et Pritchard 2019).

3. Dérégulation et épimédicaments

La modulation épigénétique contribue au développement et à l'homéostasie en permettant l'adaptabilité des organismes à l'environnement et en régulant les processus nucléaires majeurs. Elle est donc essentielle en condition physiologique.

Cette importance des mécanismes épigénétiques résulte de façon similaire en de nombreuses pathologies. Ainsi, la dérégulation de ces mécanismes épigénétiques est observée dans de nombreuses maladies, allant du cancer aux maladies inflammatoires, neurologiques et développementales (Tollefsbol 2018).

Afin de palier à ces dérégulations, la conception de médicaments modulant ces mécanismes épigénétiques a été proposée, il s'agit des épimédicaments. Les marques épigénétiques étant réversibles, les épimédicaments ont pour fonction de tenter de corriger les marques épigénétiques altérées dans la pathologie.

Contrairement aux mutations génétiques, qui ne peuvent être modifiées, la capacité de reprogrammer le paysage épigénétique de manière réversible dans l'épigénome du cancer est l'une des approches thérapeutiques les plus prometteuses (Furtado et al. 2019).

Actuellement, il existe deux types d'épimédicaments. Le premier cible la méthylation de l'ADN et comprend les inhibiteurs des ADN méthyltransférases. Le second cible la modification des queues d'histones et correspond aux inhibiteurs des déacétylases d'histones. Des inhibiteurs de méthyltransférase d'histone, sont également en cours de développement, mais n'ont pas encore été approuvés.

Cependant, le problème majeur de ces épimédicaments est leur manque de spécificité d'action. Il est lié à un manque de connaissances sur le large spectre d'action des mécanismes épigénétiques. Il est de plus en plus admis que ces modificateurs de chromatine affectent diverses classes de substrats, y compris des protéines impliquées dans les voies de signalisation et dans l'architecture cellulaire. Ces épimédicaments présentent donc principalement un intérêt pour des applications en oncologie car ils induisent la mort des cellules cancéreuses. Toutefois ils ont aussi des effets *off target* qui peuvent provoquer la mort des cellules saines et qui sont aussi à évaluer. Pour d'autres applications cliniques, une meilleure compréhension des mécanismes épigénétiques est nécessaire (Altucci et Rots 2016).

Il existe deux classes d'épimédicaments approuvées par la *Food and Drug Administration* (FDA), mais également en France par l'Agence Nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) :

- les inhibiteurs de l'ADN méthyltransférase (DNMTi), aussi appelés agents hypométhylants, tels que l'azacitidine (Vidaza®), utilisée pour le traitement du syndrome myélodysplasique et leucémie aigüe (SMD). Ce composé permet d'inhiber la méthylation de l'ADN en agissant notamment sur l'enzyme DNMT1 (cf. paragraphe « méthylation de l'ADN »). Cela conduit à un profil hypométhylé, entraînant la restauration de l'expression de gènes retrouvés silencieux dans de nombreux cancers, tels que les gènes suppresseurs de tumeurs.

- les inhibiteurs des déacétylases d'histone (HDACi), qui comprennent la majorité des composés approuvés par la FDA, y compris le premier médicament approuvé pour le traitement du cancer et plus précisément des lymphomes cutanés à cellules T, le Vorinostat® (2006). Ces composés sont ceux qui présentent les meilleurs résultats en termes d'indice de sélectivité et de toxicité.

Le Tableau 1 ci-après présente la liste des épimédicaments approuvés par la FDA et l'ANSM ainsi que leurs fonctions.

Tableau 1 : Liste des épimédicaments approuvés par la FDA

Adapté de (Furtado et al. 2019)

Nom commercial (composé(s))	Année d'approbation par la FDA	Approuvé par l'ANSM	Type d'épimédicament	Applications
Zolinza® (Vorinostat)	2006	Oui	HDACi	Lymphome cutané à cellules T
Vidaza® (Azacitidine)	2009	Oui	DNTMi	Syndrome myélodysplasique
Ixodax® (Romidepsin)	2009	Non	HDACi	Lymphome cutané à cellules T
Belodaq® (Belinostat)	2014	Oui	HDACi	Lymphome à cellules T périphérique
Farydak® (Panobinostat + Bortezomib + Dexamethasone)	2015	Oui	HDACi	Myélome multiple
Venclexta® (Azacitidine+ Decitabine)	2018	Oui	DNTMi	Leucémie myéloïde aiguë

Dans les prochains paragraphes, les différents mécanismes épigénétiques seront détaillés, ainsi que les effecteurs épigénétiques associés (liseurs, écrivains et effaceurs).

B. Méthylation de l'ADN

Chez les eucaryotes, la méthylation de l'ADN est considérée comme la 5^{ème} base de l'ADN. Elle correspond à l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone en position 5 d'une cytosine, créant ainsi une 5'-méthylcytosine (5-mC).

La méthylation de l'ADN est également retrouvée chez les procaryotes. Cependant, elle semble absente ou très faible chez *D. melanogaster*, *S.cerevisae* et chez de nombreux organismes invertébrés (Capuano et al. 2014).

La méthylation peut également avoir lieu sur les adénines en plus des cytosines, mais ce mécanisme est moins étudié notamment chez les eucaryotes. Dans ce paragraphe, nous nous concentrerons sur la méthylation des cytosines.

1. Writers

Cette modification est catalysée par les ADN méthyltransférases ou DNMTs. Les DNMTs sont des enzymes *writers* qui utilisent, comme donneur de méthyle, le co-facteur S-adenosyl-L-méthionine ou SAM, afin de le transférer sur la cytosine, comme le montre la Figure 9 (Bestor 2000).

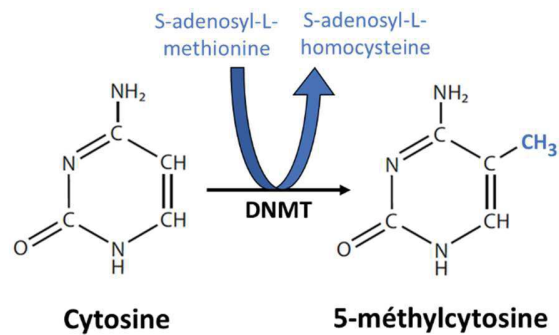


Figure 9 : Méthylation de la cytosine de l'ADN
DNMT : ADN Méthyltransférase, *writer* de la méthylation

Il existe plusieurs types de DNMTs qui contiennent toutes un motif cytosine méthyltransférase très conservé dans leurs domaines catalytiques. La DNMT1 est responsable du maintien de la méthylation après la réplication de l'ADN et agit préférentiellement sur les sites hémi-méthylés. Les DNMT3A et DNMT3B, quant à elles, agissent sur la méthylation *de novo*, elles amorcent la méthylation lors du développement, au stade embryonnaire, et établissent sur les sites non méthylés de nouveaux schémas de méthylation (Lyko 2018).

La méthylation de l'ADN est retrouvée principalement au niveau des dinucléotides CpG, qui correspondent à une cytosine (C) suivie d'une guanine (G). Chez l'homme et les mammifères, 70 à 80 % des CpG sont méthylés (Jabbari et Bernardi 2004) (Ziller et al. 2013). Les niveaux de méthylation de l'ADN varient considérablement à travers le génome humain, qui est divisé en domaines hyper- et hypo- méthylés. Cela est dû au fait que les dinucléotides CpG ne sont pas uniformément répartis dans le génome. Les dinucléotides CpG sont concentrés au niveau de régions appelées îlots CpG. Ces îlots sont définis comme des étendues d'ADN ayant une longueur d'au moins 200 pb et contiennent un pourcentage de GC supérieur à 50% et une fréquence élevée (~60%) en dinucléotides CpG par rapport au génome global (Gardiner-Garden et Frommer 1987).

Ces îlots CpG sont majoritairement situés dans les régions promotrices de gènes, mais également dans des régions d'ADN répétées qui sont réparties sur l'ensemble du génome. Dans le génome humain, 60 à 70% des promoteurs de gènes sont associés à des îlots CpG (Biswas et Rao 2017). La plupart d'entre eux sont non-méthylés et ainsi transcriptionnellement actifs. Il faut tout de

même noter que l'absence de méthylation n'entraîne pas une expression systématique du gène (Morris 2019). En revanche, l'hyperméthylation d'un promoteur au niveau d'un îlot CpG est généralement associée à un état transcriptionnellement inactif et à l'hétérochromatine (Jones 2012). Il en est de même pour les régions répétées et les éléments transposables. La présence de 5-mC régule les transposons, en supprimant leur transcription et leur mobilité (Schulz, Steinhoff, et Florl 2006).

La méthylation de l'ADN est donc en général liée à un état répressif, mais ce n'est pas toujours le cas. En effet, l'ADN peut également être méthylé, dans une moindre mesure dans les corps des gènes (*gene body*), qui sont alors associés à des niveaux élevés de transcription (A. Bird 2002).

2. Readers

La méthylation de l'ADN régule la transcription. Cependant, cette régulation n'est pas directe et implique une cascade d'effecteurs épigénétiques. En effet, les CpG servent de sites d'amarrage pour le recrutement de protéines contenant des domaines de liaisons au méthyl-CpG, qui sont qualifiés de *readers*. Il existe plusieurs familles de readers telles que la famille MBD, KAISO ou encore UHR (Morris 2019). Ces protéines permettent le transfert de l'information à d'autres effecteurs épigénétiques, afin de réguler l'expression du gène. Par exemple, les protéines de la famille MBD, comme MBD1 et MeCP2, vont reconnaître la méthylation de l'ADN et permettre de recruter, via leur domaine TRD (*transcriptional repression domain*), des déacétylases d'histones HDACs. Ces déacétylases permettent ensuite de retirer les groupements acétyles des queues d'histones (cf. partie 2), rétablissant alors une charge positive sur les lysines principalement et favorisant ainsi l'affinité entre les histones et l'ADN (Nan et al. 1998). Ces protéines MBD sont également capables de fixer des méthyltransférases favorisant la méthylation des queues d'histones au niveau local. Toutes ces modifications entraînent le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine et permettent l'augmentation de l'occupation des histones et la formation d'hétérochromatine. Ces protéines peuvent également agir en bloquant le recrutement de facteurs de transcription.

3. Erasers

La méthylation de l'ADN est un processus réversible et il existe deux processus principaux qui conduisent à la déméthylation de l'ADN. Le premier est la déméthylation passive, elle se fait lors de la réplication de l'ADN en absence ou avec une faible expression de DNMT1. Il en résulte tout d'abord des régions hémiméthylées puis, après plusieurs cycles de réplication, de l'ADN non méthylé. La deuxième est l'intervention de protéines *erasers* de la famille *ten-eleven*

translocation (TET). Cette famille se compose d'oxygénases qui catalysent la déméthylation de la 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), qui est ensuite convertie en 5-formylcytosine (5fC) et enfin en 5-carboxylcytosine (5caC). La 5fC et la 5caC sont alors reconnues par la thymine ADN glycosylase (TDG) et sont restaurées en cytosine par la réparation par excision de la base (BER)(C.-X. Song et He 2013).

4. Rôles clés et cancérogénèse

La méthylation régule d'importants processus biologiques. Comme cité précédemment, elle permet la régulation de la transcription et la répression des éléments d'ADN répétés. Elle affecte les modifications post-traductionnelles des queues d'histones et permet, par l'intermédiaire d'effecteurs épigénétiques, le remodelage de la chromatine. La méthylation de l'ADN permet également l'inactivation du chromosome X surnuméraire chez les femmes et est essentielle à l'empreinte génomique parentale (*imprinting*) (Furtado et al. 2019).

L'altération de la méthylation est associée à plusieurs pathologies et notamment aux cancers. Par exemple, une méthylation aberrante au niveau du promoteur peut entraîner une inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (comme BRCA1, BCL2) ou au contraire une activation de proto-oncogène (Sharma et al. 2009). De même, l'hypométhylation des éléments transposables, comme les LINEs, a été reliée à la cancérogénèse et aux métastases (Furtado et al. 2019).

C. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles (PTMs) des histones sont des modifications covalentes. Elles correspondent à la fixation de petits groupements chimiques ou de petites protéines. Ces modifications sont principalement situées sur les queues flexibles N- ou C- terminales des histones dépassant du nucléosome, mais peuvent également se trouver dans le corps globulaire des histones (Portela et Esteller 2010).

Les modifications les plus connues sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, mais il existe également une variété d'autres modifications plus atypiques, telles que la citrullination, l'ADP-ribosylation, la désamination, la formylation, la O-GlcNAcylation, la propionylation, la butyrylation, la crotonylation et l'isomérisation des prolines (Carlberg et Molnár 2018) (Tweedie-Cullen et al. 2012). Récemment, plusieurs autres modifica-

tions ont été découvertes comme la glutarylation, la lactylation, la benzylation, la palmitoylation, la sérotonylation, la dopaminylation, la glycation, la S-glutathionylation, la homocysteinylatation (Chan et Maze 2020).

Il existe ainsi plus de 15 modifications différentes, qui peuvent se retrouver dans plus de 130 sites sur les cinq histones canoniques (Carlberg et Molnár 2018). La Figure 10 illustre plusieurs de ces PTMs. La liste de PTMs et des enzymes pouvant modifier les histones s'accroît continuellement, montrant ainsi la complexité de cette régulation épigénétique.

En effet, ces PTMs d'histones influencent de différentes manières la conformation et l'architecture de la chromatine. Elles peuvent avoir un impact direct en modifiant les interactions entre les histones et l'ADN nucléosomique ou encore entre les nucléosomes adjacents (Steunou, Rossetto, et Côté 2014). Elles ont également un rôle indirect de signalisation au niveau de loci précis, car ces petites modifications sont des marques épigénétiques permettant le recrutement et servant de site d'amarrage pour d'autres effecteurs épigénétiques, tels que des facteurs de remodelage de la chromatine. Ainsi, les modifications des histones régulent des processus nucléaires fondamentaux, tels que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (Kouzarides 2007).

Des erreurs dans la régulation de ces PTMs d'histones peuvent altérer les schémas d'expression des gènes et ainsi provoquer des épi-mutations dans la chromatine impliquées dans de nombreuses maladies (Furtado et al. 2019).

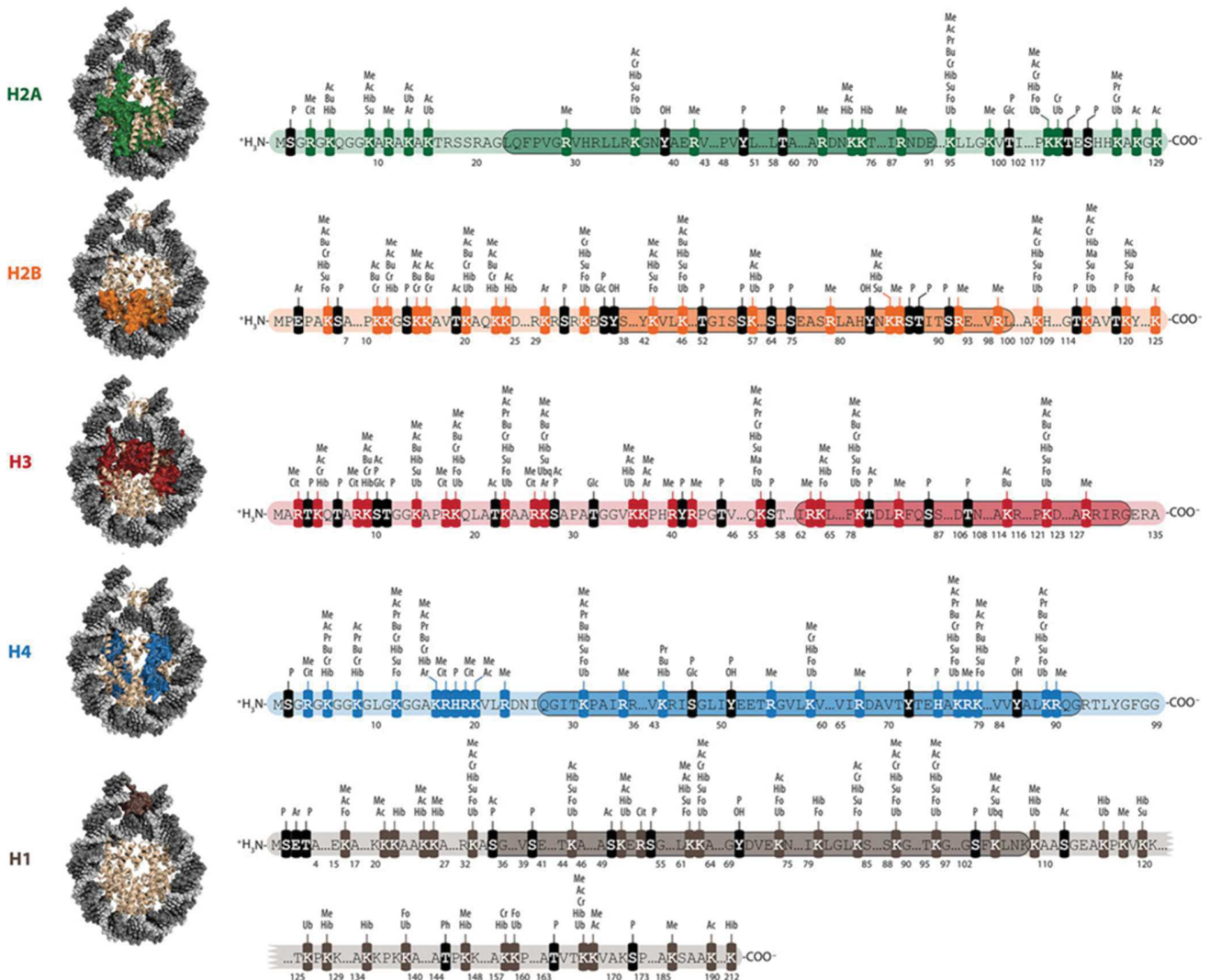


Figure 10 : Représentation schématique des PTMs d'histones.

Les parties surlignées correspondent à la partie globulaire (HFD) des histones.

Liste des acides aminés pouvant être modifiés : K = lysine; R = arginine; S = sérine; T = thréonine; Y = tyrosine; E = acide glutamique. Un même acide aminé ne peut avoir qu'une modification à la fois.

Liste des modifications : Me – méthylation (K, R); Ac – acétylation (K, S, T); Pr – propionylation (K); Bu – butyrylation (K); Cr – crotonylation (K); Hib – 2-hydroxyisobutyrylation (K); Ma – malonylation (K); Su – succinylation (K); Fo – formylation (K); Ub – ubiquitination (K); Cit – citrullination (R); Ph – phosphorylation (S, T, Y, H); OH – hydroxylation (Y); Glc – glycation (S, T); Ar – ADP-ribosylation (K, E)

Figure de (Carlberg et Molnár 2018).

Cette partie se focalise sur les modifications historiquement les plus étudiées, à savoir l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation, mais également l'ADP-ribosylation qui est importante pour la suite de ce manuscrit. Le Tableau 2 permet d'avoir une vision globale des différents acteurs impliqués dans l'établissement, la lecture et l'enlèvement des PTMs qui seront détaillés dans les prochains paragraphes.

Tableau 2 : Exemples de PTMs, de leurs acteurs et de leurs effets sur la chromatine.

Adapté de (Quénet 2018)

PTM d'histone	Résidus affectés	Effet(s) sur l'acide aminé	Writer	Eraser	Reader
Acétylation	K	Neutralisation de la charge positive	HAT	HDAC	Bromodomaine
Méthylation	K et R	Encombrement stérique et ajout d'hydrophobicité	HKMT et PRMT	KDM	Chromodomaine, domaine Tudor, domaine PHD, domaine MBT, domaine PWWP, domaine WD40,...
Phosphorylation	S,T,Y,et H	Addition d'une charge négative	Kinase	Phosphatase	14-3-3 et BRCT
ADP-ribosylation	E et K	Encombrement stérique et ajout de charges négatives	PARP	PARG, MacroD1/2, TARG1	Macrodomaine, domaine WWE, et PBZ

1. La phosphorylation des histones

La phosphorylation des histones correspond à l'ajout d'un groupement phosphate sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine. Cette modification est catalysée par les kinases (enzymes *writers*) qui permettent le transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP). La réaction inverse est catalysée par des phosphatases, les *erasers*. Ces kinases et phosphatases ne sont pas spécifiques aux histones et peuvent agir sur d'autres substrats. On

retrouve notamment les kinases AuroraB, MAPK1, PKC, MSK, ATM, ainsi que les phosphatases Glc7/PP1,... (J.-Y. Hsu et al. 2000) (Bannister et Kouzarides 2011).

La phosphorylation des histones permet d'ajouter une charge négative sur les résidus, modifiant les caractéristiques de la chromatine. Cela entraîne une réduction d'affinité entre l'ADN et les histones phosphorylées, mais également entre les nucléosomes. Elle permet également la formation de liaisons hydrogènes supplémentaires (North et al. 2011) (Taverna et al. 2007). La phosphorylation aide également à recruter différents effecteurs nucléaires. En effet, il existe deux types de *readers* qui peuvent lire et se fixer à ces histones phosphorylées. Il s'agit de protéines contenant des modules de liaison au phosphate (*phospho-binding module*), comme les domaines 14-3-3 et BRTC (Quénet 2018) (Yun et al. 2011).

La phosphorylation est impliquée dans de nombreux processus nucléaires comme dans la régulation de la transcription et notamment celle des gènes prolifératifs, tels que le facteur de croissance épidermique (EGF), mais également de proto-oncogènes tels que c-fos et c-myc (Rossetto, Avvakumov, et Côté 2012). La fonction la plus documentée de la phosphorylation des histones a lieu pendant la réponse cellulaire aux dommages causés à l'ADN. En effet, dans ce processus de réparation de l'ADN, la sérine 139 du variant d'histone H2A.X est phosphorylée et est alors appelé γ H2AX. Cette phosphorylation est réalisée par les kinases ATM et ATR et permet de délimiter de grands domaines autour du site de cassure de l'ADN, servant alors de signal pour le recrutement de la machinerie de réparation (Rossetto, Avvakumov, et Côté 2012) (Morrison et Shen 2005).

Le deuxième effet le plus documenté de la phosphorylation est son rôle dans la mitose. La kinase Aurora B est responsable de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10ph), qui est un marqueur essentiel à la condensation des chromosomes. Ainsi, la protéine de l'hétérochromatine HP1 est dans l'impossibilité de se lier au résidu adjacent du résidu phosphorylé, H3K9me2/3, via son chromodomaine (Fischle et al. 2005) (Hirota et al. 2005). Cette phosphorylation et l'élimination de HP1 initient la condensation de la chromatine pendant la mitose (Quénet 2018).

2. L'acétylation des lysines

L'acétylation correspond à l'ajout d'un groupement acétyle (Ac) sur le groupement ammonium des résidus lysines. Il s'agit d'une substitution nucléophile catalysée par des enzymes *writers*, les histones acétyltransférases (HAT), qui utilisent comme donneur d'acétyle le cofacteur acétyl-coA.

Il existe deux classes de HATs, les HATs de type A et celles de type B. Les HATs de type A acétylent les histones dans un contexte chromatinien. Chez l'Homme, il en existe 18 classées en trois groupes :

- MYST, nommée d'après les membres fondateurs, MOZ humain, Ybf2 et Sas2 de levure, et TIP60 chez les mammifères,
- GNAT (glycine-N-acyltransferase-like protein 1), avec les membres fondateurs Gcn5 et PCAF (p300/CBP-associated factor),
- EP300 (E1A-associated protein p300).

De nombreuses HATs fonctionnent dans de grands complexes multiprotéiques dans lesquels l'activité catalytique est dépendante des autres composants du complexe.

Par exemple, l'histone acétyltransférase humaine TIP60 (Tat interactive protein 60) existe dans un complexe du même nom composé d'au moins 16 protéines (et qui sera étudié plus en détail dans le chapitre 3). Ce complexe contient plusieurs mécanismes de reconnaissance par lesquels le complexe TIP60 est recruté à des sites spécifiques sur la chromatine (DesJarlais et Tummino 2016).

Les HATs de type B permettent l'acétylation des histones cytoplasmiques facilitant leur prise en charge et leur chargement au sein du nucléosome (Hodawadekar et Marmorstein 2007). Un exemple est l'acétylation de la lysine 56 de l'histone H3 (se trouvant dans le domaine globulaire de H3). Ce résidu est important pour la liaison des chaperons CAF-1 et Rtt109, qui permettent de déposer les histones nouvellement synthétisées (Giles et Taberlay 2019).

Il n'est donc pas surprenant que l'acétylation des histones joue un rôle régulateur essentiel dans tous les processus nucléaires majeurs, y compris l'expression des gènes, la réparation de l'ADN et la réplication (Steunou, Rossetto, et Côté 2014).

L'acétylation des histones est en général associée à une chromatine décompactée et transcriptionnellement active. Cette modification peut avoir un impact direct sur la chromatine, mais également un effet indirect de signalisation à des loci génomiques spécifiques (Steunou, Rossetto, et Côté 2014).

En effet, la présence de groupements Ac permet de neutraliser la charge positive des lysines, affaiblissant les interactions entre les histones et l'ADN (Bannister et Kouzarides 2011). Ce phénomène est d'autant plus marqué lorsqu'il y a co-occurrence de plusieurs acétylations sur des lysines consécutives et sur des nucléosomes consécutifs. Cette multi-acétylation est notamment retrouvée au niveau d'éléments régulateurs, tels que les *enhancers* ou les promoteurs en adéquation avec son rôle dans l'activation transcriptionnelle (Giles et Taberlay 2019).

L'acétylation, en décompactant ainsi la chromatine, permet également d'augmenter la proportion de chromatine disponible pouvant ainsi lier divers régulateurs transcriptionnels (Steunou,

Rossetto, et Côté 2014). De plus, le groupement acétyle est, lui-même, susceptible de créer de nouvelles interactions.

En effet, l'acétylation des histones est reconnue par des protéines contenant un bromodomaine, qui sont les *readers* de cette modification. Ces protéines permettent le recrutement de facteurs de transcription généraux et spécifiques permettant l'activation de la transcription. Ces bromodomains se retrouvent également dans plusieurs complexes de remodelage de la chromatine, tels que le remodeleurs SWI/SNF ou encore le complexe ISWI, facilitant la relaxation de la chromatine au niveau du site acétylé (Giles et Taberlay 2019).

La réaction inverse est catalysée par les histones déacétylases ou HDACs, qui sont des *erasers* de cette modification (DesJarlais et Tummino 2016). Les HDACs permettent le rétablissement de la charge positive des lysines, provoquant alors la compaction de la chromatine. Les HDACs sont donc des répresseurs transcriptionnels généralement présents dans de grands complexes multiprotéiques.

À ce jour, il existe chez l'homme 18 HDACs regroupées en quatre classes. Les classes I, II et IV sont les HDACs zinc-dépendantes et la classe III correspond aux sirtuines (Seto et Yoshida 2014).

3. Méthylation des histones

La méthylation des histones peut avoir lieu sur les résidus arginine et lysine. Les résidus lysine peuvent alors être mono-, di- ou tri- méthylés, tandis que les résidus arginines peuvent être mono- et symétriquement ou asymétriquement di- méthylés.

La méthylation des lysines est catalysée par les histone-lysine méthyltransférases (HKMTs), qui utilisent le S-adénosylméthionine (SAM) comme donneur de méthyle. La méthylation des arginines, quant à elle, est catalysée par la famille des protéines arginine méthyltransférases (PRMTs), qui utilisent également le SAM comme co-facteur.

Cette modification d'histones n'impacte pas la charge des acide aminés. Par conséquent, elle est moins susceptible de perturber la structure de la chromatine (Bannister et Kouzarides 2011). Cependant, la méthylation ajoute des groupements supplémentaires qui peuvent modifier la géométrie et ajouter un encombrement stérique ainsi que de l'hydrophobicité aux résidus. En fonction du nombre de méthylations, un même résidu peut avoir différentes fonctions dans la régulation de la chromatine (Quénet 2018). La méthylation est ainsi liée soit à la compaction, soit inversement à la relaxation de la chromatine, selon le résidu modifié et le nombre de méthyles ajoutés. Par exemple, les marques H3K9me et H3K27me sont associées à la répression de la transcription, alors que les marques H3K4me, H3K4me2 et H3K36me3 sont associées à l'activation de la transcription (Lawrence, Daujat, et Schneider 2016).

La première HKMT a été identifiée au début des années 2000 : il s'agit de la SUV39H1. Elle permet la méthylation de l'histone 3 lysine 9 (H3K9me) et est associée à la répression transcriptionnelle (Rea et al. 2000). Depuis, un ensemble de 60-96 HKMTs a été identifié par analyses phylogénétiques du génome humain, certaines d'entre elles étant toujours putatives. Les HKMTs sont très spécifiques tant sur la cible de la méthylation que sur le nombre de méthyles ajoutés (Xiao et al. 2003).

La méthylation des histones peut aussi servir de site d'amarrage à de nombreux *readers*. Il s'agit notamment des domaines Tudor et WD40 qui sont des *readers* communs à la méthylation des arginines et des lysines. Il existe également des *readers* spécifiques à la méthylation de la lysine tels que les homéodomains de plantes (PHD) ou les chromodomains (Giles et Taberlay 2019) (Quénet 2018).

Divers *readers* peuvent lire la même marque de méthylation et avoir des impacts différents. Par exemple, la marque H3K4me3 est reconnue par le domaine PHD des protéines ING permettant la répression génétique après une lésion de l'ADN, mais elle peut également être reconnue par les doubles chromodomains de CHD1 permettant alors d'assurer le remodelage de la chromatine. Pour finir, cette marque est aussi reconnue par les domaines tudor et PHD des déméthyltransférases permettant de retirer cette marque (DesJarlais et Tummino 2016).

La déméthylation est réalisée par des déméthylases de lysine (KDM). Il en existe deux types classés selon leur mécanisme d'action : les déméthylases spécifiques aux lysines (LSD) et les déméthylases Jumonji C (JMJC) (DesJarlais et Tummino 2016). La méthylation de l'arginine est la seule modification pour laquelle aucun *eraser* n'est véritablement connu à ce jour.

4. ADP-ribosylation

Les histones peuvent être mono- et poly-ADP ribosylées sur les résidus arginine et acide glutamique. Cette réaction est catalysée par la famille des poly (ADP-ribose) polymérase, aussi nommés PARP, qui transfèrent un groupe mono-ADP-ribose (ADPr) à partir du NAD⁺ (Bannister et Kouzarides 2011).

Chez l'Homme, il existe 17 protéines PARPs qui sont toutes capables d'effectuer la réaction d'ADP ribosylation, à l'exception des protéines PARP9 et PARP13 (Barkauskaite, Jankevicius, et Ahel 2015) (Quénet 2018). De plus, les PARP1 à 5 sont capables d'ajouter des unités d'ADPr supplémentaires pour générer de longs polymères de poly-ADP riboses (PAR) chargés négativement (jusqu'à 200 unités) (D'Amours et al. 1999).

La dégradation de l'ADP-ribosylation peut faire intervenir plusieurs activités enzymatiques qui sont les *erasers*. La poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) permet de couper la liaison O-glycosidique d'un ribose entre le premier ADP-ribose et la chaîne de PAR. Le mono-ADP-ribose final est ensuite clivé par les ADP-ribose hydrolases MacroD1 et MacroD2.

TARG1 (ADP-ribose glycohydrolase 1/C6orf130) est également une ADP-ribose hydrolase qui peut libérer soit une chaîne de PAR, soit le mono-ADP-ribose final par une attaque nucléophile (Quénet 2018).

Trois domaines *reader* reconnaissent et se lient à la chaîne de PAR : le poly(ADP-ribose)-binding zinc finger (PBZ), le domaine WWE et le macrodomaine (Barkauskaite, Jankevicius, et Ahel 2015). Le macrodomaine est présent dans de nombreuses protéines, dont PARP9/15, le variant d'histone macroH2A et le remodelleur CHD1L. Il est intéressant de noter que PARG, MacroD1, MacroD2 et TARG1 contiennent également un macrodomaine qui a évolué pour devenir leur site catalytique.

L'ADP-ribosylation a été corrélée à une chromatine relaxée. Cette chromatine décondensée est probablement une conséquence, du moins en partie, de la charge négative que la modification confère à l'histone (Bannister et Kouzarides 2011). L'activation de PARP-1 a également été corrélée à des niveaux élevés d'acétylation et donc à de l'euchromatine. Les quatre histones de cœurs ainsi que l'histone de liaison H1 peuvent être ADP-ribosylées.

Cette PTM est connue pour son rôle dans la promotion de la réparation des dommages de l'ADN (Martin-Hernandez et al. 2017). Au cours de ce processus, l'ADP-ribosylation conduit à la réorganisation de la chromatine, au recrutement de la machinerie de réparation et ainsi à la régulation de l'expression des gènes (Tallis et al. 2014). Il convient de noter que l'ADP-ribosylation se produit également en l'absence de dommages à l'ADN, ce qui suggère que cette PTM joue un rôle important dans des conditions physiologiques et pathologiques (Quénet 2018).

5. Le code histone

La modification des histones constitue un code complexe, appelé « code histone ». Cette dénomination a été proposée pour la 1^{er} fois en 2001 par Thomas Jenuwein et C. David Allis (Jenuwein et Allis 2001). Ce code démontre qu'il existe une inter-connexion sophistiquée entre les diverses PTMs présentées ci-dessus. En effet, toutes ces modifications forment un ensemble de signaux, marquant les différentes régions génomiques et permettant le recrutement de complexes de modification et de remodelage de la chromatine. Cette dynamique de la chromatine permet la régulation de l'expression génétique, ainsi que celle de la réplication de l'information génétique et d'autres mécanismes nucléaires tels que la réparation de l'ADN.

Le Tableau 3, ci-dessous, propose un « alphabet » de base du code histone, qui n'est pas exhaustif et qui représente les 12 marques d'histones les plus conservées (Carlberg et Molnár 2018).

En outre, l'analogie avec un alphabet suggère que les marques d'histone peuvent être combinées aux "mots". Seules quelques marques d'histones sont mutuellement exclusives. Par exemple, la marque H3R2me2 ne permet pas la méthylation de H3K4 et la phosphorylation de H3S10 empêche la méthylation du H3K9. Les modifications d'histones peuvent ainsi être combinées à un « texte » riche en informations sur l'état local de la chromatine (Carlberg et Molnár 2018).

Tableau 3 : L'alphabet du code histone

Liste non exhaustive - Adapté de (Carlberg et Molnár 2018).

Pour une review sur l'effet individuel des PTM se référer à (Lawrence, Daujat, et Schneider 2016).

Histone	Epi-marque	Co-marques conservées	Statut	Région génomique	Implication biologique
H3	K4me1	K27me3, K4me2	En position, mais inactive/ en pause (<i>poised</i>)	Activateur	
	K4me2	K4me3	Active	Régions régulatrices	
	K4me3	K4me2	Active ou en pause	Promoteur	Promoteurs bivalents
	K9me1		Active	Région transcrite (<i>gene body</i>) Activateur	
	K9me3		Répressive	Hétérochromatine au niveau des promoteurs et des activateurs	Séquences répétées (SINEs, LINEs, LTRs)
	K27ac	K4me1/2/3	Active	Activateur (K4me1/me2) ou promoteur (K4me2/me3)	H3K27ac marque les activateurs et les promoteurs
	K27me1		Active	Activateur	
	K27me3	K4me1/2/3	Répressive	Région réprimée (complexe polycomb) Promoteurs	Inactivation du chromosome X
	K36me1		Actives	Activateur	
	K36me3	K27ac, K4me1	Active	Région transcrite (<i>gene body</i>)	
H4	K20me1		Active	Région transcrite (<i>gene body</i>)	
	K20me3		Active ou en pause	Région régulatrice	

D. Les variants d'histones et chaperonnes associées

1. Les variants d'histones

a. Vision globale

Toutes les histones canoniques (H2A, H2B, H3 et H4) ont des variants qui peuvent les substituer au cours du cycle cellulaire. Ces variants d'histones remplacent les histones canoniques dans la formation des nucléosomes, apportant ainsi de nouvelles fonctionnalités, et de ce fait, un niveau de complexité supérieur à la chromatine.

En effet, bien que les variants d'histones soient connus depuis plus de 40 ans, de nombreuses incertitudes persistent et de nombreux variants restent encore à ce jour peu caractérisés.

Chez l'Homme, l'histone H2A possède le plus grand nombre de variants, dont certains sont relativement bien caractérisés. Parmi les plus connus, on distingue 8 variants : H2A.X, H2A.Z.1, H2A.Z.2.1, H2A.Z.2.2, H2A Barr body deficient (aussi connu comme H2A.Bbd ou H2A.B), macroH2A1.1, macroH2A1.2 et macroH2A2 (Buschbeck et Hake 2017). Il existe également des variants moins connus comme H2A.J (Contrepolis et al. 2017) ou encore des variants courts, tels que H2A.L, H2A.P et H2A.Q relativement proches de H2A.B et impliqués dans la spermatogénèse (X. Jiang, Soboleva, et Tremethick 2020) (Barral et al. 2017).

Alors que la plupart des variants d'histones sont exprimés dans les tissus somatiques de manière uniforme, certains se trouvent exclusivement ou principalement dans la lignée germinale mâle. C'est notamment le cas avec les variants de H2B. En effet, H2B a deux variants spécifiques aux testicules, H2BFWT (histone H2B type WT) et TSH2B (testis-specific histone H2B).

L'histone H3 possède deux variants couplés à la réplication H3.1 et H3.2. En plus de cela, six variants indépendants de la réplication ont également pu être identifiés ; H3.3, CENP-A (pour histone H3-like centromeric protein A), H3.1T, H3.5, H3.X et H3.Y.

Pour H4, jusqu'à récemment, aucun variant n'avait pu être identifié chez les eucaryotes supérieurs. Cependant de tels variants avaient été observés chez les eucaryotes inférieurs, tels que les Trypanosomes (Siegel et al. 2009) ou encore chez les chordés (Moosmann et al. 2011), laissant penser à l'existence d'un variant pour H4 chez les eucaryotes supérieurs (Buschbeck et Hake 2017). Ce n'est qu'en 2019 que le variant H4-G fut identifié (Long et al. 2019).

La Figure 11 présente les variants les plus décrits dans la littérature, leur architecture et leur pourcentage de conservation avec les histones canoniques, tout en tenant compte des variants somatiques et germinaux.

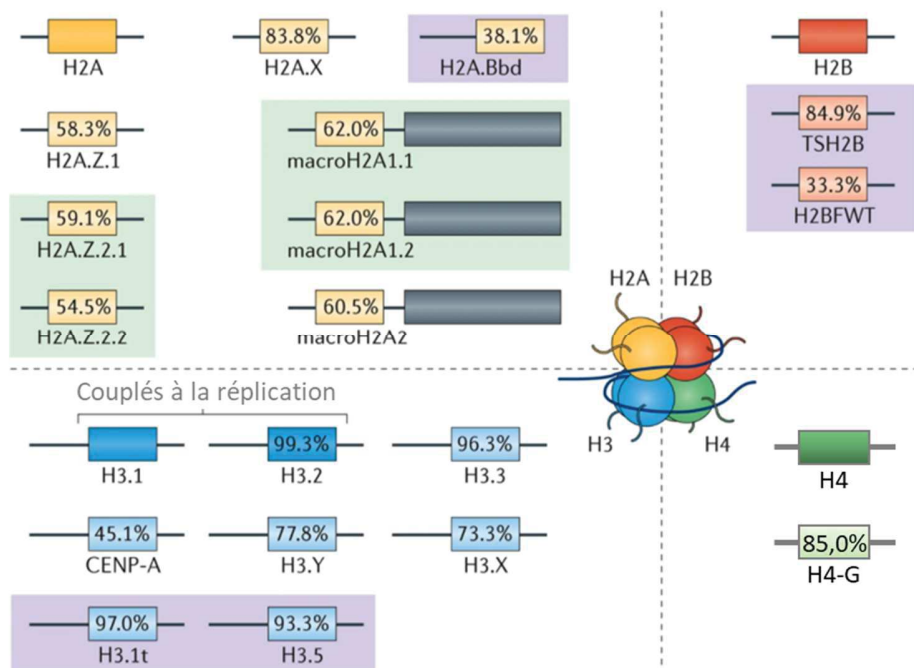


Figure 11 : Les variants d'histones et leur pourcentage d'identité avec les histones canoniques
 Représentation des histones canoniques et variants humains. Les rectangles représentent les régions centrales (HFD) et les lignes représentent les queues flexibles des histones. Les variantes d'histones spécifiques aux testicules sont mises en évidence par des boîtes violet clair et les isoformes d'épissage alternatif par des boîtes vert clair. Les pourcentages indiquent la conservation totale de la séquence d'acides aminés (% d'identité de la séquence) des variants par rapport à leurs homologues canoniques. Adapté de (Buschbeck et Hake 2017).

Ces variants d'histones peuvent ainsi se distinguer de leurs homologues canoniques par seulement quelques résidus ou par des régions ou domaines entiers. Leur homologie peut varier de plus de 97% à 33% pour le moins conservé (Buschbeck et Hake 2017).

Une synthèse des variants les plus étudiés historiquement et de leurs fonctions sera proposé dans le paragraphe suivant, la partie suivante étant consacrée aux différences majeures entre les histones canoniques et variants.

b. Variants d'histones vs histones canoniques

Les histones canoniques sont couplées à la réplication, c'est-à-dire qu'elles sont dépendantes du cycle cellulaire et que leur synthèse ne se fait que durant la phase S. Cela va permettre, lors de la réplication de l'ADN, le recouvrement de la molécule d'ADN néosynthétisée, la formation de

nouveaux nucléosomes et le maintien de l'organisation chromatinienne (Szenker, Boyarchuk, et Almouzni 2014).

Afin de rendre cela possible, les gènes codants pour les histones canoniques sont localisés sous forme de cluster en de nombreuses copies sur les chromosomes 1 et 6 chez l'Homme. Le plus long de ces cluster/tandems est HIST1 situé sur le chromosome 6. Il contient 55 gènes d'histones, ce qui permet de générer des quantités égales des quatre histones cœur et ainsi de former de nouveaux nucléosomes. Ainsi chaque histone conventionnelle est présente dans le génome avec 10 à 20 gènes, codant chacun pour une séquence d'ARNm unique (Marzluff et al. 2002).

La synthèse des variants est quant à elle indépendante de la réplication et permet une incorporation tout au long du cycle cellulaire. Les variants d'histone peuvent ainsi assurer le *turnover*, l'échange et la déposition *de novo* d'histones durant les processus cellulaires qui nécessitent une éviction temporaire, tels que la transcription (Probst, Desvoyes, et Gutierrez 2020).

Les variants d'histones sont non-alléliques et sont encodés en général par une copie unique ou deux copies se situant sur des chromosomes distincts dans le génome (Kamakaka et Biggins 2005). De ce fait, les histones canoniques sont abondantes et largement majoritaires dans la cellule. Tous les variants confondus représentent généralement moins de 10 % des histones totales, mais cette proportion peut atteindre 50 % dans les cellules différenciées.

Cette abondance des histones canoniques peut également s'expliquer par leur structure. En effet, ils sont composés d'un exon unique et la terminaison de leur ARNm se fait par une structure en épingle à cheveux, ce qui permet une transcription et une traduction rapide durant la phase S (Marzluff, Wagner, et Duronio 2008) (Henikoff et Smith 2015).

Encore une fois, les variants d'histones ne respectent pas ce schéma, leurs pré-ARNms peuvent contenir des introns. Ils sont donc en mesure de subir des épissages alternatifs (comme pour macroH2A ou H2A.Z) et leurs ARNm sont polyadénylés (Rasmussen et al. 1999) (Marzluff et al. 2002).

Une autre différence notable se situe au niveau de l'évolution de ces protéines. Les histones canoniques de cœur ont une évolution très lente et font partie des protéines les plus conservées. Cependant certains variants évoluent très rapidement, en particulier ceux associés à la lignée germinale comme H2A.Bdb et les variants de H2B (Talbert et al. 2012). De plus, de nombreux variants présentent un degré de variation élevé inter-espèces, au contraire des histones conventionnelles (Talbert et al. 2012).

c. Des rôles spécifiques mais pas sans chaperons

Ces variants possèdent donc des propriétés distinctes de celles des histones canoniques, qui peuvent influencer les propriétés physiques et la dynamique des nucléosomes, et ainsi de la structure de la chromatine. Ces variants ont également une incorporation spatiale précise, tissu spécifique et locus spécifique. De même, ils peuvent être incorporés à différents moments du cycle cellulaire, créant par exemple des domaines spécifiques localisés dans la fibre de chromatine (Rossetto, Avvakumov, et Côté 2012). Cette incorporation sophistiquée est médiée par des chaperons d'histones qui peuvent leur être propres et les guider (Probst, Desvoyes, et Gutierrez 2020).

Toutes ces propriétés sont particulièrement importantes pour la régulation des processus nucléaires, tels que la transcription. Les variants d'histones façonnent ainsi le paysage chromatinien des régions codantes et des éléments régulateurs en soutien aux programmes de transcription spécifiques (Weber et Henikoff 2014).

2. Les chaperons d'histones

Le contrôle de la dynamique de dépôt et d'éviction, ainsi que le contrôle spatial et temporel des histones sont effectués par les chaperons d'histones et les complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP.

Ces chaperons sont ainsi capables d'escorter et de protéger les interfaces fonctionnelles des histones. Ils jouent ainsi un rôle dans leurs repliements, leurs oligomérisations, leurs modifications post-traductionnelles, leurs importations nucléaires, leurs stabilités, leurs assemblages et leurs localisations génomiques (Campos et Reinberg 2010) (Hammond et al. 2017) (Pritchard 2019). Ainsi il n'y a pas d'histones libres dans une cellule.

Bien que tous les chaperons d'histones partagent des caractéristiques communes, ils constituent un groupe diversifié de protéines avec peu ou pas de similarité de séquence et avec des propriétés structurelles et fonctionnelles distinctes (Hammond et al. 2017).

Ainsi, certains chaperons sont capables de discriminer les variants de leurs homologues canoniques, alors qu'ils ne diffèrent que de quelques acides aminés. D'autres chaperons sont moins spécifiques et leur interaction n'est pas exclusive, comme par exemple pour FACT (Facilitates Chromatin Transcription) qui peut s'associer à H2A/H2B, mais a également été retrouvé associé à H2A.X/H2B et même à macroH2A dans le cadre de son éviction (Hondele et al. 2013) (Piquet et al. 2018) (Z. Sun et al. 2018). FACT semble interagir au niveau de H2B et être ainsi relativement insensible à l'identité de H2A dans le dimère H2A/H2B (Hammond et al. 2017).

Il en est de même pour NAP1 (Nucleosome Assembly Protein 1) qui peut s'associer au dimère H2A/H2B mais également au tétramère (H3/H4)₂ et a également été retrouvé associé au variant H2A.B/H2B (Aguilar-Gurrieri et al. 2016) (Bowman et al. 2011) (Okuwaki et al. 2005). NAP1 semble ainsi lier les HFD de ces histones. D'autres chaperons sont capables de reconnaître des régions plus spécifiques comme par exemple le chaperon ASF-1 (Anti-silencing function 1) qui interagit avec le domaine de tétramérisation de H3/H4 et de H3.3/H4, pour ensuite les transférer à des chaperons spécifiques CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1) et HIRA (Histone Regulator A) respectivement (Hammond et al. 2017) (Buschbeck et Hake 2017). CAF1 est ainsi spécifique à H3/H4 et est impliqué dans la formation du tétramère (H3/H4)₂ (Buschbeck et Hake 2017).

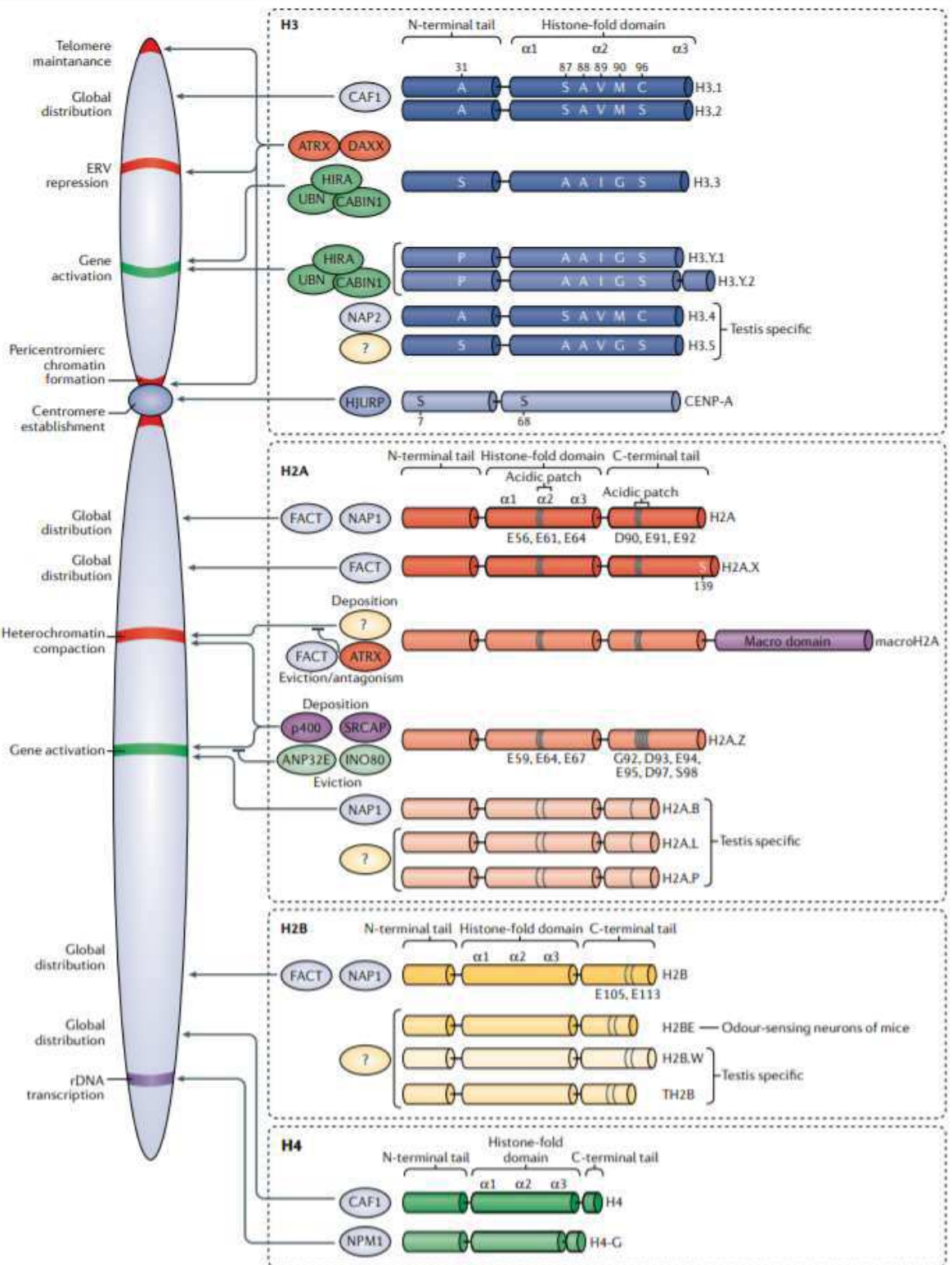
De plus, de nombreux chaperons de variants sont également hautement spécifiques, tels que DAXX (Death-domain associated protein) /ATRX (Alpha-Thalassemia X-linked mental Retardation) et HIRA pour H3.3 ou encore HJURP (Holliday Junction Recognition Protein) pour CENP-A (Martire et Banaszynski 2020), ou encore ANP32E (Acidic leucine-rich Nuclear Phosphoprotein 32 family member E) et YL1 (Vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog) pour H2A.Z qui seront vus en détail dans le chapitre 3.

Il existe également des relations de co-chaperonnage. En effet, les chaperons d'histones protègent les interfaces fonctionnelles des histones sans les recouvrir entièrement, la combinaison de deux chaperons permet donc une protection plus complète. C'est notamment le cas pour le complexe UBN1 (ubinnuclein-1) un composant du complexe HIRA, ASF1 et H3/H4. UBN1 protège les surfaces de H3.3-H4 se liant à H2A/H2B, tandis qu'ASF1 empêche la tétramérisation de H3.3/H4 (Hammond et al. 2017).

Divers chaperons, leurs histones ainsi que leurs localisations nucléaires sont décrits dans la Figure 12.

Les variants d'histones, ainsi que leurs chaperons respectifs seront discutés plus en détail dans la section suivante de catalogue des variants.

Le chaperonnage des histones solubles est ainsi un déterminant clé de la disponibilité et du devenir des histones. Il affecte tous les processus chromosomiques, y compris l'expression des gènes, la ségrégation des chromosomes et la réplication et la réparation du génome (Hammond et al. 2017).



Légende sur la page suivante

Figure 12 : Les histones canoniques et variants, leurs architectures, leurs chaperons et remodeleurs associés, ainsi que leurs distributions génomiques et implications fonctionnelles

Les résidus divergents clés entre les variants et la forme canonique sont représentés. Les PTMs les plus établies des variants sont également indiquées.

Abréviations: ANP32E, acidic leucine- rich nuclear phosphoprotein 32 family member E; ATRX, α -thalassaemia mental retardation syndrome X- linked; CABIN1, calcineurin- binding protein cabin 1; CAF1, chromatin assembly factor 1; DAXX, death domain- associated protein; ERV, endogenous retroviral element; FACT, facilitates chromatin transcription; HIRA, histone regulator A; HJURP, Holliday junction recognition protein; NAP, nucleosome assembly protein; NPM1, nucleophosmin; rDNA, ribosomal DNA; UBN, ubinuclein; SRCAP, Snf2- related CREBBP CBP activator protein

Source: (Martire et Banaszynski 2020)

3. Catalogue des variants

Dans cette partie, je me suis concentrée sur les différents variants d'histone, leurs distributions génomiques, leurs fonctions, mais également leurs chaperons ou complexes de remodelage associés ainsi qu'à leurs implications dans les cancers et autres maladies génétiques (Tableau 4)

A ce jour, la famille H2A est la plus grande famille de variants, suivie de celle de H2B. Il existe quatre types de variants de H2A : H2A.X, H2A.Z, macroH2A et les variants courts de H2A spécifiques aux testicules (H2A.B, H2A.L, H2A.P et H2A.Q) (Martire et Banaszynski 2020). La famille H2A est également la plus diversifiée d'un point de vue identité de séquences et sur le plan structural et présente de multiples fonctions biologiques (Talbert et al. 2012). Par exemple, macroH2A contient un macrodomaine additionnel en partie carboxy-terminale, alors que H2A.B n'a ni patch acide, ni hélice α C-terminale. Il est à noter qu'il existe également une base de données pour les variants d'histones : Histone DB 2.0 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/HistoneDB2.0/>).

Le chapitre 3 de ce manuscrit fournira plus de détails sur H2A.Z.

Tableau 4 : Les variants d'histones état de l'art - Tableau sur les deux pages suivantes

Adapté de (Martire et Banaszynski 2020) et de (Clapier et al. 2017)

ANP32E, phosphoprotéine nucléaire acide riche en leucine 32 membre de la famille E ; ATRX, α -thalassémie alpha liée à l'X avec retard mental ; CABIN1, protéine de liaison à la calcineurine cabine 1 ; CENP-A, protéine centromérique A ; DAXX, protéine associée au domaine de la mort ; FACT, facilite la transcription de la chromatine ; FHS, Syndrome de Floating-Harbor ; HIRA, régulateur d'histone A ; HJURP, protéine de reconnaissance de la jonction de Holliday ; NAP, protéine d'assemblage des nucléosomes ; ND, non déterminé ; DNAr, ADN ribosomique ; SRCAP, protéine activatrice de CREBBP liée à Snf2 ; UBN, ubinucleine. a, Encodé par deux gènes hautement apparentés. b, Présent chez divers mammifères, dont la souris, mais pas chez l'homme.

Histone core	Distribution génomique	Fonction générale	Chaperons et remodeleurs	Fonctions des chaperons et des remodeleurs	Associée aux cancers		Associée aux maladies génétiques humaines
					Dérégulation dans les cancers	Rôle dans les cancers	
Famille de H2A							
H2A.Z.1	Globale (régions régulatrices, hétérochromatine)	Liaison aux complexes régulateurs, dynamique de la chromatine	SRCAP (remodeleur), YL1 (chaperon)	Déposition de H2A.Z	Amplifications et mutations faux sens de fonctions inconnues	Expression d'oncogènes, croissance cellulaire, transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)	Syndrome de Floating-Harbour (FHS) /mutation de SRCAP
			INO80 (remodeleur), ANP32E (chaperon)	Éviction de H2A.Z, qui promeut les recombinaisons homologues			
			ANP32E (chaperon)	Éviction de H2A.Z, au niveau des lésions de l'ADN			
H2A.Z.2 (se présentant sous la forme de 2 isoformes d'épissage : H2A.Z.2.1 et H2A.Z.2.2)	Globale	Liaison aux complexes régulateurs, dynamique de la chromatine	YL1 (chaperon)	Déposition de H2A.Z	Amplifications et mutations faux sens de fonctions inconnues	Transcription de pro-oncogènes, prolifération cellulaire	Syndrome de Floating-Harbour (FHS) /mutation de SRCAP
			ANP32E (chaperon)	Éviction de H2A.Z			
macroH2A1 (se présentant sous la forme de 2 isoformes d'épissage : macroH2A1.1 et macroH2A1.2) et macroH2A2	Globale (hétérochromatine facultative et constitutive)	Extinction de gènes, compaction de la chromatine d'ordre supérieur	FACT (chaperon)	Éviction de macroH2A1	Répression transcriptionnelle, défauts d'épissage, amplification	Suppresseur de tumeurs par le maintien de l'hétérochromatine et de l'identité cellulaire	ND
			ATRX (remodeleur)	Régulation négative de la déposition de macroH2A1			
H2A.X	Globale (ensemble du génome)	Réponse aux dommages de l'ADN, remodelage de la chromatine	FACT (chaperon)	Déposition et échange d'histones	Mutation ou délétion	Suppresseur de tumeurs, par la prévention de l'instabilité du génome et des translocations d'oncogènes	Syndrome des cassures de Nijmegen de rupture de Nimègue, ataxie télangiectasie
H2A.B	Testicule, cerveau (euchromatine)	Déstabilisation des nucléosomes, transcription et épissage d'ARNm	NAP1 (chaperon)	Assemblage et dissociation de H2A.B	ND	ND	ND
H2A.L (avec plusieurs isoformes d'épissage possibles)^b	Testicules	Transition de l'histone à la protamine montrée pour H2A.L2	ND		ND	ND	ND

Famille de H2B							
H2B (également connue sous le nom de TS H2B.1)	Testicules	Transition entre l'histone et la protamine	ND		ND	ND	ND
H2B.W (également connu sous le nom de H2BFWT)	Testicules	ND	SWI-SNF (remodeleu)	Remodelage et mobilisation des nucléosomes	ND	ND	ND
Famille H3							
H3.3	Globale (éléments régulateurs de gènes actifs, séquences répétées et hétéro-chromatiques)	Activation de la transcription, dynamique de la chromatine	HIRA-UBN-CABIN1		Amplification et mutations faux sens (K27M, G34R/V/L et K36M) entraînant des substitutions d'acides aminés	Réponse transcriptionnelle à la signalisation pro-oncogène, dérégulation des états de la chromatine	ND
		Formation de l'hétérochromatine, stabilisation des télomères	ATRX-DAXX (remodeleur et chaperon respectivement)	Déposition sur l'hétérochromatine	Mutation faux sens (avec potentiellement une perte de fonction) à la fois dans ATRX et DAXX	Suppresseur de tumeurs par le maintien de la structure des télomères	α -thalassémie liée à l'X avec retard mental (mutation ATRX)
H3.Y.1 et H3.Y.2 (également connues sous le nom de H3.X)^a	Testicules, cerveau (euchromatine)	Activation de la transcription Régulation des gènes du cycle cellulaire	HIRA-UBN-CABIN1		ND	ND	ND
CENP-A	Globale (centromère)	Identité du centromère, stabilité du génome	HJURP (chaperon)	Déposition au niveau des centromères	Amplification ou surexpression	Mauvaise ségrégation chromosomique, instabilité chromosomique	ND
H3.4 (également connu sous le nom de H3T)	Testicules	Transition entre l'histone et la protamine	NAP2 (chaperon)		ND	ND	ND
H3.5	Testicules (euchromatine)	Transition entre l'histone et la protamine	ND		ND	ND	ND
Famille H4							
H4G	Globale, principalement dans le cancer du sein	Réglementation positive de la transcription d'ADNr	Nucléophosphamine		ND	Potentiellement oncogène	ND

4. Notion de code nucléosome

L'inter-connexion de toutes les modifications qui affectent le nucléosome, PTMs, variants d'histones ou encore méthylation de l'ADN nucléosomal, est à l'origine d'un code étendu et plus complexe que le code histone : le code nucléosome. La Figure 13 présente un exemple de cette signalisation complexe.

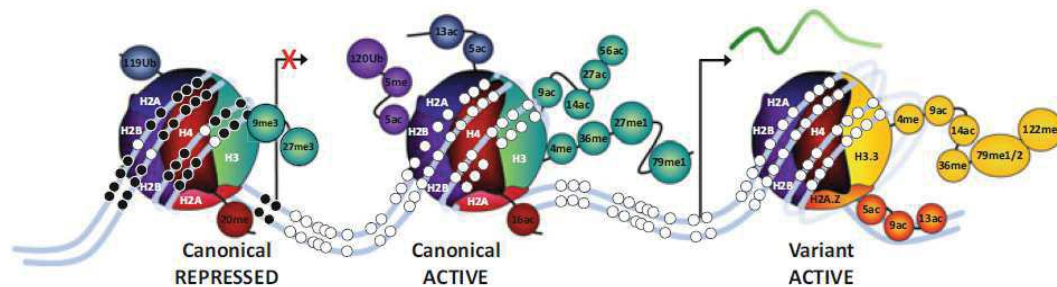


Figure 13 : Représentation schématique de la notion de code nucléosome

Source : (Giles et Taberlay 2019)

Toutes ces marques coopèrent entraînant la formation de nucléosome canonique réprimé ou actif (Figure 13 panel de gauche et au centre). Les nucléosomes sont marqués par des PTMs qui peuvent avoir plusieurs effets selon la nature de la modification et de l'acide aminé modifié. L'acétylation est une PTM qui engendre toujours une conformation plus accessible de la chromatine. En revanche, la méthylation de l'ADN a un effet opposé et est répressif. Les variants d'histones jouent également un rôle dans cette régulation complexe (Figure 13 panel de droite). De plus, plusieurs variants d'histones peuvent se trouver dans le même nucléosome. C'est notamment le cas du dimère variant H2A.Z/H3.3 connu pour son rôle dans la déstabilisation du nucléosome et son rôle dans l'activation transcriptionnelle (Jin et al. 2009).

Tous ces signaux du « code nucléosome » peuvent être lus et modifiés par les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants qui sont décrits dans la dernière partie de cette introduction.

E. Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants (remodeleurs)

Les remodeleurs s'ajoutent à la combinatoire complexe de la régulation de la chromatine. Présents chez tous les eucaryotes, ce sont en général de grands complexes multi-protéiques qui peuvent porter plusieurs fonctions de *reader*, de *writer* et d'*eraser*, à travers leurs différentes sous-unités.

Ces complexes de remodelage de la chromatine font partie de la superfamille SF2 et de la famille Snf2 des hélicases de l'ADN et de l'ARN dépendants de l'ATP (Bartholomew 2014). Cette famille Snf2 est encore divisée en quatre sous-familles :

- SWI/SNF (switch/sucrose non-fermentable),
- ISWI (imitation switch),
- CHD (chromodomain helicase DNA-binding),
- INO80 (*INO*sitol requiring 80).

Ces sous-familles ont été classifiées sur la base des différences et des similarités de leurs sous-unités catalytiques. Ces sous-unités catalytiques sont composées d'un domaine ATPase, mais également de domaines auxiliaires spécifiques (Clapier et Cairns 2009) (Clapier et al. 2017), comme le montre la Figure 14 A.

La famille SWI/SNF est ainsi caractérisée par la présence, dans sa sous-unité catalytique, d'un bromodomaine reconnaissant l'acétylation des lysines. Elle contient également un domaine HSA (helicase-SANT-associated) pouvant interagir avec des protéines associées à l'actine (ou ARP pour *actin related proteins*).

La famille ISWI contient des domaines régulateurs AutoN et NegC, ainsi qu'un domaine HANT SANT SLIDE, qui permet de reconnaître le nucléosome et l'ADN linker.

La famille CHD est, caractérisée par la présence d'un tandem de chromodomaines, reconnaissant la méthylation des lysines.

Pour finir, la famille INO80 est principalement caractérisée par une longue insertion dans la tête ATPase de sa sous-unité catalytique (Narlikar, Sundaramoorthy, et Owen-Hughes 2013).

Comme leur nom complet l'indique, ces facteurs de remodelage de la chromatine sont ATP-dépendants, cela signifie qu'ils utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour restructurer les nucléosomes et ainsi la chromatine.

Ces remodeleurs possèdent donc tous une sous-unité catalytique ATPase, aussi nommée domaine ATPase, tête ATPase ou ATP translocase (tr). Cette tête ATPase est elle-même composée de deux lobes *RecA-like*, appelés également lobe 1 et lobe 2.

Le domaine catalytique de la tête ATPase se situe à l'interface entre les deux lobes et est caractérisé par plusieurs motifs signatures allant de I à VI (Figure 14 - B). Les motifs contenant le plus haut niveau de conservation dans la famille SF2 sont ceux qui coordonnent la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Il s'agit des motifs I (P-loop) et II du lobe 1 et du motif VI (aussi appelé *arginine finger*) du lobe 2 (en rouge sur la Figure 14 - C). Les motifs Ia-c, IV, IVa, V, Vb, qui sont également répartis entre les deux lobes de la tête ATPase, sont impliqués dans la fixation à l'ADN (en bleu sur la Figure 14 - B). Outre la liaison à l'ADN, ces motifs sont susceptibles de participer à la communication entre l'ADN et les sites de liaison de l'ATP. Les motifs principalement impliqués dans cette coordination sont les motifs III et Va (en jaune sur la Figure 14- B) (Fairman-Williams, Guenther, et Jankowsky 2010).

La tête ATPase fixe et hydrolyse l'ATP, afin d'induire les changements de conformation au niveau des nucléosomes, régulant notamment l'expression génétique.

La plupart des remodeleurs sont spécialisés pour mener de préférence l'une des trois fonctions suivantes, qui sont également décrites dans la Figure 14 – C :

- assemblage et organisation des nucléosomes (ajout et déplacement de nucléosomes),
- accès à la chromatine (déplacement ou éjection de nucléosomes),
- édition des nucléosomes (dépôt ou éviction de variants d'histones) (Clapier et al. 2017).

Ainsi, l'occupation génomique et la composition des nucléosomes sont déterminées par des remodeleurs spécialisés (Bartholomew 2014) (Becker et Workman 2013) (Clapier et Cairns 2009) (Narlikar, Sundaramoorthy, et Owen-Hughes 2013). Ces remodeleurs sont des régulateurs essentiels de presque tous les processus nucléaires et leur dérégulation conduit à diverses maladies, dont le cancer (Clapier et al. 2017).

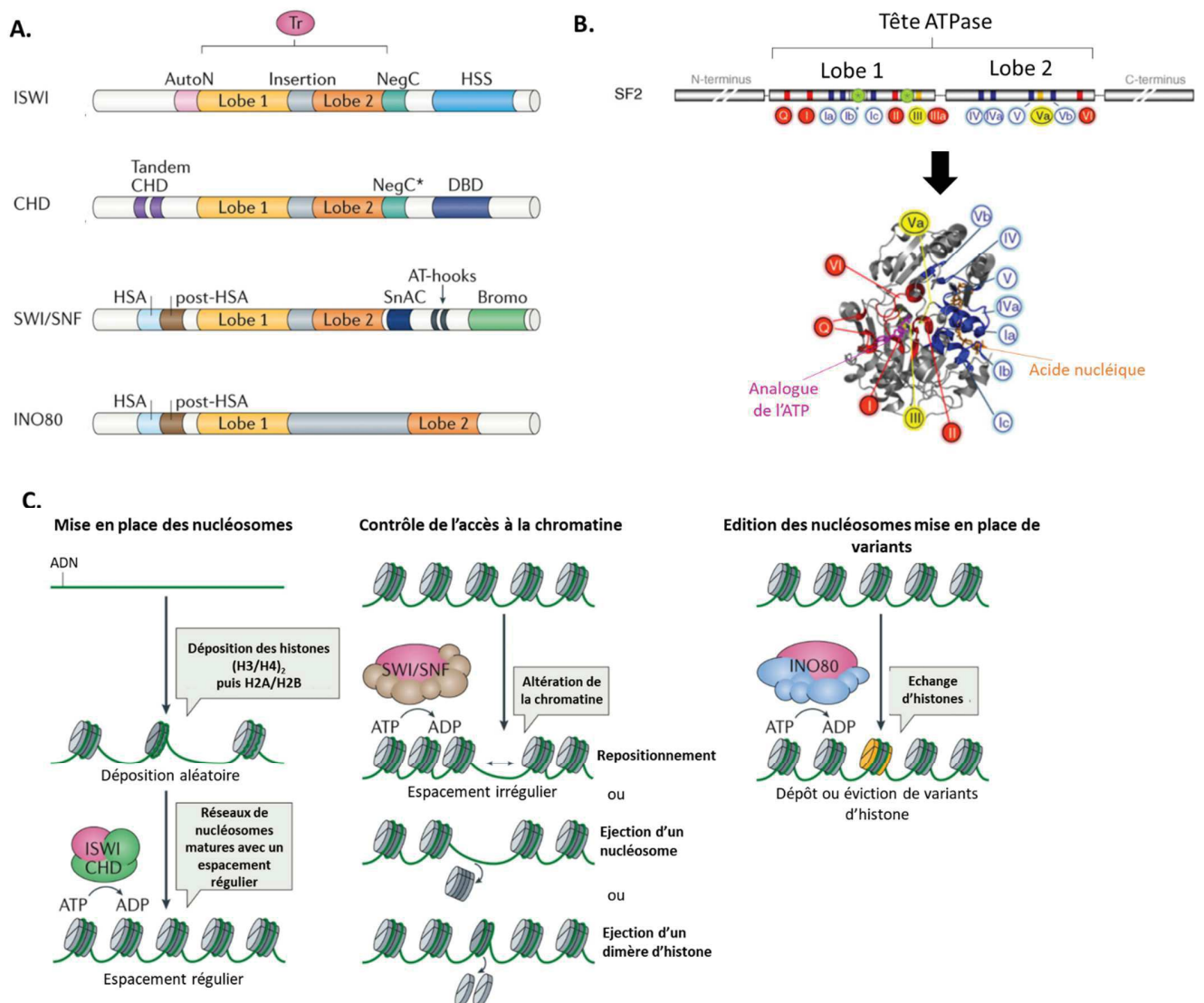


Figure 14 : Organisation des sous-unités catalytiques des différentes familles et mécanismes d'action des différents remodeleurs.

A. Représentation de la sous-unité catalytique de chaque sous-famille de remodeleur. Tr = domaine catalytique conservé.

B. Représentation schématique des motifs conservés dans la tête ATPase et de leur implication structurale sur la fixation et la coordination de l'ATP et de l'ADN

C. Schématisation des différents mécanismes d'action des remodeleurs. Les différentes familles de remodeleurs impliquées dans chaque processus sont indiquées. Cependant il s'agit d'un modèle simplifié, car tous les remodeleurs possèdent une activité de translocase permettant le repositionnement des nucléosomes et ainsi l'accessibilité de la chromatine.

Adapté de (Clapier et al. 2017) et de (Fairman-Williams, Guenther, et Jankowsky 2010)

1. SWI / SNF

a. Caractéristiques et composition

Le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF est très bien conservé et joue un rôle essentiel dans divers processus cellulaires, notamment la transcription et la réparation des dommages causés à l'ADN et ainsi le maintien du génome (C. Y. Zhou et al. 2016). Ce complexe hydrolyse l'ATP pour remodeler la structure de la chromatine, en glissant et en expulsant les octamères d'histones (Narlikar, Sundaramoorthy, et Owen-Hughes 2013) (Y. Han et al. 2020). Il est ainsi le principal remodeleur à l'origine de la régulation de l'accès de la chromatine.

La famille SWI/SNF est composée de deux complexes : SWI/SNF et RSC chez les levures et leurs orthologues BAF et PBAF humains (Clapier et Cairns 2009). Ces deux complexes sont de gros complexes multiprotéiques avec un minimum de 8 protéines, comme le montre le Tableau 5. La composition de ces complexes, tout en gardant la même base, peut également varier en fonction du type cellulaire.

Tableau 5 : Composition des complexes de SWI/SNF de levure et humain

Adapté de (Clapier et Cairns 2009)

	Organisme	Levure		Humain		
	Nom du Complexe	SWI/SNF	RSC	BAF	PBAF	
Famille SWI/SNF	Sous-unité ATPase	Swi2/Snf2	Sth1	hBRM ou BRG1	BRG1	
	Sous unités non catalytiques	Swi1/Ard6			BAF250/hOSA1	
						BAF180 BAF200
		Swi3	Rsc8/Swh3	BAF155, BAF170		
		Swp73/Snf12	Rsc6	BAF60 a,b ou c		
		Snf5	Sfh1	hSNF5/BAF47/INI1		
				BAF57		
		Arp7, Arp9		BAF53a ou b		
			β-actin			
	Unique	Swp82, Taf14, Snf6, Snf11	Rsc1 ou 2, Rsc3-5, 7, 9,10, 30, Htl1, Ldb7, Rtt102	BAF45 a, b, ou c, BCL7 a,b, ou c, SS18 ou CREST, BRD7 ou 9, PBRM1, BCL 11 a ou b		

b. D'un point de vue structural

De nombreuses études structurales ont été réalisées sur la famille SWI/SNF. Les premières structures ont décrit la sous-unité catalytique seule ainsi qu'en complexe avec le nucléosome. Les structures les plus récentes (2020) révèlent par contre l'architecture du complexe SWI/SNF composée de nombreuses de ses sous-unités sous forme apo ou lié à un nucléosome (Xia et al. 2016) (X. Liu et al. 2017) (Zhang et al. 2018) (Patel et al. 2019) (Wagner et al. 2020) (S. He et al. 2020) (Y. Han et al. 2020).

Le paragraphe suivant décrit deux structures clés, qui ont permis une meilleure compréhension de ce complexe au cours de ces dernière années.

Structure de la sous-unité catalytique de levure Snf2 complexée à un nucléosome :

La première structure correspond à la sous-unité catalytique de SWI/SNF de levure, Snf2, liée au nucléosome (Figure 15) (X. Liu et al. 2017). Il est important de noter que dans cette structure, les domaines HSA et bromodomaine de Snf2 ne sont pas définis.

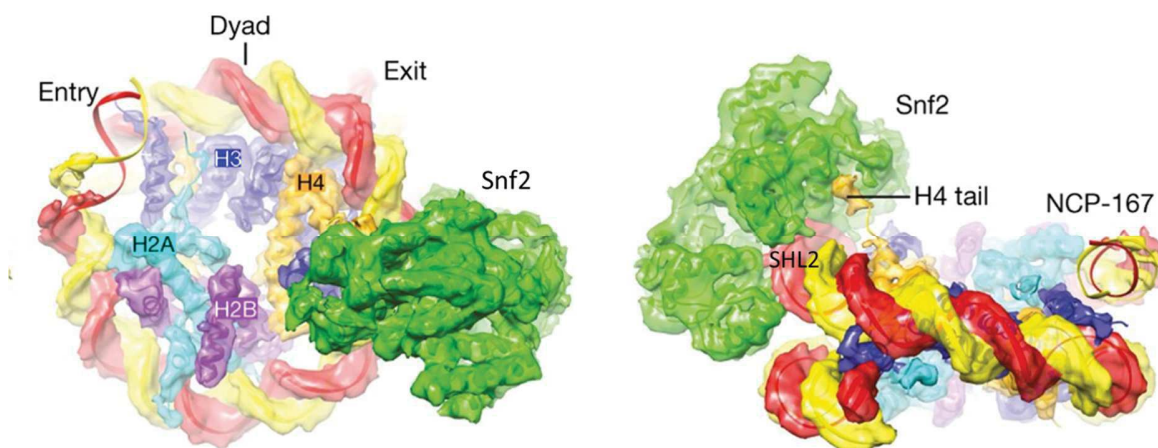


Figure 15 : Modèle cryo-EM de la sous-unité catalytique Snf2 de levure en complexe avec un nucléosome

Source : (X. Liu et al. 2017)

Snf2 est capable de lier le nucléosome au niveau du SHL +2, via sa tête ATPase. Les deux lobes du domaine ATPase de Snf2 forment alors une fente dans laquelle est placé l'ADN nucléosomal au niveau du SHL +2. La conformation des lobes de la tête ATP observée dans cette structure est différente de celle observée dans la forme apo (non décrite) avec une rotation de 80°. Cette rotation permet aux lobes de la tête ATPase d'adopter une conformation fermée active.

Snf2 interagit également au niveau d'une surface acide présente dans le lobe 2 de la tête ATPase avec la queue N-terminale de l'histone H4. H4 est essentiel à l'activité de remodelage, où il sert potentiellement d'ancrage, afin de permettre à l'ADN d'être déformé lors de l'hydrolyse de l'ATP et permettre sa translocation.

Ainsi, Snf2 déforme localement l'ADN nucléosomal au niveau du site de liaison SHL2, amorçant la réaction de remodelage (Sundaram et Vasudevan 2020) (X. Liu et al. 2017).

Structure du complexe SWI/SNF lié à un nucléosome :

Plus récemment, de nombreuses structures de complexe SWI/SNF lié au nucléosome ont été résolues. La structure la plus récente est celle de SWI/SNF de *Saccharomyces cerevisiae* lié au nucléosome et est visible dans la **Figure 16** (Y. Han et al. 2020).

Dans cette structure, le nucléosome est pris en sandwich entre la tête ATPase et le module de base est composé des sous-unités Snf12, Snf5, Swi3, Swi1 de SWI/SNF. La tête ATPase de SWI/SNF est reliée au module de base par les protéines ARP et le domaine HSA du corps catalytique Snf2, formant une longue insertion permettant de relier tous les modules (en orange sur la **Figure 16**). Une interaction est également observée entre Snf5 et le patch acide du nucléosome. Snf5 pourrait ainsi servir d'ancre moléculaire lors de la translocation (Y. Han et al. 2020).

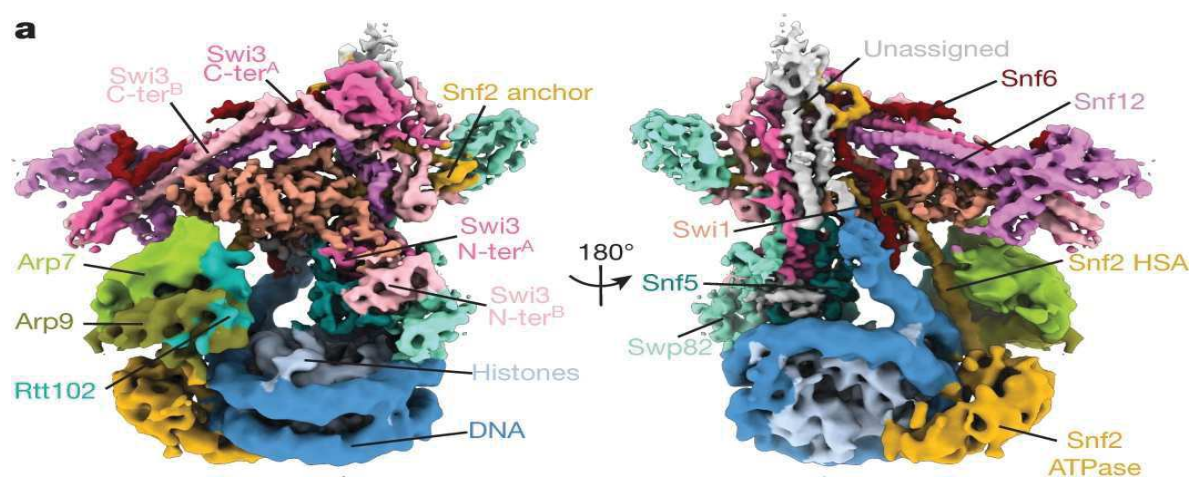


Figure 16 : Modèle cryo-EM du complexe SWI/SNF de levure en complexe avec le nucléosome en présence d'ADP-BeFx

Source : Han 2020

Cette structure a permis de proposer le modèle de translocation suivant : Snf2 lie le nucléosome grâce à sa tête ATPase au niveau du SHL +2 et grâce à son domaine HSA au niveau du SHL+6. Le bras du complexe SWI/SNF, avec notamment Snf5, interagit avec la surface des nucléosomes au

niveau du patch acide, servant probablement d'ancre pendant le remodelage pour empêcher l'octamère de bouger. Lors de l'hydrolyse de l'ATP, un renflement de l'ADN nucléosomal est introduit au niveau de SHL +2. Ce renflement d'ADN se déplace ensuite vers la sortie du nucléosome lorsque l'ADP est libéré et que la molécule d'ATP suivante est liée, ce qui entraîne la translocation de l'ADN nucléosomal (Y. Han et al. 2020).

Cette structure pose donc les bases moléculaires du mécanisme de translocation par SWI/SNF, qui permet de déplacer les nucléosomes, favorisant ainsi l'accès de la chromatine. Cependant, le complexe SWI/SNF est également capable d'éjecter les octomères d'histones. Une autre structure récente du complexe humain BAF lié au nucléosome (S. He et al. 2020), qui ne sera pas décrite ici, propose un modèle de l'éjection des nucléosomes, afin de générer une région sans nucléosome (nucleosome-depleted region, NDR), qui permet également la régulation de la transcription.

2. ISWI

a. Caractéristiques et composition

La famille de remodeleurs ISWI est l'une des familles les mieux comprises, en ce qui concerne leurs mécanismes d'action (C. Y. Zhou et al. 2016). Les complexes ISWI jouent des rôles essentiels dans presque tous les processus nucléaires, incluant l'activation et la répression transcriptionnelle, la réparation de l'ADN et la réplication de l'ADN (Corona et Tamkun 2004).

Les complexes ISWI ont deux types d'activités catalytiques, qui peuvent aider à expliquer leurs rôles biologiques. Ils sont ainsi impliqués dans l'assemblage des nucléosomes, et notamment dans la maturation des pré-nucléosomes et dans l'espacement des nucléosomes en réseaux réguliers (Torigoe et al. 2011) (C. Y. Zhou et al. 2016).

Chez l'homme, la famille ISWI peut former trois complexes différents : NURF, CHRAC et ACF. Le Tableau 6 présente leurs compositions, ainsi que celles de leurs complexes orthologues de levure. Il existe deux types de sous-unités catalytiques chez l'homme et chez les mammifères en général : SNF2L et SNF2H. Chez la levure, les homologues de ces domaines correspondent respectivement à ISW1 and ISW2.

Tableau 6 : Les complexes de remodelage de la famille ISWI

* SNF2H s'associe également à Tip5, RSF1 et WSTF pour former respectivement les complexes NoRC, RSF et WICH

Adapté de (Clapier et Cairns 2009).

Famille ISWI	Organisme	Levure			Homme		
	Nom du complexe	ISW1a	ISW1b	ISW2	NURF	CHRAC	ACF
	Sous-unité ATPase	Isw1		Isw2	SNF2L	SNF2H *	
	Sous-unités non catalytiques			Itc1	BPTF	hACF1/WCRF180	
						hCHRAC17	
						hCHRAC15	
				RbAp46 ou 48			
Unique	loc3	loc2, loc4					

b. D'un point de vue structural

Structures d'ISWI apo et liée à la queue H4 : découverte du mécanisme d'auto-inhibition

Les premières structures clés menant vers la compréhension mécanistique du remodeleur ISWI ont été la structure apo de la sous-unité catalytique d'ISWI de la levure *Myceliophthora thermophila*, ainsi que celle de cette même sous-unité liée à la queue de l'histone H4 (Figure 17) (Yan et al. 2016). Comme nous l'avons vu précédemment, la sous-unité catalytique d'ISWI est composée de plusieurs domaines : AutoN, la tête ATPase (lobe 1 et 2), NegC et un HSS. Dans ces structures du corps catalytique d'ISWI, le HSS n'est pas présent.

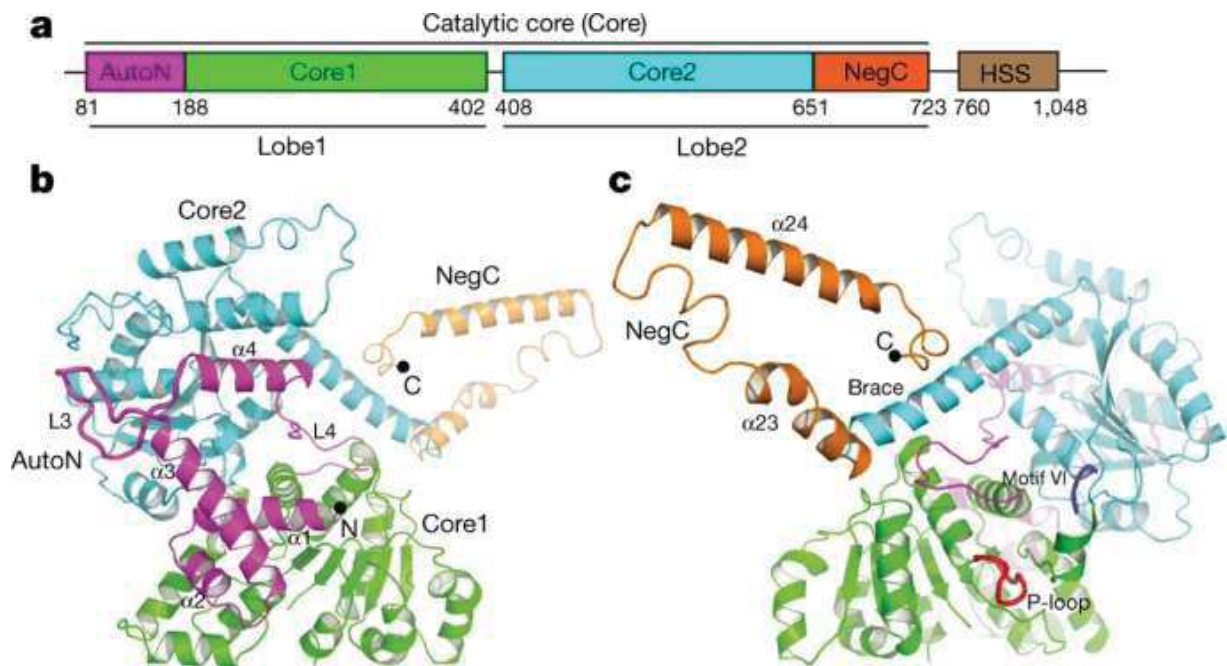


Figure 17 : Structure du corps catalytique d'ISWI en condition apo

A. Composition de la sous-unité catalytique d'ISWI.

B. et C. Structure de la sous-unité catalytique d'ISWI en condition apo avec des orientations opposées.

Source : (Yan et al. 2016)

Nous voyons ainsi qu'en condition apo, le domaine AutoN vient recouvrir les lobes 1 et 2 de la tête ATPase. Cette structure montre que le domaine AutoN possède une structure *H4-like*, pouvant se lier au lobe 2 de la tête ATPase et ainsi tenir la sous-unité catalytique en position inactive. Le domaine C-terminal NegC est également impliqué dans la liaison au lobe 2 de la tête ATPase et fonctionne comme un élément allostérique pour qu'ISWI puisse répondre à la présence d'ADN extranucléosomal (Yan et al. 2016).

Ainsi en condition apo, la sous-unité catalytique d'ISWI est auto-inhibée par ces domaines régulateurs AutoN et NegC. Ce mécanisme est antagonisé par la queue de l'histone H4 et l'ADN extranucléosomal. Le mécanisme d'auto-inhibition d'ISWI est levé par la liaison au nucléosome, permettant d'assurer un paysage chromatinien approprié dans chaque cellule.

Structures en complexe avec un nucléosome

La structure cryo-EM de la sous-unité catalytique d'ISWI de *Saccharomyces cerevisiae* (ISW1) liée au nucléosome en présence d'ADP et d'APD-BeFx (Figure 18), a permis de révéler de manière

détaillée le mécanisme de translocation de l'ADN, qui est conduit par l'hydrolyse de l'ATP (Yan et al. 2019). Comme décrit précédemment, ISW1 est auto-inhibé et est activé par la liaison au nucléosome. Cette liaison au nucléosome permet le réarrangement de ses domaines, comme visible sur la Figure 18. ISW1 se lie au nucléosome au niveau du SHL +2 ou SHL-2, ainsi qu'à la queue des histones H3 et H4. L'hydrolyse de l'ATP, entraîne l'ouverture du nucléosome, où un renflement d'une paire de bases se produit à SHL +2. L'ADN est alors transloqué de l'entrée vers le site de sortie du nucléosome. Le patch acide du nucléosome semble également jouer un rôle important pour orchestrer l'activité de remodelage *in vivo* (Yan et al. 2019).

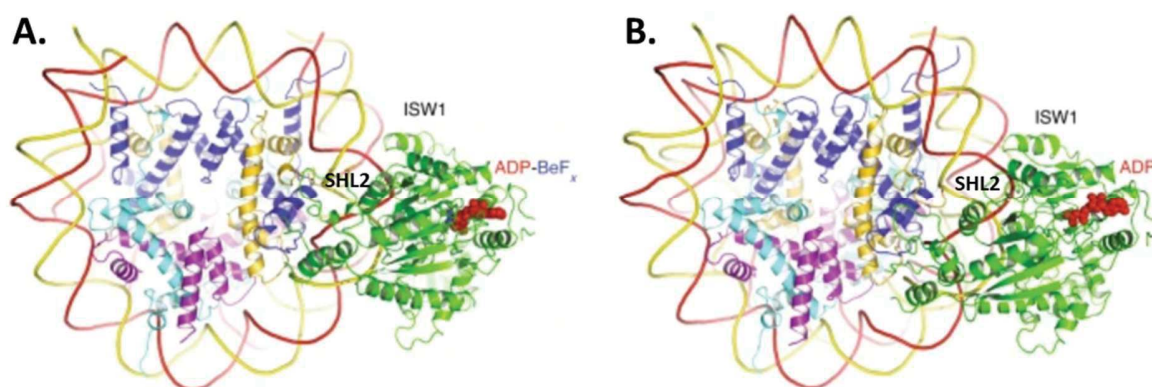


Figure 18 : Modèle structural de ISW1 lié au nucléosome

A. En présence d'ADP-BeFx

B. En présence d'ADP

Adapté de (Yan et al. 2019)

Ce mécanisme a également été confirmé par une seconde structure du domaine catalytique humain SNF2H d'ISW1 lié au nucléosome, qui a récemment été publiée et qui ne sera pas décrite dans ce manuscrit (Armache et al. 2019).

Les sous-unités catalytiques d'ISW1 (ISW1) et Snf2 (SWI/SNF) semblent donc avoir des mécanismes de translocations similaires (Sundaram et Vasudevan 2020).

3. CHD

Chez l'Homme, la famille CHD (chromodomain helicase DNA-binding) est composée de 10 membres, comportant CHD1 à CHD9, ainsi que CHD1L (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1-Like) (Hari Raj Singh 2018).

Toutes les protéines de la famille CHD, à l'exception de CHD1L, ont des chromodomaines qui lient les queues d'histones méthylées (R. J. Sims et al. 2005) et interagissent avec l'ADN nucléosomal permettant de réguler son activité (Nodelman et al. 2017) (Farnung et al. 2017) (Farnung, Ochmann, et Cramer 2020) (Sundaramoorthy et al. 2018).

En revanche, CHD1L contient un macrodomaine unique capable de lier le poly-ADPribose. Ce remodeleur CHD1L est traité dans le chapitre 4.

Certains remodeleurs de la famille CHD déplacent ou éjectent les nucléosomes pour favoriser la transcription. Cependant, d'autres ont principalement un rôle répressif, notamment le complexe spécifique aux vertébrés Mi-2/NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase*), qui contient des histones désacétylases (HDAC1/2), ainsi qu'une protéine MBD3, permettant de lier les méthyles des îlots CpG, illustré dans le Tableau 7 (Clapier et Cairns 2009). Ce tableau présente les remodeleurs de la famille CHD les plus caractérisés et n'est donc pas exhaustif.

Tableau 7 : Les membres de CHD1 et NuRD

Adapté de (Clapier et Cairns 2009).

Famille CHD	Organisme	Levure	Mouche		Humain	
	Nom du Complexe	CHD1	CHD1	Mi-2NuRD	CHD1	NuRD
	Sous-unité ATPase	Chd1	dCHD1	dMi-2	CHD1	Mi-2 α /CHD3 Mi-2 β /CHD4
	Sous unités non catalytique			dMBD2/3		MBD3
				dMTA		MTA1,2,3
				dRPD3		HDAC1,2
				p55		RbAp46 ou 48
				p66/68		P66 α , β
	Unique					DOC-1

Les membres de la famille CHD 1 à 9 peuvent être classifiés en trois sous-familles supplémentaires, selon la présence ou l'absence de domaines auxiliaires (Marfella et Imbalzano 2007) :

- Sous-famille I : CHD 1 et 2
- Sous-famille II : CHD 3 et 4
- Sous-famille III : CHD 5 à 9

a. Sous-famille I des CHD

- **Caractéristiques et composition**

La première sous-famille est composée de Chd1 chez les eucaryotes inférieurs et de CHD1 et CHD2 chez les eucaryotes supérieurs (Marfella et Imbalzano 2007). Ces protéines contiennent toutes deux un domaine de liaison à l'ADN situé dans leur région C-terminale (Woodage et al. 1997). Pour l'instant, CHD1 est le seul qui semble avoir un domaine de liaison à l'ADN fonctionnel. Il est donc possible que, malgré leur forte homologie, CHD1 et CHD2 aient des fonctions différentes (Marfella et Imbalzano 2007).

CHD1 est composé d'un double chromodomaine, d'un domaine ATPase bilobé et, dans sa partie C-terminale, d'un motif de liaison à l'ADN, SANT-SLIDE, et d'un domaine CHCT (CHD1 hélical C-terminal) qui comprend 5 hélices alpha. Le CHCT possède une surface conservée, chargée positivement et capable de se lier à l'ADN extranucléosomal (Mohanty et al. 2016).

CHD1 a de nombreux rôles. Il intervient dans le positionnement des nucléosomes (Stockdale et al. 2006) et dans la régulation de la transcription (Marfella et Imbalzano 2007). CHD1 humain a également été identifié comme étant un gène suppresseur de tumeur pour le cancer de la prostate (Burkhardt et al. 2013) (Huang et al. 2012). Il est également important dans l'intégrité génomique. En effet, CHD1 de levure a été montré comme étant un régulateur de la cohésine (Boginya et al. 2019). De même, CHD1 semble être critique dans le maintien de la pluripotence des cellules souches (Gaspar-Maia et al. 2011). Pour finir, CHD1 a également été montré comme jouant un rôle potentiel dans la déposition du variant d'histone H3.3 dans la chromatine, CHD1 interagissant avec HIRA *in vivo* (Konev et al. 2007).

- **D'un point de vue structural**

Structure de CHD1 sous forme apo :

Une première structure de CHD1 de levure a permis de découvrir une partie de l'architecture de cette première famille (Figure 19) (Hauk et al. 2010). Cette structure correspond à une partie du domaine catalytique de CHD1, composée des chromodomains et du domaine ATPase.

Ainsi en condition apo, le remodeleur CHD1 adopte une conformation inactive, où les têtes ATPases sont recouvertes par le tandem de chromodomains. CHD1 semble donc être en conformation inactive en absence de son substrat nucléosomal. Les chromodomains permettraient ainsi à CHD1 de distinguer le substrat nucléosomal de l'ADN simple, en ouvrant physiquement l'accès au domaine ATPase (Hauk et al. 2010).

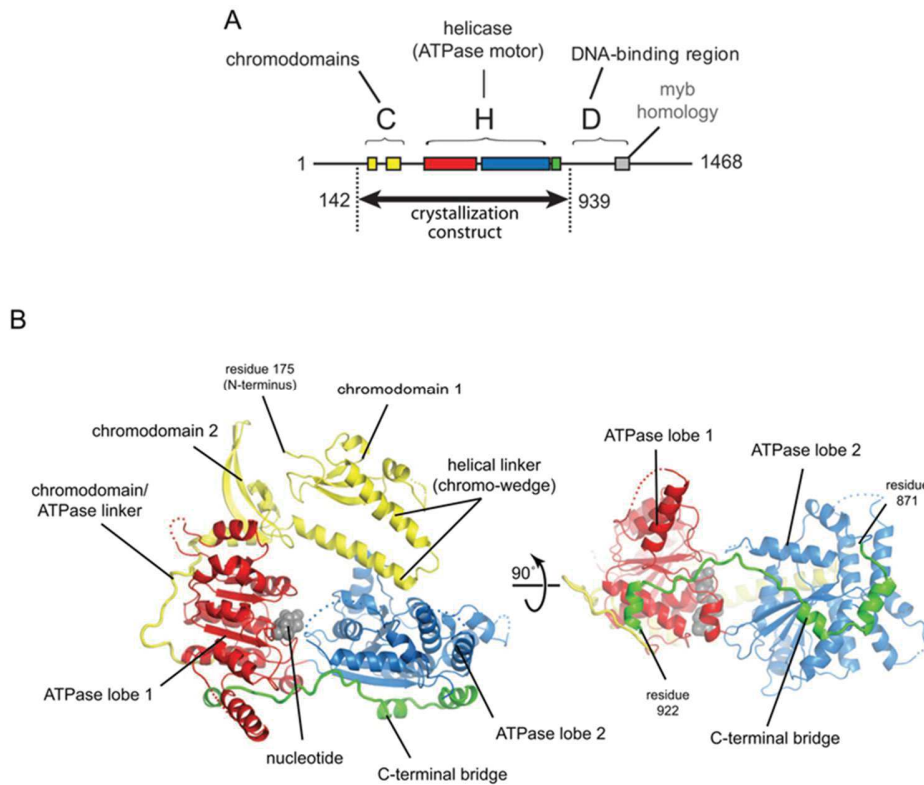


Figure 19 : Structure des chromodomains et de la tête ATPase de CHD1 de levure

A. Organisation de CHD1

B. Modèle structural de CHD1

Source : (Hauk et al. 2010)

Structures de CHD1 lié au nucléosome :

Deux structures du remodeleur CHD1 de levure en complexe avec un nucléosome ont ensuite permis de découvrir l'architecture quasi-complète de cette première sous-famille. Il s'agit de la structure du complexe CHD1 de levure lié au nucléosome avec de l'ADP-BeFx (Farnung et al. 2017), présentée sur la Figure 20, et de la structure de CHD1 de levure lié au nucléosome modifié H2BK120ub1 avec de l'ADP-BeFx (non présentée) (Sundaramoorthy et al. 2018).

Une caractéristique unique de ces structures est que la liaison de CHD1 induit le « décolllement » de l'ADN terminal de la surface de l'octamère au niveau des position SHL -6 et -7 (Farnung et al. 2017) (Sundaramoorthy et al. 2018). Cela est possible grâce au domaine SANT-SLIDE de CHD1, qui se lie à l'ADN de liaison au niveau du SHL -6 et -7. Le domaine ATPase, quant à lui, se lie au niveau du SHL +2 du nucléosome. De plus, la queue de l'histone H4 est amarrée dans une poche acide présente au niveau du lobe 2 de CHD1 (Figure 20). Cette caractéristique de liaison à H4 est

également retrouvée pour Snf2 et ISW1, ce qui suggère un point de régulation commun entre les différentes familles (Sundaram et Vasudevan 2020). En comparaison avec la structure apo des chromodomains de CHD1, ces derniers basculent vers le SHL +1, entraînant la fermeture de la tête ATPase. (Fannung 2017). En présence du nucléosome et d'ADP-BeFx, la tête ATPase de CHD1 adopte donc un état fermé actif.

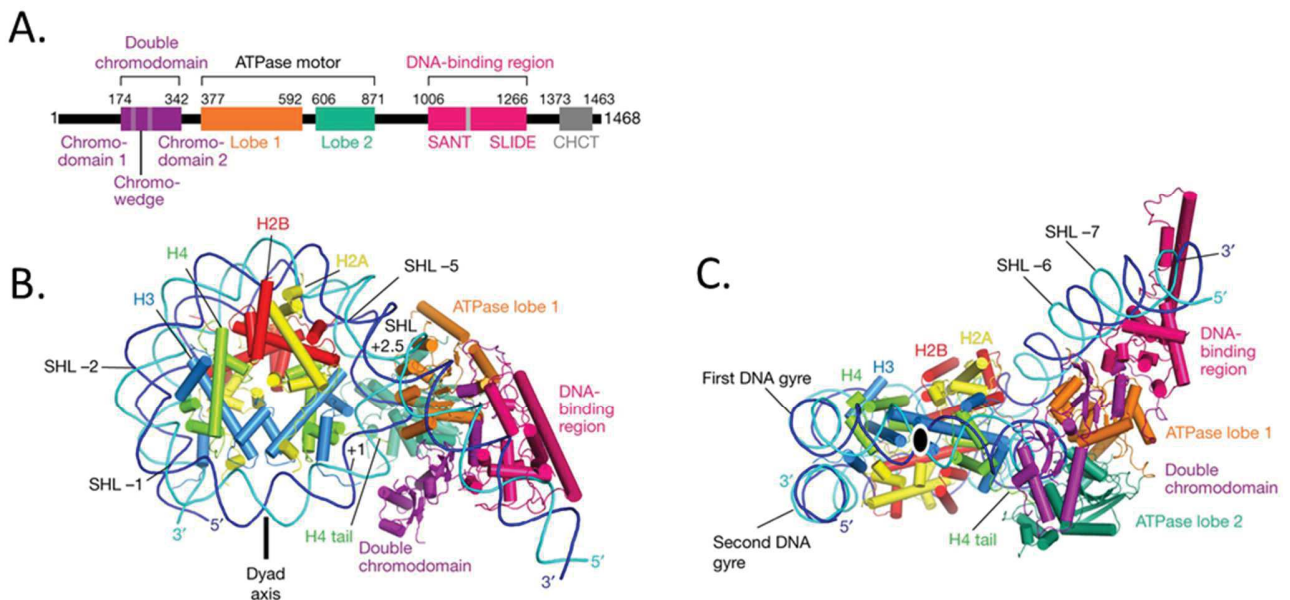


Figure 20 : Modèle structural de CHD1 de levure lié au nucléosome

A. Organisation des différents domaines de CHD1

B et C. Modèle de la structure, vue du dessus et de la dyade, respectivement.

Source : (Fannung et al. 2017).

L'activité ATPase de CHD1 permet alors la translocation bi-directionnelle de l'ADN vers la dyade, desserrant la première gyre de l'ADN.

Nous notons également que des structures cryo-EM récentes de CHD1 de levure ont montré certains états avec deux molécules CHD1 liées à un nucléosome (Sundaramoorthy et al. 2018). Cependant, la signification de cette architecture dimérique n'est pas connue et pourrait être liée au mécanisme de positionnement des nucléosomes par CHD1, afin d'obtenir un espacement régulier.

Concernant CHD2, ce dernier est moins bien caractérisé que CHD1. Des mutations de CHD2 ont été associées à des troubles du neurodéveloppement, tels que les troubles du spectre autistique,

la déficience intellectuelle et l'épilepsie (Nieto-Estevez et Hsieh 2018) (J. Chen et al. 2020). Au vu de ces troubles, il n'est donc pas étonnant que CHD2 ait été trouvé comme régulateur dans le développement du cerveau, permettant notamment les fonctions synaptiques, le développement cortical, le développement des circuits neuronaux et la mémoire (T. Shen et al. 2015) (Nieto-Estevez et Hsieh 2018) (Y. J. Kim et al. 2018).

b. Sous-famille II des CHD

- **Caractéristiques et composition**

La deuxième sous-famille ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. Elle comprend les protéines CHD3 et CHD4 (parfois appelées respectivement Mi-2 α et Mi-2 β), qui sont impliquées dans la formation du complexe NuRD. Ces protéines contiennent dans leur domaine N-terminal des domaines PHD (Woodage et al. 1997).

Les domaines PHD sont retrouvés dans de nombreuses protéines nucléaires permettant la régulation de la transcription. Ces domaines PHD semblent également être impliqués dans l'activité de remodelage de la chromatine (Ragvin et al. 2004). La récente structure d'un nucléosome lié à CHD4 montre que le domaine PHD se lie au niveau de SHL +0.5, près du site d'entrée et de sortie de l'ADN (Figure 21) (Farnung, Ochmann, et Cramer 2020). De plus, une mutation de ce domaine PHD entraîne une réduction de l'activité ATPasique du remodeleur CHD4 (Kovač et al. 2018). Ces domaines PHD semblent également être impliqués dans la reconnaissance des histones méthylées, avec notamment le PHD de CHD3, qui est lié à la reconnaissance de l'épi-marque H3K36me₃, souvent associée au gène transcrit (Shi et al. 2006) (Lawrence, Daujat, et Schneider 2016).

En raison de la présence d'HDACs, le complexe NuRD a souvent été associé à la répression transcriptionnelle. De plus, il contient la protéine MBD qui peut lier les îlots CpG méthylés.

Le complexe NuRD a ainsi été caractérisé dans la répression transcriptionnelle de gènes, qui sont impliqués dans la différenciation des cellules souches (Gaspar-Maia et al. 2011).

Cependant, ce complexe a aussi été trouvé associé aux régions promotrices et activatrices des cellules ES. Cela soulève la question de la complexité de l'activité de régulation par NuRD (Whyte et al. 2012) (Hu et Wade 2012). Cette régulation pourrait notamment dépendre des différentes sous-unités du complexe NuRD impliquées, dont CHD4 ou CHD3.

- D'un point de vue structural

Récemment, une structure de (Farnung, Ochmann, et Cramer 2020) présentant CHD4 lié au nucléosome en présence d'AMP-PNP a permis d'élucider la structure de cette deuxième famille (Figure 21).

Cette structure montre que le moteur ATPase de CHD4 se lie et déforme l'ADN nucléosomal au niveau du SHL +2. Cela permet ainsi la torsion de l'ADN et un renflement à ce niveau. Ce mécanisme de translocation semble identique aux deux familles (SWI/SNF et ISWI) décrites précédemment. Ainsi, CHD4 n'induit pas la perte d'interaction entre l'ADN terminal (SHL -6/-7) et l'octamère, contrairement à son homologue CHD1 (Farnung, Ochmann, et Cramer 2020).

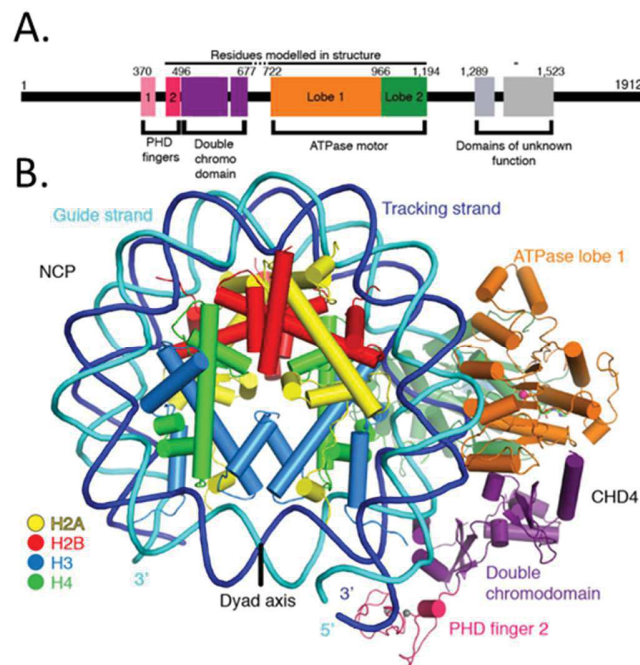


Figure 21 : Modèle de CHD4 humain lié au nucléosome

A. Architecture de CHD4

B. Modèle structural de CHD4

Source : (Farnung, Ochmann, et Cramer 2020).

Toutefois, de manière identique à ce qui a été observé pour CHD1, deux copies de CHD4 ont également été observées sur un seul nucléosome.

Il est important de noter qu'il n'existe pas encore de données structurales pour CHD3.

c. Sous-famille III de CHD

La troisième famille est composée des protéines Chd5 à Chd9. Ces protéines ont été identifiées sur la base de leur conservation avec les autres membres de la famille CDH. Cette sous-famille est définie par des motifs fonctionnels supplémentaires dans la région C-terminale, incluant des domaines BRK, *SANT-like*, CR et un domaine de liaison à l'ADN (Marfella et Imbalzano 2007).

Cette famille reste à ce jour la moins caractérisée. Les protéines de cette famille ne semblent pas avoir de rôle commun, mais présentent de multiples rôles. Pour la plupart d'entre elles, leur complexe associé n'est pas défini correctement.

CHD5 a été montré comme jouant un rôle de gène suppresseur de tumeurs, notamment dans les cancers du sein et du colon (Bagchi et al. 2007).

CHD6, quant à lui, est localisé au niveau des sites de transcription, et est également induit lors de lésions causées à l'ADN (J. K. Sims et Wade 2011) (Moore et al. 2019).

Des mutations dans CHD7 ont montré que ce dernier est impliqué dans le syndrome CHARGE qui est un syndrome d'anomalies congénitales multiples caractérisé par des malformations cranio-faciales, du système nerveux périphérique, des oreilles, des yeux et du cœur. De plus, CHD7 humain semble être associé au complexe PBAF et à PARP1, qui sont impliqués dans la formation de la crête neurale.

CHD8 a également de nombreux rôles. Il a ainsi été trouvé associé à la neurogénèse corticale (Durak et al. 2016). Il semble également être impliqué dans la régulation transcriptionnelle. En effet, CHD8 régule négativement l'expression des gènes associés à la β caténine (Thompson et al. 2008). De plus, CHD8 a été trouvé associé aux protéines WDR5, RbBp5 et Ash2L, qui composent le complexe MLL. Ce dernier catalyse la triméthylation de H3K4, une marque associée à l'activation de la transcription (J. K. Sims et Wade 2011) (Steward et al. 2006). Pour finir, CHD8 a récemment été associé aux troubles du spectre autistique (Bernier et al. 2014) (Sugathan et al. 2014) (Platt et al. 2017).

CHD9, quant à lui, semble être impliqué dans la régulation de l'expression génétique des ostéoblastes (J. K. Sims et Wade 2011). Initialement, seul CHD9 semblait avoir une activité de liaison à l'ADN (Marfella et Imbalzano 2007). Cependant, il a récemment été montré que les enzymes CHD6, CHD7 et CHD8 présentent des activités de liaison et de remodelage des nucléosomes (Manning et Yusufzai 2017).

4. INO80

La sous-famille INO80 est connue sous le nom « d'éditeur du nucléosome ». Il s'agit de la sous-famille la plus récemment identifiée, au début des années 2000 (X. Shen et al. 2000).

Les membres de la famille INO80 ont des fonctions diverses. Ils sont notamment impliqués dans la régulation de l'activation transcriptionnelle, dans la réplication, mais également dans la réparation des dommages à l'ADN (Poli, Gasser, et Papamichos-Chronakis 2017). Une activité hélicase 3'→5' a également été identifiée pour INO80 (X. Shen et al. 2000).

Alors que l'activité des autres familles de remodelage semble être principalement limitée au déplacement et à l'assemblage des nucléosomes, les membres de la famille INO80 remplissent des fonctions supplémentaires affectant de manière différente la structure de la chromatine. Ils sont ainsi impliqués dans l'échange d'histones. Cette fonction a tout d'abord été caractérisée pour le complexe de levure SWR1, qui est capable de recruter le variant d'histone Htz1 (équivalent de H2A.Z), afin de remplacer son homologue canonique dans la formation du nucléosome (Krogan et al. 2003) (Mizuguchi et al. 2004).

Chez l'Homme et chez les mammifères, la famille INO80 est composée de trois complexes, INO80 (inositol requiring 80), SRCAP (SNF2-related CBP activator protein) et p400/Tip60 (TAT-interacting protein, 60-KD), comme le montre le Tableau 8.

Chez la levure, il s'agit des complexes INO80 et SWR1 et chez la drosophile des complexes dINO80 et Domino.

Les complexes de la famille INO80 partagent des caractéristiques architecturales communes.

La première caractéristique est l'omniprésence d'un anneau hexamérique de protéines de type RuvB (RUVBL1/2 humain et Rvb1/2 de levure) (Willhoft et Wigley 2020). Ces protéines sont des *helicase-related* (AAA-ATPase). Cependant l'activité ATPase de ces protéines AAA+ n'est pas nécessaire pour le remodelage de la chromatine par INO80 ou par SWR1 (Ayala et al. 2018) (Willhoft et al. 2018). Ces sous-complexes hexamériques agissent comme un pivot pour la sous-unité catalytique, permettant d'envelopper une partie du Lobe 2 de cette même sous-unité. Cet anneau hexamérique se lie majoritairement à la grande insertion caractéristique de la famille entre les deux lobes de la tête ATPase (Bao et Shen 2007). Par conséquent, la description la plus simple du rôle de l'anneau hexamérique est celle d'un échafaudage architectural sur lequel s'assemblent d'autres sous-unités (Willhoft et Wigley 2020).

Tableau 8 : Composition de la famille INO80

Adapté de (Clapier et Cairns 2009)

INO80	Organisme	Levure		Mouche		Humain			
	Nom du complexe	INO80	SWR1	Pho-dINO80	Tip60	INO80	SRCAP	TRRAP/Tip60	
	Sous-unité ATPase	Ino80	Swr1	dIno80	Domino	hIno80	SRCAP	P400	
INO80	Sous-unités non catalytiques	Rvb1,2		Reptin, Pontin		RUVBL1,2/Tip49a,b			
		Arp5,8	Arp6	dArp5,8 dActin1	BAP55 Actin87E	BAF53a/Arp4			
		Arp4, Actin1				Arp5,8	Arp6	Actin	
		Taf14	Yaf9		dGAS41		GAS41		
		les2,6				hles2,6			
			Swc4/Eaf2			dDMAP1		DMAP1	
			Swc2/Vps72			dYL1		YL1	
			Bdf1			dBrd8			Brd8/TRC/p120
			H2AZ,H2B			H2Av,H2B		H2AZ,H2B	
			Swc6/Vps71					Zn-HIT1	
					dTra1			TRRAP	
					dTip60			Tip60	
					dMRG15			MRG15 MRGX	
				dEaf6			FLJ11730		
				dMRGBP			MRGBP		
				E(Pc)			EPC1, EPC-like		
				dING3			ING3		
Unique	les1, les3-5, Nhp10	Swc3,5,7	Pho		Amida, NFRKB, MCRS1, UCH37, FLJ90652, FLJ20309		ANP32E		

Tous les membres de la famille INO80 contiennent également des protéines apparentées à l'actine ou ARPs. Ces protéines ARPs ont été montrées comme étant essentielles au remodelage par les remodeleurs (Cairns et al. 1998). Elles sont également impliquées dans la reconnaissance des histones, avec des préférences distinctes pour certains types d'histones (Willhoft et Wigley 2020). Par exemple, Arp4 interagit avec l'histone H2A, mais également γ -H2AX, en accordance avec le rôle d'INO80 dans la réparation de l'ADN. (X. Shen et al. 2003) (Harata et al. 1999). Arp8 reconnaît aussi de manière préférentielle le tétramère H3/H4 (Gerhold et al. 2012). Pour finir, Arp5 interagit avec les dimères d'histones H2A/H2B (Tosi et al. 2013) (Ayala et al. 2018). Ainsi, les remodeleurs de la famille INO80 possèdent également de nombreux domaines HSA pouvant reconnaître ces ARPs.

La première structure du complexe INO80-nucléosome a été publiée il y a 2 ans. Il s'agit d'une structure cryo-EM du complexe INO80 de *Chaetomium thermophilum*. (Eustermann et al. 2018). Cette structure a permis de poser les bases de la reconnaissance du nucléosome par INO80, mécanisme semblant être différent de ceux des autres remodeleurs. Cette structure permet également de proposer un mécanisme unifié de translocation et d'échange des paires d'histones au sein du nucléosome. Cette structure a été suivie de peu par deux autres structures: la première étant celle du complexe de levure SWR1-nucléosome (Willhoft et al. 2018), puis celle du complexe INO80 humain-nucléosome (Ayala et al. 2018).

a. SWR1 vs INO80

- Rôles

Les rôles de ces deux complexes sont différents, SWR1 aide à incorporer H2A.Z/H2B dans la chromatine (Mizuguchi et al. 2004), alors que INO80 effectue la fonction opposée et remplace la paire variante H2A.Z/H2B par la paire canonique H2A/H2B (Brahma et al. 2017). La localisation de H2A.Z dans la chromatine est ainsi un processus très dynamique, contrôlé non seulement par son incorporation, mais aussi par son élimination.

L'échange de H2A/H2B pour H2A.Z/H2B par SWR1 est en partie facilité par la « livraison » du dimère H2A.Z/H2B par l'un des chaperons connus de H2A.Z/H2B. Il s'agit de chaperons non spécifiques comme Nap1 et FACT, mais aussi d'un chaperon spécifique nommé Chz1 (Mizuguchi et al. 2004) (Luk et al. 2007) (Luk et al. 2010) (Brahma et al. 2017). Des structures de ce chaperon en complexe avec H2A.Z/H2B sont disponibles (Z. Zhou et al. 2008) (Y. Wang et al. 2019). Une structure de NAP1 en complexe avec H2A.Z/H2B a récemment été publiée dans la PDB (6K0C).

Le remplacement de H2A/H2B par SWR1 se fait alors dans un ordre séquentiel *in vitro*, formant tout d'abord un nucléosome hétérotypique contenant un dimère H2A.Z/H2B et un dimère H2A/H2B, puis un nucléosome homotypique contenant deux dimères H2A.Z/H2B (Luk et al. 2010). Dans ce processus, le tétramère H3/H4 est conservé, même après le remplacement complet des deux dimères.

Les bases moléculaires de cet échange par la partie N-terminale du domaine ATPase de SWR1 sont également connues (Hong et al. 2014) et seront discutées plus en détail dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

La régulation de l'activité transcriptionnelle par INO80 implique donc un échange entre les histones H2A.Z et H2A, notamment en positionnant les nucléosomes H2A.Z au niveau des sites +1 et -1 de l'initiation de la transcription en aval des promoteurs (Eustermann et al. 2018).

- Bases moléculaires

INO80 et son paralogue SWR1 ont des schémas d'assemblage similaires, mais ils se lient différemment au nucléosome (Tosi et al. 2013) (Ayala et al. 2018) (Nguyen et al. 2013) (Willhoft et al. 2018).

INO80 :

Les structures cryo-EM des complexes INO80-nucléosomes ont permis d'améliorer la compréhension des bases moléculaires qui régissent l'activité d'INO80, et notamment la manière dont il transloque l'ADN et échange H2A.Z/H2B pour H2A/H2B (Eustermann et al. 2018) (Ayala et al. 2018).

Comme le montre la Figure 22, le domaine ATPase de hINO80 se lie au gyre d'ADN au niveau du SHL -6. L'hydrolyse de l'ATP permet alors de dérouler environ 15 pb d'ADN, comme un levier moléculaire (*molecular ratchet*), introduisant une boucle d'ADN transitoire et exposant H2A.Z/H2B qui peut alors être échangée avec H2A/H2B. Ce déplacement est possible grâce aux protéines Arp5 et les6, qui lient le nucléosome au niveau des SHL -2 et -3 et qui vont servir de contre-grip (ou d'ancre) au moteur ATPase (nommé grapin dans la Figure 22 - D).

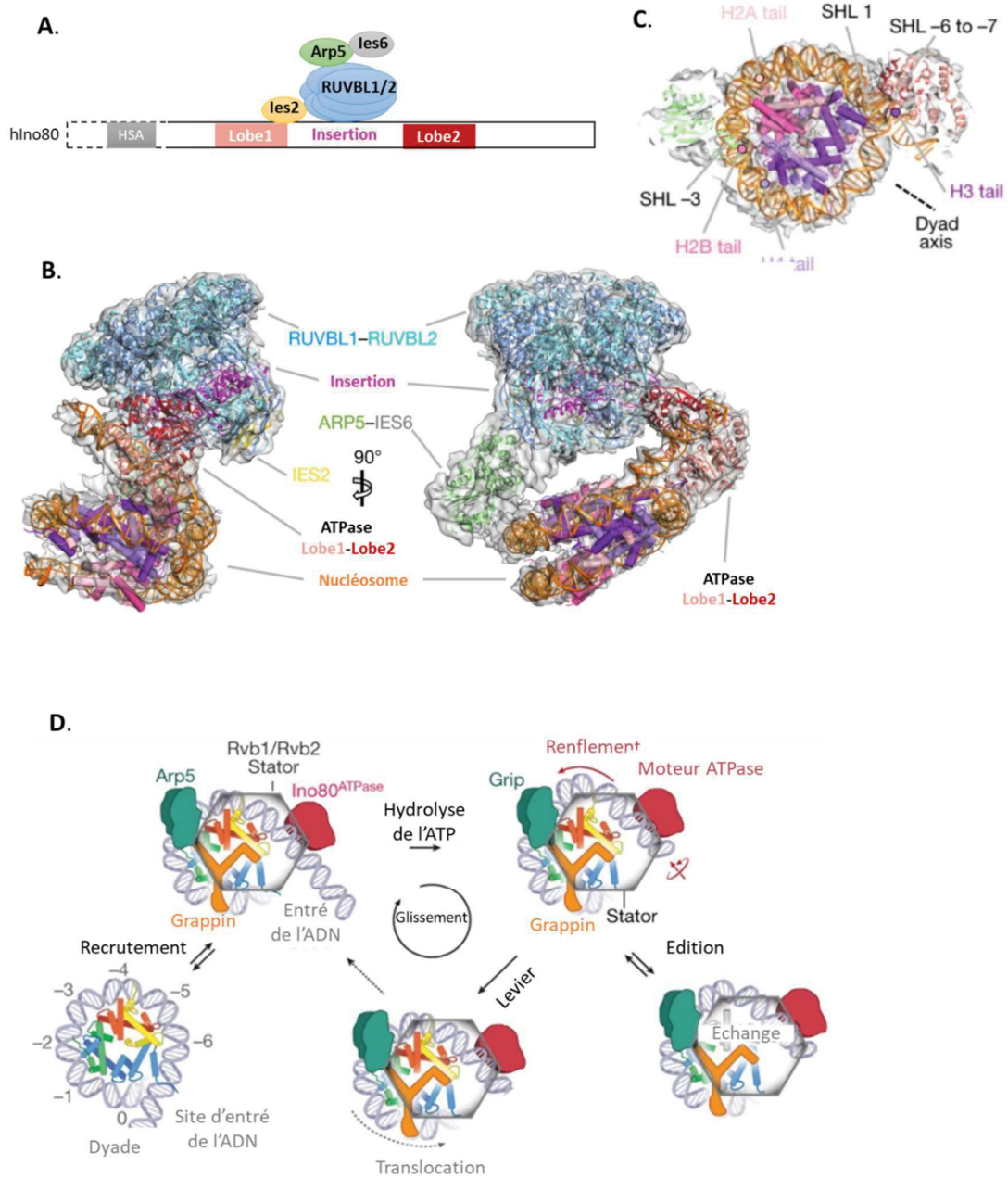


Figure 22 : Structure du remodeleur INO80 humain

A. Organisation moléculaire des constituants de INO80 humain présents dans la structure

B. Modèle cryo-EM du complexe

C. Site de liaison des différentes sous-unités au niveau du nucléosome

D. Modèle de translocation et d'échange du dimère d'histone H2A.Z/H2B

Adapté de (Ayala et al. 2018) (Sundaram et Vasudevan 2020) (Eustermann et al. 2018).

Le brin d'ADN peut alors être poussé et transféré. De cette façon, le "levier INO80" permet le mouvement de l'ADN, démantelant partiellement l'ADN autour de l'octamère.

Ainsi, Arp5 n'est pas seulement important pour le recrutement au nucléosome en reconnaissant H2A/H2B, mais il est également un acteur clé dans le processus de translocation et d'éjection du dimère d'histone (Willhoft et al. 2018).

SWR1 :

La structure du complexe de levure SWR1 en complexe avec le nucléosome a également été étudiée (Willhoft et al. 2018). Ce complexe est représenté dans la Figure 23. Il est composé de multiples sous-unités, mais ne correspond pas au complexe entier. Le domaine catalytique de SWR1 se lie au nucléosome au niveau du SHL +2, et également via une Arginine (Arg44 de Swr1) au niveau du patch acide du nucléosome.

Dans ce modèle cryo-EM de SWR1 lié à de l'ADP-BeFx, l'ADN nucléosomal est déformé au niveau du SHL +2, qui est alors déballé de 2,5 tours hélicoïdaux. L'hydrolyse de l'ATP, permet de fermer le domaine catalytique entraînant une translocation limitée de l'ADN nucléosomal par un renflement d'une paire de base, similaire au mécanisme de Snf2 que nous avons vu précédemment. Cela semble perturber l'interface de l'octamère (Sundaram et Vasudevan 2020). Cependant une fois l'histone échangée, il n'y a pas de translocation de l'ADN par Swr1 (Willhoft et al. 2018). Malgré cette absence de translocation, la liaison des sous-unités ARP6 et SWC6 de SWR1 au SHL +6/7 est similaire au mécanisme de grapin que nous avons vu précédemment. Toutefois, dans ce cas, elle permet d'affaiblir les contacts du dimère H2A/H2B et du H4, favorisant ainsi l'échange de dimère (Willhoft et al. 2018).

D'autres études structurales et biophysiques seront encore nécessaires pour fournir la base mécaniste de cet échange d'histone par SWR1. De plus, malgré la contribution de l'actine et des ARPs au remodelage de la chromatine, une caractéristique commune dans toutes les structures cryoEM à haute résolution de la famille INO80 est le module Arp-HSA, qui est manquant (Willhoft et Wigley 2020).

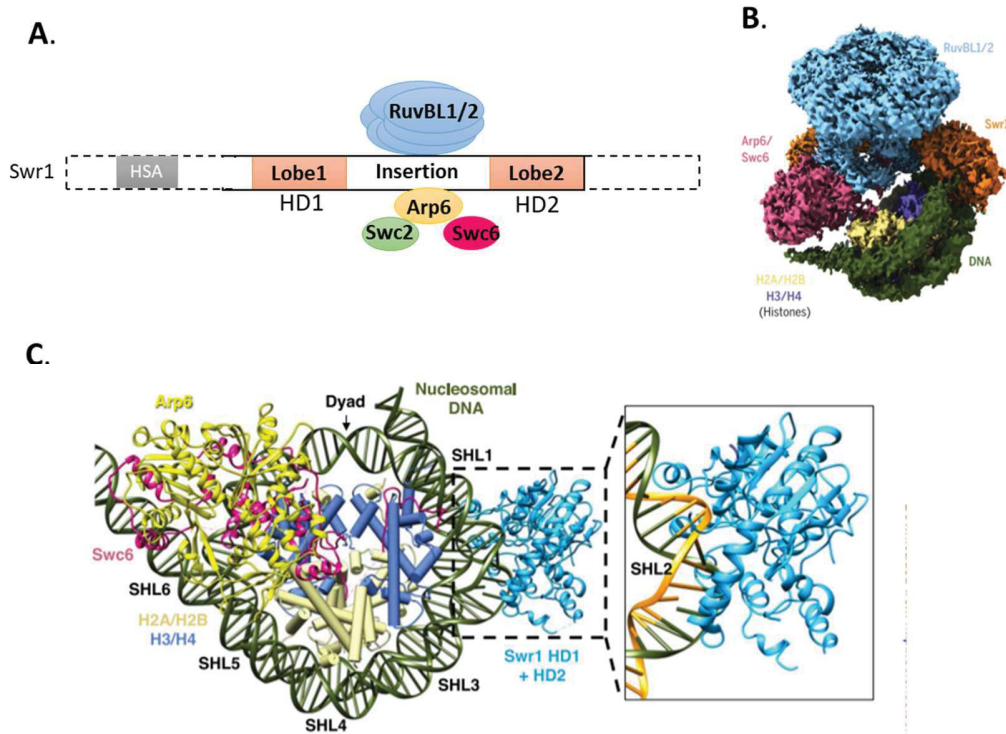


Figure 23 : Structure du remodeleur SWR1 de levure

A. Organisation moléculaire des constituants de SWR1 présents dans la structure

B Modèle cryo-EM du complexe

C. Site de liaison des différentes sous-unités au niveau du nucléosome

Adapté de (Willhoft et al. 2018).

Ainsi, les remodeleurs INO80 et SWR1 ont tous deux une interaction bilatérale avec le nucléosome (Eustermann et al. 2018) (Ayala et al. 2018) (Willhoft et al. 2018) (Willhoft et Wigley 2020). Cependant, la disposition entre le moteur ATPase et l'attache (grappin) est inversée entre INO80 et SWR1. Alors que Ino80 et Arp5:les6 sont liés respectivement au SHL 6/7 et SHL 3, le moteur Swr1 se lie au SHL 2 et Arp6:Swc6 au SHL 6 (Figure 22 et Figure 23, respectivement). Ainsi la position de Swr1 au niveau de la gyre SHL 2 correspond à celle observée lors de la translocation des nucléosomes, effectuée par les remodeleurs de la famille Chd1, ISWI ou encore SWI/SNF (Farnung et al. 2017) (Yan et al. 2019) (X. Liu et al. 2017) (Y. Han et al. 2020), et cela même si l'activité biochimique de Swr1 n'est pas la translocation des nucléosomes, mais l'échange de paires d'histones (Willhoft et al. 2018) (Willhoft et Wigley 2020).

b. p400/Tip60

- Composition

Le complexe p400/Tip60 est un complexe présent chez tous les mammifères, il possède également un homologue Domino chez la Drosophile. Cependant, ce complexe ne semble pas exister chez la levure comme le montre le Tableau 8.

Plus précisément, la composition du complexe p400/Tip60 humain suggère qu'il provient d'une fusion de deux complexes de levure : le remodeleur SWR1 et l'histone acétyl-transférase NuA4 (Auger et al. 2008) (Billon et Côté 2012). Illustré dans la Figure 24, ces deux complexes de levure partagent un module composé de quatre sous-unités (Eaf2, Arp4, Act1 et Yaf9), qui correspondent aux sous-unités humaines (DMAP1, BAF53a, Actin et GAS41). Le remodeleur p400/Tip60 est donc un complexe multifonctionnel comportant au moins 16 sous-unités et qui possèdent deux activités enzymatiques, dont l'une est une activité ATPasique (p400) et l'autre une activité HAT (Tip60).

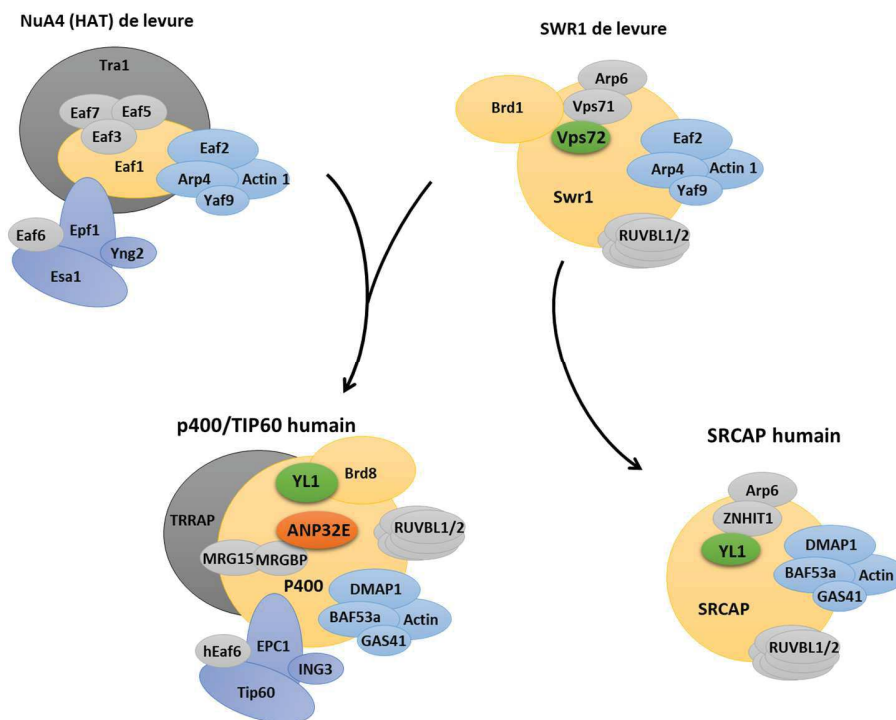


Figure 24 : Représentation schématique de l'évolution des complexes humains p400/Tip60 et SRCAP à partir des complexes NuA4 et SWR1 de levure
Adapté de (Billon et Côté 2012).

- Rôle

Ce complexe a été montré comme jouant un rôle dans la régulation de la transcription. Le complexe Tip60-p400 facilite la transcription en combinant le remodelage des nucléosomes avec l'activité HAT. En effet, le complexe NuA4 est impliqué dans l'activation transcriptionnelle de certains gènes, principalement par acétylation des histones nucléosomiques H4 et H2A (Doyon et al. 2004). Il n'est donc pas surprenant que NuA4 permette l'acétylation de H4, stimulant ainsi l'incorporation des dimères Htz1(H2A.Z)/H2B par le complexe SWR1 (Altaf et al. 2010).

Le complexe Domino est également capable d'échanger H2A par son variant H2Av (équivalent à la fois de H2A.Z et de H2A.X chez la drosophile) (Grigorian, DeBruhl, et Lipsick 2017) (Kusch et al. 2004).

De même que chez les mammifères avec H2A.X, lors de dommages à l'ADN, le variant d'histone H2Av de drosophile est spécifiquement phosphorylé sur un résidu sérine conservé. Par la suite, le γ H2Av est acétylé par l'histone acétyltransférase dTip60, ce qui entraîne son échange avec un H2Av non modifié au niveau du site de la cassure (Kusch et al. 2004) (Giaino et al. 2019).

Les complexes TIP60 et NuA4 permettent également d'acétyler H4 et H2A.Z/Htz1 respectivement à un stade précoce de réparation de l'ADN (Keogh et al. 2006) (A. W. Bird et al. 2002) (P. Xu et al. 2016).

Tip60 semble ainsi jouer un rôle important dans la réparation des dommages causés à l'ADN. De plus, Tip60 est également impliqué dans l'activation d'ATM en l'acétylant (Y. Sun et al. 2009).

En plus de son rôle dans la réparation et dans la transcription, p400/Tip60 est un des seuls complexes de INO80, avec SRACP, qui semble être impliqué dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES (Gaspar-Maia et al. 2011) (Ye et al. 2020).

P400/Tip60 humain est également composé de nombreux autres sous-unités, avec notamment la sous-unité BRD8, qui contient des bromodomains liant les lysines acétylées de H4 (Billon et Côté 2012).

Récemment la protéine ANP32E de ce complexe a été identifiée comme étant un chaperon d'éviction de l'histone H2A.Z de la chromatine (Obri et al. 2014). Ce chaperon et son mécanisme moléculaire sera étudié plus en détails dans le chapitre 3.

Il n'existe pas à ce jour de donnée structurale sur le complexe p400/Tip60.

c. SRCAP

- Composition et rôle

SRCAP humain est un complexe macromoléculaire d'environ ~1 MDa. Il est composé de 10 protéines : SRCAP, DMAP1, YL1, RUVBL1, RUVBL2, ACTL6A, ARP6, ACTIN, GAS41 and ZNHIT1 (Tableau 8 et Figure 24). Contrairement à p400/Tip60, SRCAP ne possède pas de module HAT.

SRCAP peut être décomposé en trois modules :

- un module "tête" formé par un anneau hétérohexamérique de RUVBL1-RUVBL2,
- un module C composé de YL1, ARP6 et ZNHIT1,
- un module N contenant ACTL6A, ACTIN, DMAP1 et GAS41.

SRCAP est l'homologue du complexe SWR1 de levure. SRCAP a été montré comme catalysant le dépôt de H2A.Z dans les nucléosomes, permettant ainsi la régulation transcriptionnelle et le dépôt de H2A.Z au niveau des promoteurs inactifs et actifs (Ruhl et al. 2006) (Wong, Cox, et Chrivia 2007).

Tout comme son homologue de levure, SRCAP semble incorporer H2A.Z/H2B (couplé à l'éviction de H2A/H2B) de manière progressive (Luk et al. 2010) (Feng et al. 2018).

Récemment, la protéine YL1 du complexe SRCAP a été montrée comme étant un chaperon spécifique de H2A.Z permettant le dépôt de la paire H2A.Z/H2B sur la chromatine (Latrick et al. 2016). Les bases moléculaires de cette interaction sont également connues et seront décrites dans le chapitre 3.

- Structure de SRCAP

Récemment, la structure cryo-EM du complexe SRCAP humain lié au mononucléosome a été décrite, elle est illustrée sur la Figure 25. Cependant, les mécanismes d'assemblage de SRCAP au nucléosome et les mécanismes d'échange d'histones restent largement inconnus, malgré un mécanisme potentiel proposé dans cet article (Feng et al. 2018).

SRCAP, tout comme son homologue de levure SWR1, semble lier le nucléosome de manière bivalente. Cette interaction a lieu grâce aux deux lobes de la sous-unité ATPasique de SRCAP d'un côté et grâce à la sous-unité ARP6 de l'autre. De même que pour SWR1, SRCAP ne semble pas posséder d'activité translocase (Feng et al. 2018).

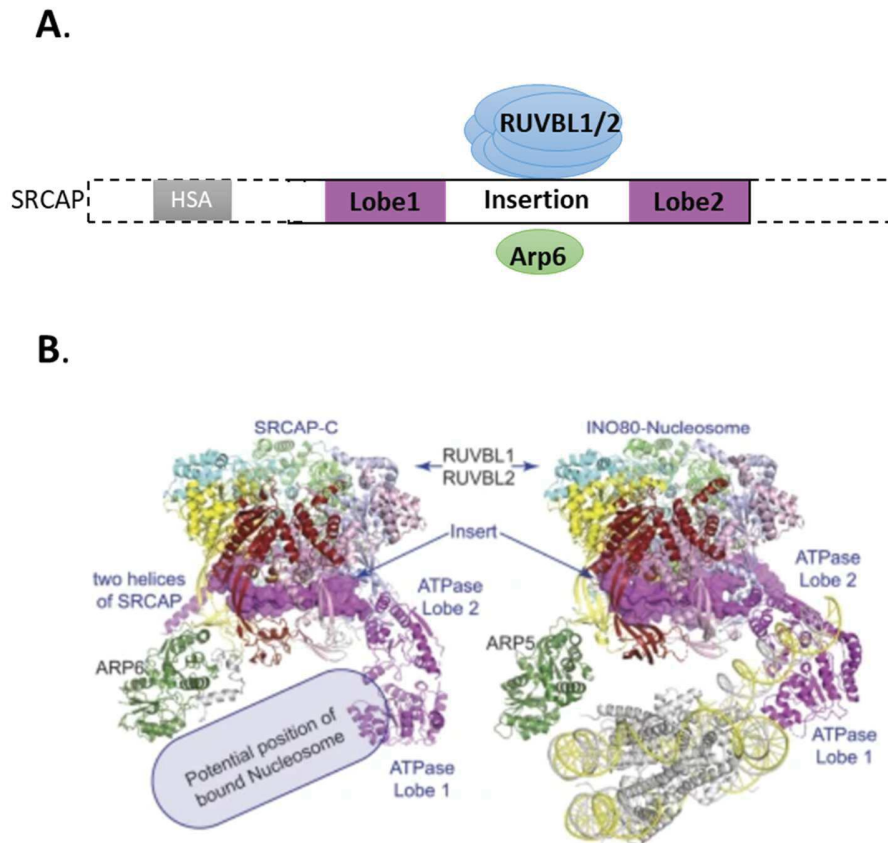


Figure 25 : Structure du remodeleur SRCAP humain

A. Organisation moléculaire des constituants de SRCAP présents dans la structure

B Modèle cryo-EM du complexe et comparaison avec la structure d'INO80

Adapté de (Feng et al. 2018).

Cette structure a ainsi permis de proposer le modèle suivant pour le dépôt de H2A.Z/H2B sur le nucléosome : le nucléosome est reconnu par SRCAP sur deux surfaces de liaison. Le domaine ATPase de la protéine SRCAP se lie à l'ADN pour la translocation. Le nucléosome est ensuite stabilisé par la protéine ARP6 et éventuellement par d'autres composants de SRCAP. Le domaine ATPase, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, permet de pousser l'ADN vers ARP6, ce qui entraîne un décollement partiel de l'ADN nucléosomal et la perte de contacts entre les dimères H2A/H2B dans l'octamère d'histones. Cela facilite alors l'échange d'histones, en permettant éventuellement à YL1 de déposer spécifiquement le dimère H2A.Z/H2B (Feng et al. 2018).

Le complexe SRCAP contient également la protéine GAS41 qui possède un domaine YEAT, capable de se lier à des marques d'acétylation spécifiques de H3. Ainsi, GAS41 a été montré comme jouant un rôle clé dans le dépôt du variant d'histone H2A.Z dans des régions spécifiques

de la chromatine. GAS41 reconnaît et lie les épi-marques H3K14ac et H3K27ac sur les promoteurs des gènes activement transcrits et permet le recrutement de remodeleurs capables de déposer H2A.Z à ce niveau (C.-C. Hsu et al. 2018). Cette caractéristique pourrait ainsi venir compléter le modèle ci-dessous en intégrant un aspect spatial à la déposition de H2A.Z.

5. Un mécanisme unifié de translocation

Plusieurs équipes se sont penchées sur un modèle unifié de translocation pour les différentes familles de remodeleurs (Clapier et al. 2017) (Yan et Chen 2020) (Markert et Luger 2020). Le modèle présenté dans la Figure 26 est l'un des plus récents et provient de l'article (Markert et Luger 2020). Il propose deux modèles de translocation.

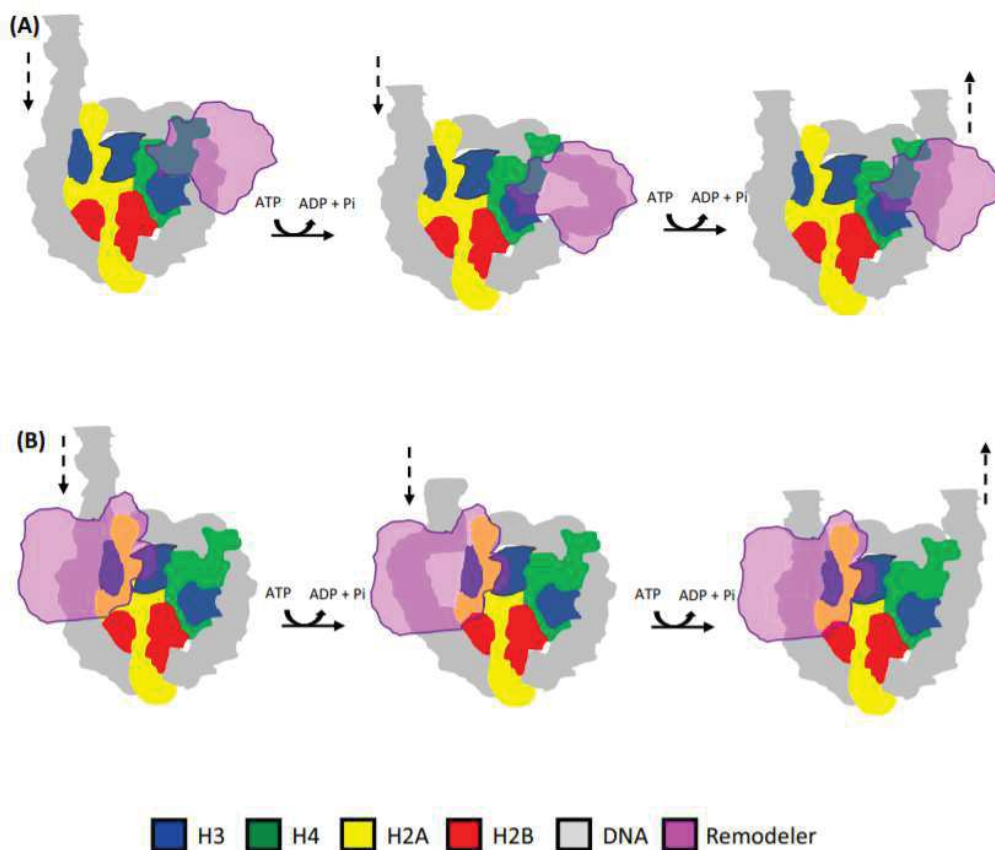


Figure 26 : Deux modèles pour la translocation de l'ADN

Source : (Markert et Luger 2020)

Modèle A :

Les remodeleurs se lient grâce à leur domaine catalytique ATPase au niveau du SHL 2 et semblent déplacer l'ADN directement au niveau du SHL2, créant un renflement de l'ADN à ce niveau. En conséquence, l'ADN est poussé vers la dyade, ce qui permet une translocation de l'ADN. Cette catégorie concerne les familles de remodeleurs ISWI, SWI/SNF et CHD.

Modèle B :

Les remodeleurs se lient grâce à leur domaine catalytique ATPase au niveau du SHL 6/7 et décollent l'ADN extranucléosomal de l'octamère au niveau du SHL 6/7, permettant un renflement de l'ADN à ce niveau. Par répétition de ce mécanisme, les remodeleurs pourraient continuer à déplacer l'ADN dans la même direction et ainsi permettre sa translocation. Ce modèle concerne uniquement le complexe INO80, les complexes SWR1 et SRCAP n'ayant pas d'activité translocase.

F. Objectifs de la thèse

La régulation de la structure chromatinienne est rendue possible grâce aux différents mécanismes et effecteurs épigénétiques présentés au cours de ce chapitre.

Ces effecteurs coopèrent les uns avec les autres, régulant ainsi la structure de la chromatine et les processus nucléaires, afin d'orchestrer correctement l'expression des gènes de manière spatiale et temporelle. La dérégulation de ces mécanismes épigénétiques est liée à de nombreuses pathologies. Ces effecteurs sont fréquemment altérés dans divers cancers et représentent donc des cibles thérapeutiques de choix. Il est donc essentiel de mieux comprendre, en termes moléculaires, leur interaction et leur mode d'action.

Durant mon travail de doctorat, j'ai étudié plusieurs de ces effecteurs épigénétiques qui tous agissent dans le cadre d'activités ATP-dépendantes de remodelage de la chromatine :

1. Le premier objectif de ma thèse a été d'étudier l'ensemble des interactions entre le variant d'histone H2A.Z et ses chaperons YL1 et ANP32E, qui interagissent physiquement et fonctionnellement avec les remodeleurs P400/TIP60 et SRCAP.

En effet, malgré de nombreuses recherches menées au cours de la dernière décennie, la compréhension moléculaire du dépôt et de l'éviction de H2A.Z par ses chaperons YL1 et ANP32E ainsi que l'implication des remodeleurs p400/Tip60 et SRCAP dans ce processus reste encore limitée.

2. Le second objectif a été de caractériser le facteur de remodelage de la chromatine CHD1L, afin de comprendre son implication dans les désordres neurodéveloppementaux liés à la région chromosomique 1q21.1. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Christelle GOLZIO à l'IGBMC.

Les objectifs détaillés seront fournis à la fin des introductions spécifiques de chaque chapitre. Ainsi le chapitre 3 présente le chaperon HA2.Z et ses chaperons spécifiques et le chapitre 4 traite du remodeleur CHD1L.

Chapitre 2 :

Matériels et méthodes

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Pour les divers projets menés, une méthodologie commune a été suivie, utilisant une approche intégrative qui combine biologie moléculaire, biochimie, biophysique et biologie structurale. La première étape indispensable est celle de la biologie moléculaire avec la génération des vecteurs d'expressions contenant les gènes codant pour les protéines ou complexes protéiques d'intérêt. Dans un second temps, les tests d'expression et de purification à petite échelle permettent de sélectionner des constructions les plus prometteuses et d'optimiser les conditions de production et de purification.

Toutes les informations obtenues permettent de passer à la production et à la purification à grande échelle. La caractérisation biochimique et biophysique est alors entreprise. Des méthodes d'interactomique, telles que la titration calorimétrique isotherme (ITC), m'ont permis de mieux caractériser les interactions entre différents partenaires protéiques. Une partie théorique sur les interactions protéine-protéine (ipp) sera proposée dans cette section.

Lorsque cela a été possible, les études ont été poussées jusqu'à la résolution de structure tridimensionnelle par bio-cristallographie aux rayons X. Des approches de microscopie électronique ont également été débutées.

Cependant, le chemin menant à la structure 3D d'une protéine est un processus non linéaire nécessitant de nombreuses optimisations et qui peut également s'avérer infructueux. Durant ma thèse, plusieurs de mes projets se sont heurtés à un goulot d'étranglement majeur, celui de la formation de cristaux.

I. Techniques de biologie moléculaire et constructions

A. Les vecteurs d'expression de la suite pET-MCN

Les plasmides de la suite pET-MCN; **pET multi-cloning and expression**, sont dérivés des plasmides pET15b, pCDF-DUeT et pACYC11b, et ont été développés au sein de l'équipe (Romier et al. 2006) (Perrakis et Romier 2008) (Diebold et al. 2011) (Vincentelli et Romier 2013) (Vincentelli et Romier 2016). Ces vecteurs tirent leurs noms des vecteurs desquels ils dérivent et sont de trois types :

- Les vecteurs pnEA (« p » = plasmide, « n » = série pET-MCN, « E » = pET, « A » = Ampicilline), possèdent une cassette de résistance à l'ampicilline et une origine de répllication pBR322.
- Les vecteurs pnCS (« C » = pCDF-DUeT et « S » = spectinomycine) possèdent une résistance à la spectinomycine et une origine de répllication CDF.

- Les vecteurs pnYC (« Y » = pACYC11b, « C » = chloramphénicol) possèdent une résistance au chloramphénicol et une origine de réplication p15A.

Ces vecteurs permettent la surexpression d'une protéine d'intérêt sous forme native ou en fusion avec une étiquette, sous le contrôle d'un promoteur T7, dans les cellules bactériennes possédant un système d'expression T7.

Ces vecteurs ont une architecture commune et sont composés, en plus d'un promoteur T7, d'un site de liaison aux ribosomes (RBS), d'une étiquette de purification (His₆, His₁₀, His₁₀- thiorédoxine notée TRX, His₁₀-SUMO ou encore GST) suivie d'une séquence codant pour un site de clivage par une protéase, d'un site de clonage multiple (MCS) contenant les sites *NdeI* et *BamHI* permettant l'insertion du gène d'intérêt et d'un terminateur T7 (Figure 27).

Sont aussi présents sur les vecteurs (i) le gène codant pour l'inhibiteur *LacI* de l'opéron lactose et son site de fixation *lacO*, permettant une expression inductible des protéines avec un analogue non-hydrolysable du lactose, l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) en minimisant les fuites d'expression, (ii) d'une cassette de résistance à un antibiotique, et (iii) d'une origine de réplication bactérienne.

La diversité des vecteurs d'expressions disponible au sein du laboratoire m'a permis de tester différentes combinaisons d'étiquettes fusionnées en parties N- ou C-terminales des protéines étudiées. De plus, ces vecteurs possèdent également différents sites de clivage par des protéases : la thrombine, notée th, ou la HRV 3C Protéase, notée 3C. La série de vecteur la plus récente contient le site de clivage de la protéase 3C, aussi appelé PreScission 3C. Cette enzyme a une activité optimale à 4°C, ce qui est un avantage lors de la manipulation de protéines eucaryotes, majoritairement thermo-sensibles.

Ces vecteurs permettent également la co-expression de plusieurs protéines, car ces vecteurs ont différents marqueurs de résistance, ainsi que des origines de réplifications compatibles (pBR322, p15A et CDF).

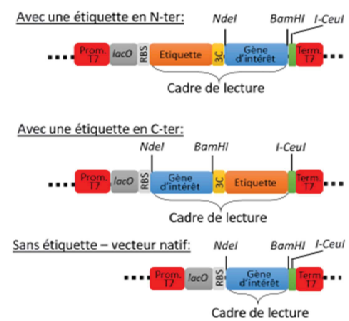
Il m'a également été possible d'effectuer des concaténations de deux gènes sur un même vecteur pour obtenir des constructions polycistroniques étant sous le contrôle d'un même promoteur T7.

Les différents vecteurs disponibles, les cartes des vecteurs fréquemment utilisés dans cette étude et leurs caractéristiques sont présentés dans la Figure 27.

A. Liste non exhaustive des vecteurs d'expression de la série pET-MCN disponibles:

Plamide	Résistance	Origine de répliation	Étiquette en N-ter						Étiquette en C-ter	Natif sans étiquette
			His ₆ -th	His ₆ -3C	His ₁₀ -3C	His ₁₀ -TRX-3C	His ₁₀ -SUMO-3C	GTS-3C		
pnEA	Amp	pBR322	pnEA-His ₆ -th	pnEA-His ₆	pnEA-His ₁₀	pnEA-His ₁₀ -TRX	pnEA-His ₁₀ -SUMO	pnEA-GTS	pnEA-3C-His ₆	pnEA
pnCS	Spec	CDF	/	pnCS-His ₆	pnCS-His ₁₀	pnCS-His ₁₀ -TRX	pnCS-His ₁₀ -SUMO	pnCS-GTS	pnCS-3C-His ₆	pnCS
pnYC	Chlo	p15A	/	pnYC-His ₆	pnYC-His ₁₀	pnYC-His ₁₀ -TRX	pnYC-His ₁₀ -SUMO	pnYC-GTS	pnYC-3C-His ₆	pnCS

B. Constructions et cadres de lecture:



C. Cartes de vecteurs fréquemment utilisés:

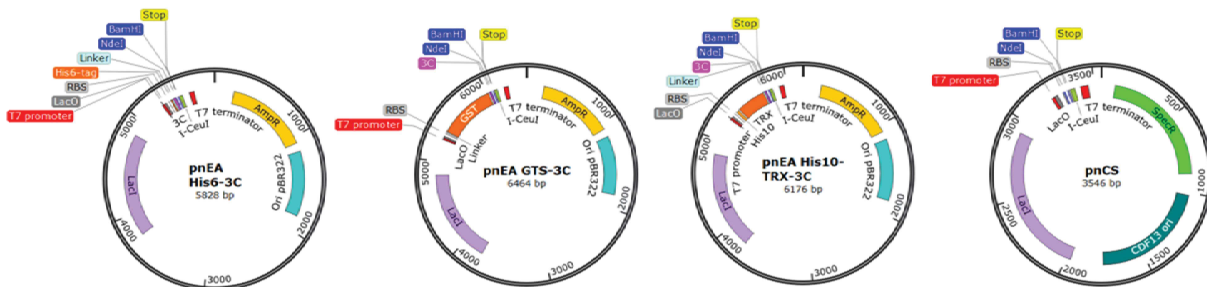


Figure 27 : Présentation des vecteurs de la série pET-MCN

- (A) Tableau des vecteurs utilisés dans cette étude
- (B) Construction de la cassette d'expression et du cadre de lecture
- (C) Cartes des plasmides fréquemment utilisés

B. Méthodes de clonage

La plupart des gènes utilisés dans cette étude sont d'origine humaine, sauf pour certains des histones qui proviennent de *Xenopus laevis*.

Pour cloner nos gènes d'intérêt, j'ai utilisé deux méthodes. La première est appelée assemblage de Gibson. Cette méthode fut décrite par le professeur Daniel G. Gibson dans les années 2010 (Gibson et al. 2009) (Gibson et al. 2010). Elle est basée sur l'utilisation d'une exonucléase, d'une ADN polymérase et d'une ligase, afin d'assembler l'ADN en une seule réaction isotherme. La seconde méthode est un sous-clonage classique en utilisant une méthode de restriction-ligation.

1. Clonage par assemblage Gibson

- a. Réaction de polymérase en chaîne (PCR), permettant d'amplifier les gènes d'intérêt avec les régions homologues aux vecteurs d'expressions

La première étape consiste à réamplifier le gène d'intérêt par PCR. Pour que le clonage par méthode Gibson puisse fonctionner, il est nécessaire que les amorces aient des régions homologues au gène d'intérêt, mais également au futur vecteur d'expression (superposition de 15-20 pb). La construction des vecteurs a été faite de telle sorte que les régions homologues soient identiques pour la majorité des vecteurs. Afin de réaliser toutes les combinaisons possibles (sans étiquette, avec une étiquette en N- ou C-ter), quatre amorces décrites ci-dessous dans le Tableau 9 sont nécessaires. A ces dernières, s'ajoute une région spécifique du gène d'intérêt.

Tableau 9 : Amorces permettant la création des régions homologues aux vecteurs de la série pET-MCN pour le clonage de Gibson

	Séquences 5' - 3'	Code couleur
Amorce sens 3C tag N _{ter}	CTGGAAGTGCTGTTTCAGGGCCCGCATATG	<i>NdeI</i> , <i>BamHI</i> ,
Amorce sens native	GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG	<i>site de clivage</i>
Amorce anti-sens 3C tag C _{ter}	CGGGCCCTGAAACAGCACTTCCAGGGATCC	<i>3C</i> , <i>I-Ceul</i> , <i>RBS</i> ,
Amorce anti-sens native	CCGTTATAGTTAGGTACCCTATTAGGATCC	<i>codons stop</i>

L'amplicon ainsi formé sera composé du gène d'intérêt, bordé de part et d'autre par des régions homologues aux vecteurs. La PCR est réalisée en utilisant comme enzyme l'ADN polymérase haute-fidélité Phusion® (NEB) selon les recommandations du constructeur et le protocole suivant :

	Concentration finale
5X Phusion HF buffer	1X
10 mM dNTPs	200 µM
10 µM amorce sens	0.5 µM
10 µM amorce anti-sens	0.5 µM
Matrice ADN	~25-50 ng
H₂O	qsp 20 µL
Phusion®	1U/50µL de PCR

Paramètres du thermocycleur : 30 cycles PCR

Dénaturation initiale	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale	Stockage
1 min à 98°C	20 sec à 98°C	30 sec à 55°C	30 sec à 72°C	1 min à 72°C	∞ à 4°C

La température d'hybridation est dépendante de la température de fusion (aussi appelée température de demi-dénaturation ou T_m) des amorces et le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier (en général 15 sec/kpb pour la Phusion®).

La taille des amplicons est alors vérifiée sur gel d'agarose 2%. L'ADN est extrait et purifié grâce au kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean up » commercialisé par Macherey-Nagel.

b. Préparation des vecteurs

Les plasmides d'expression ont été linéarisés par digestion avec les enzymes de restriction NdeI FastDigest® et BamHI FastDigest® (ThermoFisher Scientifique) et leurs extrémités déphosphorylées grâce à la phosphatase Fast-AP® (ThermoFisher Scientifique). La digestion a été effectuée dans le tampon FastDigest Green en utilisant 1 U de chaque enzyme pour chaque µg de plasmide pendant 10-15 min à 37 ° C. Les vecteurs ainsi linéarisés ont, comme pour les inserts, été purifiés à partir d'un gel d'agarose.

c. Réaction d'assemblage

Cette réaction permet d'assembler le vecteur linéarisé et le fragment d'intérêt contenant les régions homologues, grâce au mélange de Gibson, qui est composé de trois enzymes (Figure 28).

Tout d'abord une exonucléase 5' va digérer le brin d'ADN de 5' en 3', permettant de libérer le brin en 3' et créant une portion simple brin chevauchante. L'amplicon et le vecteur vont alors pouvoir s'hybrider grâce à leurs régions complémentaires. Une ADN polymérase vient ensuite synthétiser les morceaux manquants entre les deux fragments en y incorporant les désoxyribonucléotides adéquats grâce au brin complémentaire. Pour finir, une ligase vient sceller les brins d'ADN assemblés.

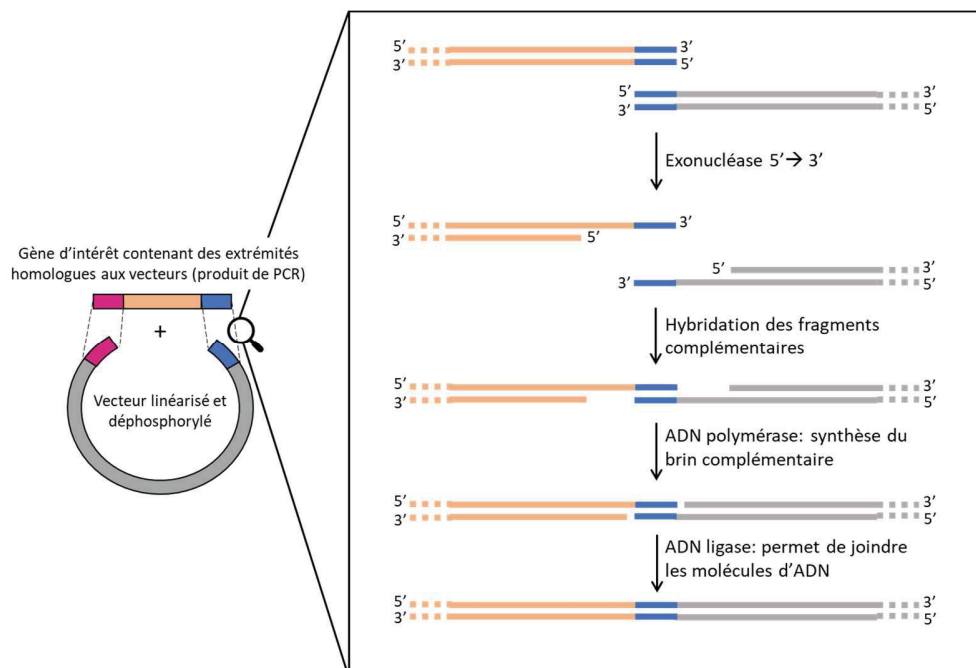


Figure 28 : Principe de la réaction d'assemblage de Gibson

Le rapport molaire vecteur/insert utilisé est de 1:3. Il a été mélangé avec 7 μ L de mélange d'assemblage Gibson, afin d'obtenir un volume final de 15 μ L et incubé 1h à 50°C. Ce mélange Gibson est réalisé au laboratoire à partir des enzymes NEB : T5 exonucléase®, Phusion® DNA polymérase et Taq® ligase. Des bactéries compétentes E.coli DH5 α ont alors été transformées avec ce mélange réactionnel, permettant la sélection et la ré-amplification clonale du plasmide. Après sélection de quelques clones, une extraction de l'ADN par mini préparation (NucleoSpin® Plasmid par Macherey-Nagel) et un séquençage (GATC-Eurofins) sont effectués pour obtenir un plasmide recombinant contenant le gène d'intérêt sans mutation.

2. Sous-clonage par restriction/ligation

Les vecteurs ont été préparés comme décrit précédemment dans la section « préparation des vecteurs » par double digestion *NdeI* et *BamHI* FastDigest et déphosphorylation des extrémités 5' évitant leur re-circularisation.

La plupart des sous-clonages effectués étaient d'un vecteur d'expression à un autre. Ainsi, le vecteur contenant le gène d'intérêt a été réamplifié. L'insert a été extrait par double digestion de 2 µg d'ADN par *NdeI* et *BamHI* FastDigest, en suivant les recommandations du fabricant. Après migration sur gel d'agarose, le fragment correspondant à l'insert a été extrait et purifié grâce au kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean up. La ligation de l'insert et du vecteur a alors été effectuée par la T4-DNA ligase (NEB) en utilisant 25 ng de vecteur et un ratio molaire de 1:3 (vecteur:insert). Pour finir, des cellules DH5α ont été transformées avec les plasmides recombinants, et après mini-préparation, les plasmides recombinants ont été vérifiés par séquençage (GATC- Eurofins).

3. Concaténations polycistroniques

La concaténation des plasmides de la série pET- MCN permet la construction simplifiée et rapide de polycistrons et ainsi l'expression simultanée de plusieurs protéines sous le contrôle d'un même promoteur T7, et cela dans un seul vecteur d'expression. Cette concaténation permet un « copier-coller moléculaire », elle est basée sur la présence du site de restriction très spécifique de la méganucléase *I-CeuI*. Le principe de cette réaction est présenté dans la Figure 29.

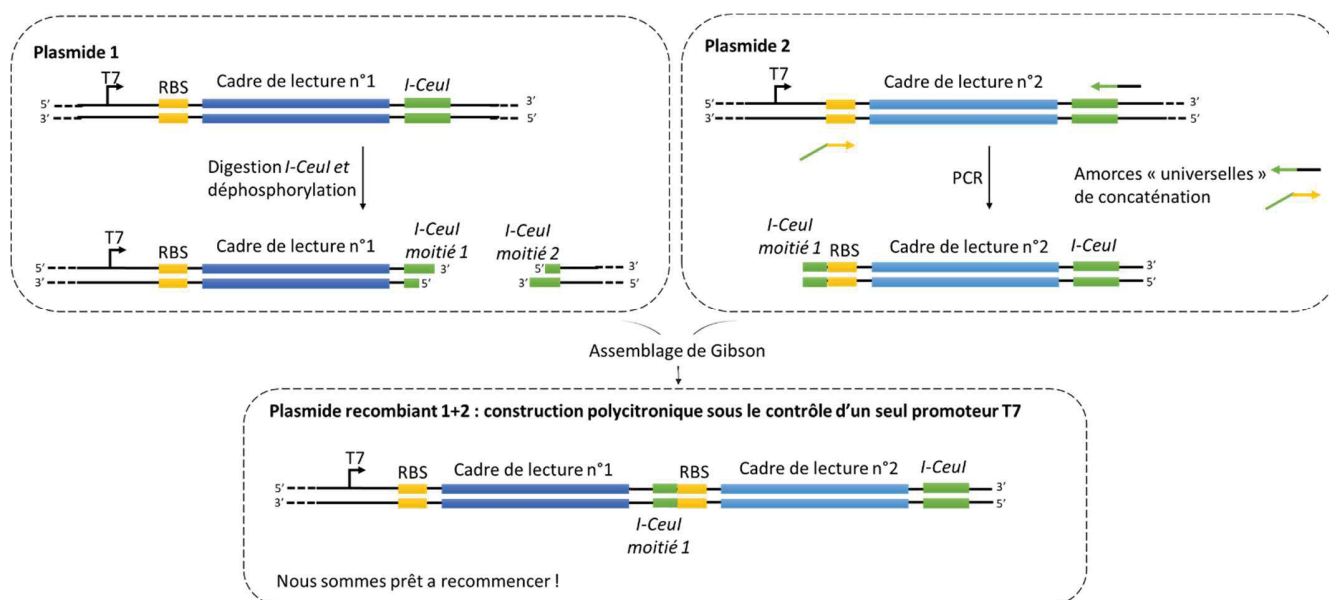


Figure 29 : Principe de la concaténation des vecteurs de la série pET-MCN basée sur le site de restriction *I-CeuI*

D'un point de vue pratique, 1 µg du premier plasmide contenant le premier cadre de lecture est digéré par I-Ceul (NEB) et déphosphorylé par la CIP (NEB) en suivant les recommandations du fabricant. Le vecteur linéarisé est alors migré sur gel d'agarose 1% et purifié grâce au kit NucleoSpin®.

Le cadre de lecture du second plasmide est amplifié par PCR en utilisant la Phusion®, comme décrit précédemment et en utilisant les amorces de concaténations universelles décrites dans le Tableau 10 ci-dessous, qui s'hybrident sur tous les vecteurs de la série pET-MCN.

Tableau 10 : Amorces universelles de concaténation

	Séquence 5' – 3'	Code couleur
Amorce concaténation sens	TAACTATAACGGTCCTAAAATAATTTTGTTA ACTTTAAGAAGGAGATATA	Ceul moitié 1 RBS
Amorce concaténation anti-sens	CCTAGGGCTAGCTCTAGATTCGCTACC	Ceul moitié 2 Vecteur

Le produit de PCR est alors purifié sur gel (NucleoSpin®) et les deux fragments sont assemblés par méthode de Gibson comme décrite précédemment « Clonage par assemblage Gibson ».

Les concaténations effectuées dans le cadre des projets du laboratoire contiennent au maximum quatre cadres de lecture codant pour quatre protéines différentes.

4. Mutagenèse dirigée par « Rolling circle »

La méthode dite de « Rolling circle » permet de réaliser de petites modifications de séquence (insertion, délétion ou mutation) dans une matrice d'intérêt. Pour ce faire, un couple d'amorces complémentaires portant la mutation désirée est utilisé. Ces amorces vont servir à réamplifier l'intégralité du vecteur. On utilise une ADN polymérase très processive et avec un faible taux d'erreur, telle que la Phusion® ou la Q5® (NEB). A la fin de la réaction de PCR, une digestion par l'endonucléase DpnI, permettant d'éliminer l'ADN matriciel est réalisée. Après purification de l'ADN plasmidique, (NucleoSpin® Gel and PCR Clean up) une transformation en DH5α est réalisée et un clone recombinant contenant la mutation désirée est sélectionné.

C. Liste des constructions plasmidiques réalisées et utilisées

Durant ce travail de thèse, de nombreux vecteurs ont été générés. Le Tableau 11 ci-dessous présente une liste non exhaustive des vecteurs que j'ai générés, mais également des vecteurs du laboratoire disponibles avant mon arrivé et que j'ai utilisés.

Tableau 11 : Liste des principaux plasmides générés et utilisés

Liste des plasmides utilisés	Liste des plasmides générés
Paires d'histones $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$	
<p>pnEA hH2B/His6-(th)-hH2A.Z $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA hH2B/His6-(th)-hH2A $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-(3C)-hH2A $\Delta G98 \Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-(3C)-hH2A I79T $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-(3C)-hH2A N89G $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-(3C)-hH2A N94D $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnCS hH2B $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$</p>	<p>pnCS hH2A.Z $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-(th) hH2B $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnYC hH2B $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnCS hH2B/hH2A $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnCS hH2B/hH2A.Z $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnCS hH2A.Z +G98 $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-3C-hH2A.Z T82I $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-3C-hH2A.Z +G98, T82I $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-3C-hH2A.Z T82I, D97N $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-3C-hH2A.Z +G98, T82I, D97N $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$ pnEA His6-3C-hH2A.Z +G98, T82I, G94N, D97N $\Delta N_{\text{ter}}\text{tails}$</p>
Chaperons d'histones	
<p>pnEA His10-TRX-(3C)-hANP32E1 pnEA His10-TRX-(3C)-hANP32E2 pnEA His10-SUMO-(3C)-hANP32E1 pnEA His10-SUMO-(3C)-hANP32E2 pnEA His6-(3C)-hANP32E3 pnEA His6-(3C)-hANP32E4 pnEA His6-(3C)-hANP32E5 pnEA His6-(3C)-hANP32E6 pnEA His6-(th)-hYL1 ZID pnEA His6-(th)- ANP32E FL pnCS ANP32E FL</p>	<p>pnCS GST-(3C)-hYL1 ZID pnCS GST-(3C)-ANP32E1 pnCS GST-(3C)-ANP32E6 pnCS GST-(3C)-ANP32E FL pnYC ANP32E FL</p>
Paires d'histones et histones utilisés pour la formation de l'octamère/nucléosome :	
<p>pnEA hH2B/ His6-(th)-hH2A pnCS hH2B/ hH2A pnEA His6-(th)-xH2A/xH2B pnEA hH2B/ His6-(th)-hH2A.Z pnCS hH2B/hH2A.Z pnEA hH3.1/His6-(th)-hH4 pnEA xH3.1/His6-(th)-xH4 pnCS hH3.1/hH4 pnCS xH3.1/xH4 pnEA His10-TRX-(3C)-xH3/xH4 pnYC xH4-(3C)-His6/xH3 pnEA hH3.1/hH4/hH2B/His6-(th)-hH2A.Z pGEM-3z/601 x12</p>	<p>pnEA His6-(3C)-xH2A/xH2B pnYC xH4-(3C)-His6/xH3 pnEA His6-(3C)-xH3/xH4</p>

CHD1L

pnEA His6-(3C)- CHD1L FL (1-886aa)
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L FL (1-886aa)
pnEA His10-SUMO-(3C)- CHD1L FL (1-886aa)
pnEA GST-(3C)- CHD1L FL (1-886aa)
pnCS CHD1L FL (1-886aa)
pnEA His6-(3C)- CHD1L isoCourt (252-886aa)
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L isoCourt (252-886aa)
pnEA His10-SUMO-(3C)- CHD1L isoCourt (252-886aa)
pnEA GST-(3C)- CHD1L isoCourt (252-886aa)
pnCS CHD1L isoCourt (252-886aa)
pnEA His6-(3C)- CHD1L Nter (1-563aa)
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L Nter (1-563aa)
pnEA His10-SUMO-(3C)- CHD1L Nter (1-563aa)
pnEA GST-(3C)- CHD1L Nter (1-563aa)
pnCS CHD1L Nter (1-563aa)
pnEA His6-(3C)- CHD1L Lobe 1 (1-256aa)
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L Lobe 1 (1-256aa)
pnEA His10-SUMO-(3C)- CHD1L Lobe 1 (1-256aa)
pnEA GST-(3C)- CHD1L Lobe 1 (1-256aa)
pnCS CHD1L Lobe 1 (1-256aa)
pnEA His6-(3C)- CHD1L Lobe 2 (252-563aa)
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L Lobe 2 (252-563aa)
pnEA His10-SUMO-(3C)- CHD1L Lobe 2 (252-563aa)
pnEA GST-(3C)- CHD1L Lobe 2 (252-563aa)
pnCS CHD1L Lobe 2 (252-563aa)
pnEA His6-(3C)- CHD1L Cter (556 - 886aa)
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L Cter (556 - 886aa)
pnEA His10-SUMO-(3C)- CHD1L Cter (556 - 886aa)
pnEA GST-(3C)- CHD1L Cter (556 - 886aa)
pnCS CHD1L Cter (556 - 886aa)
pnEA His6-(3C)- CHD1L CterN (566-700aa)
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L CterN (566-700aa)
pnEA His10-SUMO-(3C)- CHD1L CterN (566-700aa)
pnEA GST-(3C)- CHD1L CterN (566-700aa)
pnCS CHD1L CterN (566-700aa)
pnEA His6-(3C)- CHD1L CterC (705-886aa)
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L CterC (705-886aa)
pnEA GST-(3C)- CHD1L CterC (705-886aa)
pnCS CHD1L CterC (705-886aa)
pnEA His6-(3C)- CHD1L CterPubli (613-886)
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L CterPubli (613-886)
pnEA His10-SUMO-(3C)- CHD1L CterPubli (613-886)
pnEA GST-(3C)- CHD1L CterPubli (613-886)
pnCS CHD1L CterPubli (613-886)
pnEA His6-(3C)- CHD1L FL R392H
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L FL R392H
pnEA GST-(3C)- CHD1L FL R392H
pnCS CHD1L FL R392H
pnEA His6-(3C)- CHD1L isoCourt R392H
pnEA His10-TRX-(3C)- CHD1L isoCourt R392H
pnEA GST-(3C)- CHD1L isoCourt R392H
pnCS CHD1L isoCourt R392H
pnEA GST-(3C)- CHD1L Lobe2 R392H
pnCS CHD1L Lobe2 R392H

II. Tests d'expression et de purification à petite échelle

A. Principe

Les vecteurs d'expression ainsi créés vont permettre la production des protéines ou de complexes protéiques recombinants dans le système d'expression *E. coli*.

Les tests d'expression et de purification à petite échelle, également appelés « Minitests » vont permettre :

(i) Pour des protéines uniques : de déterminer la solubilité des protéines testées et de définir quel tampon favorise leur solubilité. Il sera ainsi possible de choisir la construction avec l'étiquette la plus optimale et le tampon de purification associé.

(ii) Pour des complexes protéiques dans le cadre de reconstitution de complexe par co-expression : d'étudier les interactions entre les différents partenaires, mais également d'analyser quelles étiquettes et positions d'étiquettes sont favorables à la formation des complexes. Il est également possible d'identifier les zones/domaines d'interactions entre les différents partenaires protéiques.

Dans certains cas, la présence du partenaire peut solubiliser ou améliorer la solubilité du second partenaire (co-solubilisation), évitant ainsi les phénomènes d'agrégation. Les interactions protéine-protéine (ipp) peuvent également entraîner des changements conformationnels, modifiant ainsi les propriétés physico-chimiques du complexe considéré. Il est donc essentiel de tester différents tampons car un complexe aura un comportement différent de celui des protéines isolées.

Les minitests sont donc une technologie rapide et robuste, qui permet de tester en parallèle différentes constructions et combinaisons des différents partenaires, ainsi qu'un ensemble de conditions d'expression et de purification. Ils permettent aussi d'optimiser les conditions d'expression (milieu de culture, température et temps d'induction) et les conditions de purification (tampon de lyse, résine d'affinité), grâce à une approche à moyen/haut débit développée au sein de l'équipe (Vincentelli et Romier 2016).

La Figure 30 décrit la procédure globale suivie pour la réalisation des minitests.

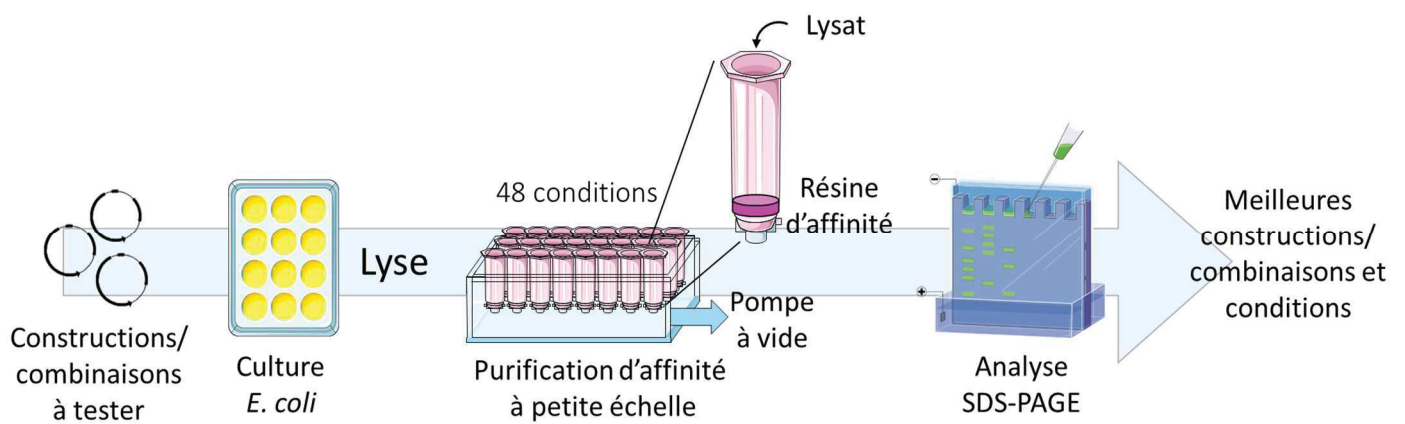


Figure 30 : Principe des tests d'expressions et de purifications à petite échelle et à moyen/haut débit

B. Procédure expérimentale des Minitests :

1. Expression

a. Transformations bactériennes

Pour ce travail, différentes souches bactériennes ont été utilisées. Elles permettent l'expression des protéines d'intérêts et disposent chacune de caractéristiques spécifiques décrites dans l'Annexe 2. Les plus couramment utilisées sont les cellules classiques BL21 (DE3) et les cellules BL21 (DE3) pRARE2. Ces dernières contiennent le plasmide pRARE2, qui code pour des ARN de transfert rares chez *E. coli* mais souvent utilisés chez les eucaryotes. Cela permet d'améliorer l'expression des protéines humaines recombinantes n'ayant pas été codon-optimisées pour l'expression en bactéries.

Pour la transformation, les bactéries compétentes BL21 (DE3) +/- pRARE2 ont été incubées avec 50 ng de plasmide, ou de chaque plasmide dans le cadre d'une co-expression, puis transformées par choc thermique pendant 45 sec à 42 °C. Les cellules sont ensuite placées 2 min sur glace, puis régénérées 60 min à 37°C et étalées sur milieu de sélection adéquat : LB agar supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline ou/et 90 µg/mL de spectinomycine ou/et 34 µg/mL de chloramphénicol.

Afin de faciliter la manipulation, du fait du nombre important de transformations réalisées, l'étalement des bactéries a été effectué sur des plaques 6 puits (FALCON).

b. Culture en milieu liquide

J'ai utilisé des plaques 24 puits ayant une capacité de 10 mL (GE Healthcare), le volume final de culture dans chaque puit étant de 4 mL. De nombreux milieux de cultures peuvent être testés afin d'optimiser l'expression des protéines recombinantes :

- Milieu 2xLB, soit un milieu LB (Luria Broth) doublement concentré,
- Milieu Graffinity® (développé par la société Graffinity Pharmaceuticals GmbH). Il se décompose en deux milieux (A et B), le premier supplémenté en glucose permettant la croissance cellulaire et le second contenant du lactose et de l'IPTG pour l'induction,
- Milieu d'auto-induction TB (Terrific Broth) commercialisé par Formedium.

La composition détaillée de ces milieux est disponible dans l'Annexe 2.

Pour les milieux 2xLB et auto-induit TB, on effectue l'inoculation de 4 mL de milieu avec quelques colonies de la boîte de transformation. Pour le milieu Graffinity®, on inocule 2 mL de milieu A avec quelques colonies. Une ou plusieurs mini-cultures sont ainsi réalisées pour chaque construction transformée.

Les cultures sont incubées à 37°C sous agitation afin d'obtenir une densité optique suffisante avant induction. La procédure d'induction varie selon les milieux :

- Pour le milieu 2xLB, l'induction est réalisée en ajoutant 0.7 à 1 mM d'IPTG, lorsque la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) est égale à ~0,7-0,8.
- Pour le milieu Graffinity®, elle est réalisée par ajout de 2 mL de milieu B contenant du lactose et de l'IPTG, lorsque la DO_{600nm} atteint 1-1,5.
- Le milieu d'auto-induction TB (AI.TB) ne nécessite pas d'ajout d'IPTG car l'induction se fait seule (Studier 2005). La seule manipulation nécessaire est donc le changement de la température lorsque la DO_{600nm} atteint ~0,5. En effet, ce milieu contient une quantité donnée de glucose, lorsque cette source de carbone est épuisée, le lactose présent est alors utilisé. La dégradation du lactose permet la formation d'allolactose, qui en se fixant au répresseur *lac* entraîne l'induction et la synthèse protéique.

Ces densités optiques sont généralement atteintes au bout d'environ 3-4h de culture pour une culture avec un antibiotique, 5-6h pour une culture avec deux antibiotiques et 6-7h pour une culture avec trois antibiotiques ou plus.

Lorsque l'induction est réalisée, la température de l'incubateur est changée. Les températures d'induction testées sont généralement situées entre 16 et 25°C. L'induction est poursuivie durant 12 à 15h.

Les cultures de 4mL en plaque 24 puits sont alors centrifugées 15 min à 4000 rpm et à 4°C. Le surnageant est retiré afin de ne conserver que les culots cellulaires, qui sont alors conservés à -20°C ou utilisés directement.

2. Purification

a. Lyse bactérienne

Les cellules sont resuspendues dans 1,2 mL de tampon de lyse. Il est ainsi possible de tester différents tampons, différents pH, différentes conditions salines,...

La lyse cellulaire est effectuée par sonication grâce à un sonicateur à 4 têtes vibracell 75043 (Bioblock Scientific), en utilisant une amplitude d'onde de 40% et 40 sec de sonication effectives en alternant 2 sec de sonication suivies de 2 sec de pause. Des aliquots peuvent être prélevés dans chaque condition, afin d'analyser l'extrait total (ET) correspondant à l'ensemble des protéines présentes dans la cellule.

Les cellules lysées sont ensuite centrifugées pendant 20 min à 4000 rpm et à 4°C et seul le surnageant correspondant à la fraction soluble est prélevé. Les culots sont conservés afin d'analyser si nécessaire les fractions insolubles.

b. Etape d'affinité

Pour se faire, j'utilise des petites colonnes NucleoSpin® 8-well strips et le system de pompe à vide NucleoVac® 96 Vacuum Manifold commercialisé par Macherey-Nagel. La première étape consiste à positionner les 6 bandes contenant chacune 8 colonnes sur le portoir, permettant ainsi la réalisation d'un réseau de 48 colonnes pouvant se fixer sur la pompe à vide. Les colonnes sont toutes dotées d'un petit filtre permettant de retenir la résine d'affinité. Le mélange commercial de la résine d'affinité choisie est alors distribué à raison de 50 µL par colonne.

Les résines fréquemment utilisées dans cette étude sont :

- la résine Glutathione Sepharose® 4B (Ge Healthcare), permettant la purification des protéines couplées à une étiquette GST,
- la résine TALON® Superflow Metal Affinity Resin (Takara) et plus rarement la résine Ni Sepharose® 6 Fast Flow (Ge Healthcare), permettant la rétention des protéines avec une étiquette poly-histidines.

Les principes de ces purifications, les caractéristiques de ces résines ainsi que leurs avantages et défauts seront discutés dans un prochain paragraphe.

La résine est ensuite lavée et équilibrée dans le tampon de lavage désiré. La résine d'affinité est alors mise en contact avec les fractions solubles après avoir préalablement bouché les colonnes. Les colonnes sont incubées sous agitation verticale pendant 1 à 2 heures en fonction de la résine afin de réaliser un *batch* d'affinité.

Les colonnes sont ensuite débouchées et la fraction surnageante non retenue est enlevée par aspiration. Les colonnes sont lavées trois fois avec 1 mL des différents tampons de lavage testés.

Pour finir, les protéines retenues sur la résine d'affinité sont éluées. Pour ce faire, deux techniques d'élutions peuvent être réalisées :

(i) Une élution totale au bleu de charge ou laemli. Cette technique a l'avantage de décrocher l'intégralité des protéines fixées sur la résine. Cependant, cette technique élue également les protéines liées de manière aspécifique à la résine. Cette méthode est généralement utilisée pour les nouvelles protéines qui n'ont jamais été caractérisées.

(ii) Une élution classique qui dépend de la résine utilisée. Par exemple, l'utilisation d'un tampon contenant de l'imidazole pour l'élution des protéines avec une étiquette poly-histidines, ou encore d'un tampon contenant du glutathion réduit pour les protéines fusionnées à la GST. Cette technique d'élution classique peut être utilisée lors des phases d'optimisation finales avant le passage à grande échelle.

3. Analyse des résultats

L'analyse des résultats se fait par électrophorèse en conditions dénaturantes, SDS-PAGE. Les protéines dénaturées migrent au niveau de leur poids moléculaire.

Pour chaque test réalisé, nous obtenons trois échantillons qui peuvent être analysés :

(i) L'échantillon purifié final, qui contient toutes les protéines éluées,

(ii) La fraction non soluble, contenant l'ensemble des protéines non solubles,

(iii) L'extrait total, qui contient l'ensemble des protéines exprimées solubles ou non.

L'analyse des résultats pour une protéine se fait selon la Figure 31. Le meilleur scénario est lorsque la protéine est exprimée et soluble. Le cas échéant, il suffit de sélectionner les meilleures conditions ou d'effectuer une autre série de minitests pour optimiser d'autant plus les conditions.

En revanche, dans le cas d'une protéine non exprimée ou insoluble, il est nécessaire de poursuivre les minitests et de repenser l'expérience. Il sera alors possible d'utiliser d'autres constructions, avec différentes étiquettes et en variant leurs positions, mais également de tester un panel différent de conditions d'expression et de purification.

Pour un complexe protéique, l'analyse se fait d'une manière similaire dans un premier temps. En effet, il s'agit tout d'abord d'identifier la bande correspondante au partenaire sur lequel l'étiquette a été fusionnée, puis d'identifier la présence des partenaires qui ont éventuellement été co-exprimés et co-purifiés. Il est important de tester diverses combinaisons, en taggant l'un ou l'autre partenaire protéique. En effet, les étiquettes ou leur positionnement peuvent éventuellement entraîner une gêne stérique et nuire à la formation du complexe. Les minitests permettent ainsi de déterminer la combinaison adéquate à la formation d'un complexe robuste (Diebold et al. 2011).

Dans le cas idéal, les minitests permettent de déterminer les meilleures conditions d'expression et de purification. Ces dernières seront alors testées à plus grande échelle.

Cependant, si après plusieurs tentatives de minitests, l'expression en *E. coli* s'avère impossible, il est également envisageable de changer de système d'expression, en utilisant l'expression en cellules d'insecte/baculovirus. Cette approche n'a cependant pas été nécessaire au cours de cette thèse.

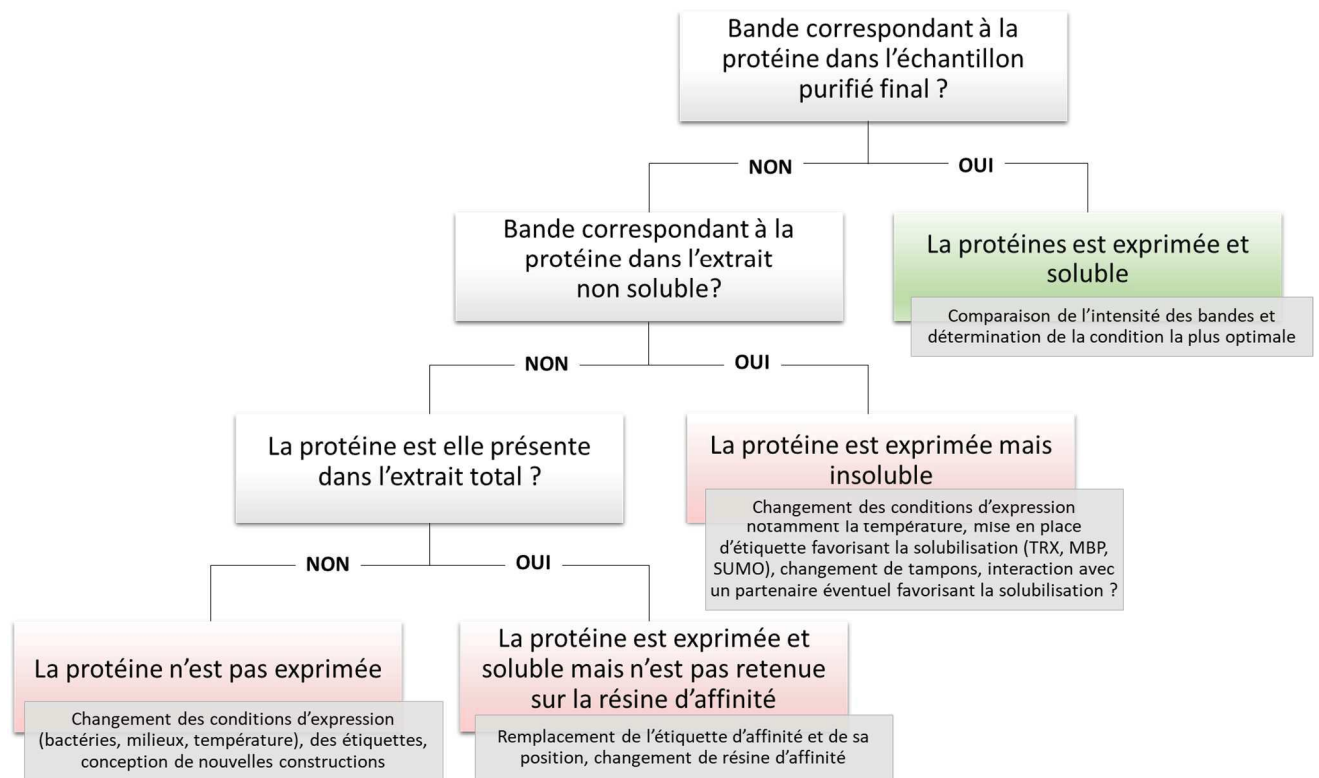


Figure 31 : Interprétation des résultats des Minitests

III. Expression et purification de protéines recombinantes à grande échelle ou « large scale »

La procédure décrite ci-dessus est une procédure standardisée, qui a été optimisée pour chaque protéine ou complexe protéique étudié. Le protocole expérimental propre à chaque protéine, tel que les conditions de production, les tampons et les étapes de purification utilisés seront détaillés dans les parties « Résultats » de ce manuscrit.

A. Production

1. Transformation

Les cellules *E. coli* BL21(DE3) classiques ou pRARE2 ont été incubées avec 50 ng de plasmide, que ce soit pour une expression simple ou pour une co-expression avec plusieurs vecteurs. Elles sont ensuite transformées par choc thermique pendant 45 sec à 42 °C, mis sur glace pendant 2 min et régénérées par ajout de milieu LB pendant 60 min à 37°C. Elles sont ensuite étalées sur le milieu de sélection adéquat (LB agar supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline et/ou 90 µg/mL de spectinomycine et/ou 34 µg/mL de chloramphénicol) et incubées une nuit à 37°C. Quelques colonies sont prélevées et étalées sur plusieurs nouvelles boîtes LB agar supplémentées des mêmes antibiotiques, afin d'être re-amplifiées. Pour ce faire, j'utilise 4 grandes boîtes (145x20 mm) pour inoculer 6 L de culture. Le tapis cellulaire est resuspendu dans du LB afin de réaliser une suspension cellulaire dense, puis les fioles de cultures sont inoculées à partir de cette suspension cellulaire à une DO à 600 nm de 0,1.

Les milieux de culture les plus utilisés sont : le milieu 2xLB ou le milieu AI.TB, tous deux supplémentés du ou des antibiotiques adéquats.

La culture est mise à 37°C, sous agitation (200 rpm), jusqu'à obtention d'une densité optique en phase exponentielle de croissance de 0.7-0,8. La température est alors changée pour la température d'induction (18 - 25°C), les cultures sont alors refroidies à la température d'induction souhaitée et l'expression des protéines est induite par ajout de 0,7-1 mM d'IPTG pour le milieu 2xLB. Pour le milieu d'auto-induction la température est modifiée après obtention d'une DO de 1-1,5. L'induction permettant la production des protéines recombinantes est poursuivie durant 12 à 15 heures.

Pour certaines cultures, notamment celle des histones, l'induction en milieu 2xLB se fait plus tardivement, après la phase exponentielle de croissance vers une DO 600nm ~ 1.0.

Ensuite, les cellules sont récoltées par centrifugation à 4000 g pendant 20 min à 4°C, puis resuspendues dans leur tampon de lyse, à raison de 40 mL pour 1L de culture initiale, et stockées à -20°C ou utilisées directement.

Les premiers tests en *large scale* sont généralement effectués sur 1L de culture, puis sur 3 ou 6L de culture, en fonction de la quantité finale de protéine purifiée désirée.

B. Méthodologie de purification

1. Lyse cellulaire

Les cellules reprises dans un tampon adéquat ont été lysées par sonication. La sonication a été effectuée sur glace 3 x 2 min pour 3 L de culture initiale, soit un volume de 150 mL, avec une amplitude d'onde de 30 % et une pulsation de 0.5 seconde sur un appareil Labsonic Sartorius®. Entre chaque cycle, les échantillons ont été homogénéisés et laissés au repos sur glace durant 2 min.

Le lysat cellulaire a ensuite été centrifugé à 17 000 rpm pendant 1 h à 4°C. Le lysat clarifié ou fraction soluble se situant dans le surnageant a été prélevé, afin d'être incubé avec la résine d'affinité préalablement équilibrée dans le tampon de lyse.

2. Purification d'affinité

a. Principe

Chromatographie d'affinité sur métal immobilisé ou IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) :

Le principe de cette affinité repose sur la capacité de l'étiquette poly-histidine à lier les cations divalents, tels que le Nickel (Ni^{2+}) ou le Cobalt (Co^{2+}). Ces métaux sont chélatés à une résine sépharose. La protéine d'intérêt fusionnée à l'étiquette poly-histidines, présente dans le lysat cellulaire clarifié, se lie à la résine d'affinité, alors que les autres protéines bactériennes ne sont pas retenues et sont éliminées par lavages successifs. À la suite des lavages, la protéine d'intérêt est éluée par compétition avec de l'imidazole ou par clivage de l'étiquette avec une protéase.

Dans le cadre d'une co-expression, si la protéine tagguée interagit avec un partenaire, ce dernier est co-purifié. L'inconvénient majeur de cette technique est que certaines protéines possèdent naturellement des patches/régions riches en poly-histidines ou liant les métaux et peuvent donc se fixer de manière aspécifique.

La résine cobalt est connue pour avoir une spécificité plus élevée que les résines chargées au nickel et permet donc de fournir des protéines de meilleure pureté. C'est cette résine que j'ai majoritairement utilisée.

Résine d'affinité pour les fusions GST :

Le principe de cette purification repose sur l'interaction enzyme-substrat. Dans ce cas, il s'agit de la glutathion S-transférase (GST) et du glutathion (GSH). La protéine recombinante est ainsi fusionnée à la GST et la résine est composée d'une matrice agarose sur laquelle du glutathion a été immobilisé grâce à un linker de 10 carbones. Cette méthode d'affinité permet une purification rapide, non dénaturante et très sélective des protéines fusionnées à la GST. Un désavantage de cette technique réside dans la taille de l'étiquette GST (26 kDa), qui peut éventuellement dimériser ou créer une gêne stérique empêchant la formation du complexe par co-expression. L'élution de la protéine d'intérêt étiquetée avec une GST est effectuée par ajout de glutathion réduit libre (GSH) dans un tampon d'élution tamponné. Il y aura ainsi compétition entre le GSH libre et immobilisé. Etant donné que l'affinité de la GST pour le glutathion libre est supérieure à celle pour le glutathion immobilisé, la protéine se dissocie alors de la matrice et est éluée.

Comme pour les affinités IMAC, l'élution peut également se faire par ajout d'une protéase permettant de cliver l'étiquette GST de la protéine d'intérêt.

b. D'un point de vue expérimental

Deux résines ont été utilisées pour mes purifications en *large scale* : la résine TALON® Superflow Metal Affinity Resin (Takara) et la résine Glutathione Separose® 4B (GE Healthcare). Les résines sont conservées en volume pour volume dans 20% d'éthanol. Le volume de résine utilisée est de 2 mL de mélange commercial, soit 1 mL de résine pure, pour 3L de culture initiale en *E. coli*. Ces volumes sont en concordance avec les capacités de rétention des résines données par les fournisseurs et les rendements des purifications.

La résine est ensuite lavée en eau ultra pure et équilibrée trois fois dans le tampon désiré, en utilisant une centrifugation à basse vitesse (1000 rpm, 2min, 4°C).

Le lysat clarifié et la résine sont incubés en *batch* sous légère agitation pendant 1h pour la résine Glutathione Separose et 2h pour la résine TALON à 4°C.

La fraction non retenue, notée FT pour *flow through*, est éliminée après centrifugation à basse vitesse. La résine est ensuite lavée, en *batch* dans un premier temps, avec 20 volumes de tampon de lavage. L'échantillon est ensuite passé dans une colonne en plastique 10mL Pierce® (ThermoFisher Scientific) et lavée 2 fois supplémentaires avec 10 volumes de tampon de lavage. L'échantillon est ensuite élué dans le tampon d'élution adéquat, en deux temps et en incubant 15 min entre chaque élution, afin d'obtenir un volume final de 0.5 mL ou 5 mL en fonction du nombre de litre de culture initial (1 L ou 3-6L respectivement). L'élution peut également se faire par ajout d'une protéase 3C (His6-3C ou GST-3C purifiées au laboratoire), à raison de 1U de protéase pour 25 µg de protéine à cliver dans un volume final de 5 mL. La

digestion est poursuivie sur la nuit à 4°C sous agitation douce. Pour finir le surnageant contenant la protéine clivée est récupéré.

3. Purification par échangeuse d'ions

La chromatographie par échangeuse d'ions va permettre la séparation des protéines et d'autres molécules en fonction de leur charge nette. Des résines de charge opposée à celle de la protéine sont utilisées. Les protéines ont un caractère amphotère et leur charge nette dépend de leur point isoélectrique (pI), ainsi que du pH du tampon considéré. Si le pH est inférieur au pI, la protéine est chargée positivement, il faudra alors utiliser une colonne échangeuse de cation, chargée négativement. Au contraire, lorsque le pH est supérieur au pI, la protéine est chargée négativement, l'utilisation d'une résine échangeuse d'anions chargée positivement sera alors nécessaire.

Durant ma thèse, j'ai utilisé une colonne échangeuse d'anion fort, HiTrap® Q HP 1 mL (GE Healthcare), branchée sur un système de purification ÄKTA Pure (GE Healthcare). La protéine d'intérêt, après avoir été purifiée par une première étape d'affinité, est diluée dans son tampon pour obtenir une concentration en NaCl de 50 mM. L'échantillon est alors chargé sur la colonne préalablement équilibrée, via la pompe échantillon de l'ÄKTA. La colonne est ensuite lavée avec 20 volumes de colonne (VC) du tampon d'équilibration, puis l'échantillon est élué grâce à un gradient de NaCl allant de 50 à 1000 mM.

Cette étape de purification n'est pas forcément mise en œuvre. En effet si la pureté de l'échantillon après l'étape d'affinité est suffisante, l'échantillon peut être directement injecté sur chromatographie d'exclusion stérique. Pour la purification de CHD1L, cette étape a été essentielle afin d'éliminer l'ADN contaminant.

4. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique également appelée filtration sur gel ou gel filtration, permet de séparer les molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Les gel filtrations sont très utilisées comme dernière étape de purification. Elles permettent notamment de séparer les formations oligomériques non désirées, tels que les agrégats, mais également de changer de tampon de manière progressive.

Nous disposons au laboratoire de plusieurs types de gel filtrations :

- Les gel filtrations analytiques : Superdex® 200 10/300 GL (gamme de séparation 10 à 600 kDa) ou Superdex® 75 10/300 GL (gamme de séparation 3 à 70 kDa) de GE Healthcare. Ces colonnes ont un volume de résine de 24mL et permettent une injection maximale de 0.5 mL d'échantillon. Ces colonnes sont donc utilisées pour les

premières caractérisations en *large scale* et le plus souvent l'échantillon ne provient que d'1L de culture initiale.

- Les gel filtrations préparatives : Superdex® 200 16/600 ou Superdex® 75 16/600, les gammes de séparation de ces colonnes sont toujours de 10-600 et 3-70 kDa respectivement. Ces colonnes ont un volume de résine de 124mL et permettent une injection maximale de 5 mL d'échantillon (provenant généralement de 3 à 6L de culture initiale). Elles permettent la purification d'une grande quantité de protéine, qui pourra être utilisée pour les caractérisations biophysiques et structurales.

Toutes ces colonnes sont branchées sur un système de chromatographie ÄKTA Pure (GE Healthcare).

5. Concentration et vérification

La protéine / le complexe protéique d'intérêt est alors concentré à l'aide d'un concentrateur Amicon® Ultracell (Millipore) dont la taille des pores (*cut off*) est adaptée à l'échantillon. La concentration se fait de manière progressive à 2500-3500 rpm en mélangeant l'échantillon toute les 2 min. En effet, de nombreuses protéines étudiées ont tendance à précipiter lors de cette étape. La concentration finale obtenue dépend donc de la protéine étudiée et de son seuil de précipitation. Dans certains cas, le facteur limitant est également la quantité de protéine produite. En effet, les purifications des protéines sur lesquels j'ai travaillé impliquent des protéines complexes, qui ont souvent un rendement faible même après optimisation (<0.5 mg/L de culture initial).

Afin de s'assurer de la qualité de la protéine obtenue, toutes les étapes de la purification sont vérifiées sur gel SDS-PAGE en condition dénaturante. Cela permet un suivi de la protéine au cours de la purification et de détecter les étapes critiques, entraînant une perte de la protéine et ainsi d'optimiser le protocole de purification.

6. Inconvénients et avantages du système d'expression *E. coli*

Le système d'expression en bactéries possède de nombreux avantages. C'est une approche peu onéreuse, rapide à mettre en œuvre et qui permet, dans la plupart des cas, la purification d'une grande quantité de protéines. Elle permet également l'utilisation de poly-cistrons, très pratique dans le cadre de la co-expression et co-purification de complexes protéiques. De plus, dans ce système procaryote, il n'y a pas de modifications post-traductionnelles (PTMs), ni de glycosylation, à l'inverse des systèmes eucaryotes. Cela permet ainsi d'obtenir des protéines plus homogènes. Cette méthode est donc particulièrement adaptée à mes sujets de thèse et de manière plus générale aux études structurales par cristallographie nécessitant de grandes quantités de protéines purifiées et homogènes.

Cependant, ce système possède également des inconvénients. En effet, comme évoqué précédemment la protéine recombinante n'aura pas PTMs, ni de glycosylation, pouvant être un paramètre déterminant à la solubilité de la protéine, mais également à son étude *in vivo*. Ces aspects sont également cruciaux pour la production de produits pharmaceutiques destinés à être administrés chez l'Homme.

IV. Caractérisation biophysique

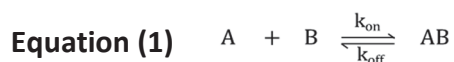
A. Caractérisation des interactions protéine-protéine (ipp)

1. Principe de la caractérisation et la quantification de ipp

Les ipp sont d'une importance capitale dans la totalité des processus cellulaires, d'où la nécessité de les caractériser. Les ipp peuvent être décrites par différentes constantes, qui reflètent la force d'interaction ou encore les cinétiques d'association/de dissociation du complexe.

La plus connue est la constante de dissociation à l'équilibre, ou K_D . En effet, tous les systèmes tendent vers un équilibre, l'état le plus stable. Le K_D reflète la force d'une interaction et permet ainsi la quantification de l'affinité de liaison. Plus la valeur K_D est basse, plus l'affinité de liaison entre les deux partenaires est élevée. Cette affinité est influencée par la combinaison de différentes forces, comme les liaisons hydrogènes, les forces de Van der Waals (interactions électrostatiques) et des effets hydrophobes.

Si nous considérons l'équation (1) qui décrit la formation d'un complexe AB à partir de molécules A et B.



Le K_D associé à cette réaction peut alors s'écrire sous la forme de l'équation (2).

Equation (2)
$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[A] \times [B]}{[AB]}$$

La constante de dissociation à l'équilibre (K_D), qui correspond à l'inverse de la constante d'association (K_A), dépend des concentrations de molécules A et B libres en solution, ainsi que de la concentration de complexe AB formé à l'équilibre. Le K_D est également lié aux constantes cinétiques d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) du complexe. Ces constantes nous informent sur la dynamique du système, en nous fournissant les vitesses avec lesquelles le complexe se forme et se dissocie.

Un complexe peut également être caractérisé par ces paramètres thermodynamiques : l'enthalpie H, l'entropie S et l'énergie libre de Gibbs G.

L'enthalpie, notée H, permet d'évaluer l'énergie interne d'un système, correspondant à une quantité de chaleur absorbée. Lorsque la variation d'enthalpie est négative, $\Delta H < 0$, la réaction

est exothermique et produit de la chaleur. Inversement lorsque la variation d'enthalpie est positive, $\Delta H > 0$, la réaction est endothermique et absorbe de la chaleur.

Le second paramètre thermodynamique est l'entropie, notée S . Cette variable mesure le degré de désordre d'un système.

Les fonctions d'état ΔH et ΔS , permettent d'obtenir des informations sur les événements moléculaires et les mécanismes de liaison. Le ΔH d'une interaction est le résultat de toutes les influences positives et négatives de la liaison (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques et Van des Walls). Le ΔS permet de transcrire le degré global de liberté conformationnelle lors de la formation du complexe et l'établissement d'interactions hydrophobes.

Ces deux paramètres thermodynamiques ΔH et ΔS , en lien avec la température, notée T , permettent de décrire la variation d'énergie libre de Gibbs, aussi nommée enthalpie libre, ou ΔG , comme montré dans l'équation 3.

Équation (3) $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

L'énergie libre de Gibbs est la fonction d'état la plus importante d'un système. Elle traduit l'énergie libre du système et sa variation mesure la quantité d'énergie disponible, permettant ainsi de déterminer la spontanéité d'un processus. Ainsi, si ΔG est négative, la réaction est spontanée et qualifiée d'exergonique, le système est favorable à la formation du complexe AB. Inversement si ΔG est positive, la réaction est endergonique et non spontanée, les partenaires A et B non liés seront donc plus stables et il n'y aura pas de formation du complexe AB.

L'énergie libre de Gibbs est également liée à l'affinité de liaison par la loi d'action de masse, telle que décrit dans l'équation (4).

Équation (4) $\Delta G = RT \times \ln(K_D)$

Par conséquent, une affinité extrêmement élevée n'est atteinte que lorsque l'enthalpie et l'entropie contribuent de manière optimale à la liaison. L'affinité de liaison maximale se produit lorsque la variation d'énergie libre (ΔG) est très négative.

Il est donc important d'étudier le profil thermodynamique d'un complexe, qui compile les paramètres ΔH , ΔS et ΔG afin d'obtenir des informations sur le mécanisme de liaison. Il est ainsi possible de voir rapidement quelles sont les forces qui contribuent à la liaison et si l'interaction est portée par l'enthalpie ou l'entropie (*enthalpy or entropy driven*).

Ces approches sont notamment critiques pour l'étude et l'optimisation de petites molécules, comme des candidats médicaments. En effet, il est essentiel de déterminer la signature thermodynamique d'un composé afin de comprendre quelles forces contribuent à la liaison et pouvoir ainsi optimiser le composé. On pourra par exemple augmenter l'affinité d'un composé en minimisant les pertes d'entropie conformationnelles et/ou en augmentant le nombre de liaisons favorables, comme les liaisons hydrogènes. Il est également important de

caractériser les paramètres cinétiques, afin d'estimer le temps d'action d'une molécule et à terme la dose et la fréquence d'administration d'un médicament.

2. Comparaison des techniques biophysiques existantes

Il existe de nombreuses techniques permettant l'étude des IPP. On trouve entre autres, la résonance plasmonique de surface (SPR), la titration calorimétrique isotherme (ITC), la *Bio-Layer Interferometry* (BLI), la thermophorèse à micro-échelle (MST) ou encore l'anisotropie de fluorescence (FA). Ces techniques permettent la détermination de l'affinité de liaison mais également en fonction de la technique utilisée, des constantes cinétiques et/ou thermodynamiques.

Toutes ces techniques possèdent des avantages et inconvénients, décrits dans le Tableau 12.

A ce jour, la seule approche permettant de déterminer directement la contribution des paramètres thermodynamiques est la titration calorimétrique isotherme (ITC). Pour la plupart des autres techniques, ces paramètres peuvent être déterminés de manière indirecte en effectuant plusieurs mesures à différentes températures.

La technique la plus utilisée pour la détermination des constantes cinétiques reste à ce jour la SPR. Cependant la BLI, moins connue, permet les mêmes prestations en restant moins onéreuse. De plus, grâce au développement de nouveaux logiciels comme « KinITC », il est maintenant possible d'extrapoler des paramètres cinétiques des expériences d'ITC.

Tableau 12 : Comparaison de différentes techniques biophysiques pour la caractérisation des ipp

	Principe	Paramètres mesurés	Avantages	Inconvénients
ITC	Titration en solution d'un premier partenaire dans une cuve avec un second partenaire, injecté au fur et à mesure jusqu'à obtention de la saturation. (cf. partie « Titration calorimétrique isotherme ou ITC »)	Affinité, paramètres thermodynamiques, stœchiométrie	- Interaction en solution - Pas de marquage	-Grande quantité et concentration de protéine -Tampon strictement identiques -Fragilité de la seringue d'injection
SPR	Le premier partenaire (ligand) est immobilisé sur une puce composée d'une surface en or. Le second partenaire (l'analyte) est injecté sur cette puce via un système de microfluidique. (cf. partie « La résonance plasmonique de surface (SPR) »)	Affinité, Cinétique, stœchiométrie	-Faible quantité et concentration de protéines -Mélange de tampon possible	-Immobilisation du ligand -Mise en place longue (préparation de la puce) -Interaction aspécifiques avec la puce -Système de microfluidique nécessitant de l'entretien
BLI	Un ligand est immobilisé sur le bio-senseur (ou biocapteur), qui est ensuite trempé dans une solution contenant le second partenaire, l'analyte. La BLI est une méthode optique. Elle analyse de la différence de réflexion de la lumière (interférences) en présence et en l'absence de l'interactant, créant une différence d'épaisseur sur le biocapteur.	Affinité, Cinétique	-Faible quantité et concentration de l'échantillon -Mélange de tampon possible -Rapide à mettre en œuvre	-Immobilisation du ligand -Interaction aspécifique avec le bio-senseur
MST	Les deux interactants sont mélangés et placés dans des capillaires : le premier partenaire (quantité fixe) et incubé avec différentes concentrations (gamme) du second partenaire, qui est lié au fluorophore. La MST est une méthode qui combine détection de fluorescence et thermophorèse. Le mouvement des molécules le long d'un gradient de température microscopie dans le capillaire est mesuré. La variation de fluorescence permet de détecter les changements liés à l'interaction, et permet grâce à la gamme la détermination du K_D .	Affinité	-Mise en place rapide -La fluorescence interne des tryptophanes peut être utilisée	-Utilisation fréquente d'un fluorophore (la protéine marquée doit être monodisperse) -Interaction aspécifique avec le fluorophore -Interaction en capillaires
FA	Les deux interactants sont mélangés et placés dans une plaque : le premier partenaire (quantité fixe) et incubé avec différentes concentrations (gamme) du second partenaire, qui est lié au fluorophore. La dépolarisation de fluorescence est alors mesurée au cours du temps. Elle dépend de l'échantillon (mouvement brownien,...) mais est principalement causée par la rotation par diffusion des fluorophores. Par exemple, si un complexe est formé, il tournera moins vite et la lumière sera faiblement polarisée. En revanche, si la protéine marquée n'est pas fixée, elle tournera rapidement et la lumière sera fortement dépolarisée. L'anisotropie sera alors plus faible.	Affinité	-Mise en place rapide -La fluorescence interne des tryptophanes peut être utilisée	-Utilisation fréquente d'un fluorophore -Lecture en plaque

B. Titration calorimétrique isotherme ou ITC

L'ITC est une technique de référence utilisée dans les études quantitatives d'interactions biomoléculaires. De nos jours, c'est la seule technique qui permet de mesurer directement l'affinité de la liaison (K_D), avec une sensibilité allant du millimolaire au nanomolaire (~ 1 nM), et qui permet également de déterminer les paramètres thermodynamiques (ΔG , ΔH , ΔS), ainsi que la stœchiométrie de l'interaction correspondant aux nombres de sites de liaison. L'ITC a l'avantage de se faire en solution et ne nécessite pas l'immobilisation d'un des partenaires, ni la modification d'un des partenaires par une étiquette ou un fluorophore (*label-free*). Cette méthode s'applique aussi bien aux protéines, qu'aux acides nucléiques, lipides ou autres petites molécules (Falconer 2016).

L'expérience d'ITC est effectuée dans un espace fermé (système adiabatique) à température contrôlée et sous pression constante.

L'ITC repose sur la mesure directe de chaleur libérée ou absorbée durant un événement de liaison entre biomolécules. Le premier partenaire est situé dans la cellule échantillon, le second partenaire dans la seringue. La protéine de la seringue est alors injectée au fur et à mesure dans la cellule échantillon sous agitation constante. Cette protéine diffuse dans l'ensemble de la cellule, et va alors pouvoir s'associer à son partenaire. La titration se poursuit jusqu'à saturation de la protéine présente dans la cellule. Cette interaction va créer à chaque injection une différence de température (exothermique ou endothermique), qui sera compensée par l'appareil. En effet, l'appareil est composé en plus de la cellule échantillon, d'une cellule de référence contenant de l'eau. L'appareil va alors maintenir les deux cellules à températures identiques ($\Delta T \sim 0$), il y aura alors injection d'énergie sous forme d'un courant afin de compenser les variations de températures provoquées par la réaction de formation du complexe. L'appareil enregistre les variations d'intensité du courant de réaction (ou DP pour différence de potentiel), qui sont représentées par des pics de valeur négative pour une réaction exothermique ou de valeur positive dans le cas d'une réaction endothermique. Chaque pic correspond ainsi à une injection. A la fin de l'expérience, un plateau de saturation est atteint, le second partenaire est alors en excès dans la cellule échantillon. Les pics sont ensuite intégrés et tracés en fonction du ratio molaire. Ce graphique permet la détermination du ΔH (et par extrapolation du ΔS et ΔG), du K_D et de la stœchiométrie.

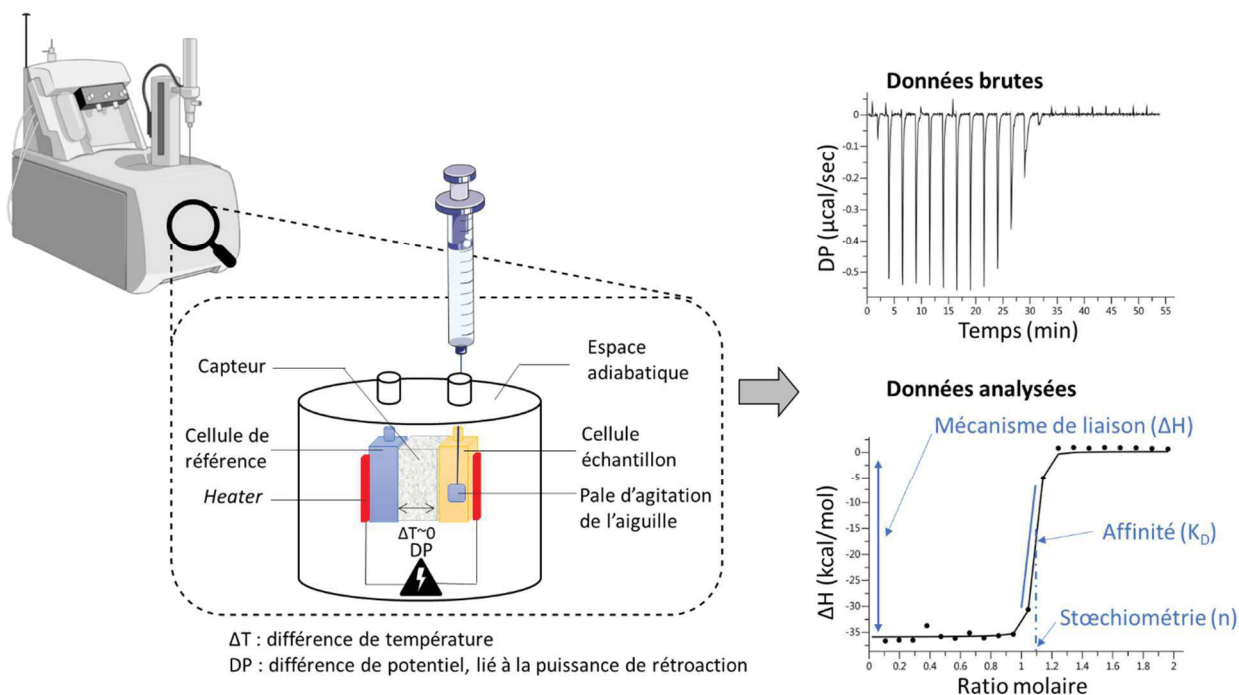


Figure 32 : Principe de la titration calorimétrique de l'appareillage à l'analyse des données
 Panel de gauche : représentation schématique des différents composants du calorimètre
 Panel de droite : analyse des résultats. Le ΔH correspond à la variation entre la plus haute et la faible valeur d'enthalpie. L'affinité correspond à la pente de courbe et le centre de cette courbe permet de déterminer la stœchiométrie de l'interaction.

Durant cette thèse, deux appareils ont été utilisés : MicroCal iTC200 et MicroCal PEAQ-ITC (Malvern). Les expériences d'ITC ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Eric ENNIFAR à l'IBMC de Strasbourg, avec l'aide de Mme Cyrielle SILVA-DA-VEIGA et M. Philippe WOLFF. Les expériences ont été effectuées à 25°C avec dans la cellule échantillon les paires d'histones à une concentration de 10 μM et dans la seringue les chaperons d'histones à une concentration de 90 μM . 27 injections ont été réalisées avec un volume de 1,5 μL et d'une durée de 3 sec, chaque injection a été espacée de 150 sec.

C. La résonance plasmonique de surface (SPR)

La SPR est une technique biophysique permettant de mesurer les ppi par méthode optique. Le premier partenaire (ligand) est immobilisé sur une puce composée d'une surface en or. Le second partenaire (l'analyte) est injecté sur cette puce, via un système de microfluidique. Les variations de l'indice de réfraction à la surface d'une puce en or, en présence et en l'absence

de l'analyte, sont alors mesurées. Pour ce faire, les photons viennent frapper la puce et sont convertis en une densité électronique de surface (plasmons), qui ne réfracte plus la lumière. D'un point de vue pratique, les mesures de SPR et leurs analyses ont été effectuées par Mme Camille KOSTMANN ingénieure responsable de l'appareil. Les mesures ont été effectuées sur un appareil Biacore T200 (GE Healthcare -Biacore), en utilisant une puce de type CM5. De manière exceptionnelle les détails techniques de ces expériences seront détaillés dans la partie résultat.

D. La diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière ou DLS permet de mesurer rapidement la distribution de la taille des particules en solution. Ainsi, il est possible de déterminer la polydispersité d'un échantillon en solution correspondant à l'homogénéité de l'échantillon. Pour ce faire, un laser vient traverser la solution, ce qui permet de quantifier les fluctuations dynamiques de la lumière diffusée au cours du temps et de calculer un coefficient de diffusion propre à l'échantillon. Par exemple, plus les particules sont grosses moins elles sont mobiles, l'intensité diffusée variera donc moins vite au cours du temps que pour des particules plus petites, ayant une plus forte mobilité.

Pour réaliser mes expériences, j'ai utilisé l'appareil DLS DynaPro NanoStar (Wyatt). Les échantillons ont été centrifugés 15 min à 15000 g et à 4°C avant toute mesure, afin d'éliminer les éventuels agrégats. Les mesures ont été réalisées dans des cuvettes en plastique ou en quartz, selon le volume d'échantillon disponible.

E. Nano fluorimétrie à balayage différentiel ou NanoDSF

Cette technique combine la détection de fluorescence et la thermophorèse. Elle permet de déterminer la température de fusion (T_m) d'une protéine et ainsi d'estimer sa stabilité. Cette méthode ne nécessite pas de marquage de la protéine, car elle utilise la fluorescence intrinsèque des tryptophanes et des tyrosines, afin de suivre le dépliement des protéines. Le ratio des intensités de fluorescence 350 et 330 nm permet donc de suivre le dépliement de la protéine, en suivant le changement d'environnement des tryptophanes et des tyrosines.

L'échantillon est placé dans un capillaire. La puissance du laser d'excitation est alors réglée de manière à avoir entre 5000 - 20000 coups. L'appareil chauffe alors ce capillaire, à l'aide du laser en augmentant la température d'un degré par minute jusqu'à atteindre 95°C, tout en suivant la fluorescence à 350 et 330 nm en temps réel.

Durant ma thèse, j'ai utilisé l'appareil Prometheus NT.48 (Nanotemper). Cette technique a été utilisée pour comparer la stabilité de plusieurs constructions d'une même protéine, mais également la stabilité de complexes ou encore comparer différents tampons.

F. Ultracentrifugation analytique ou AUC

L'Ultracentrifugation Analytique (AUC) permet d'étudier les macromolécules en solution, en les soumettant à une force centrifuge. Deux méthodes d'AUC peuvent être mises en œuvre sur la plateforme biologie et génomique structurale de l'IGBMC : la vitesse de sédimentation (AUC-SV) ou l'équilibre de sédimentation (AUC-SE).

L'AUC-SV permet de mesurer la vitesse de sédimentation (équation de Svedberg) des protéines soumises à une force centrifuge générée dans une centrifugeuse. La vitesse de sédimentation dépend des paramétrages de l'instrument mais également des propriétés de la protéine et des caractéristiques de son tampon. La AUC-SV permet ainsi la validation de l'homogénéité de l'échantillon, la quantification de la proportion d'agrégats mais renseigne également sur l'état oligomérique de l'échantillon et sur la distribution des tailles en solution utile dans le cadre de complexes multiprotéiques.

L'AUC-SE utilise les mêmes principes que l'AUC-SV. Cependant l'expérience est effectuée avec plusieurs vitesses de centrifugation plus faibles. Cela permet d'obtenir un équilibre entre la force de sédimentation et la force opposée de diffusion (rétrodiffusion) et ainsi d'atteindre un équilibre de concentration pour chaque type de protéine présente en solution. L'AUC-SE est cependant plus difficile à mettre en œuvre car elle nécessite des échantillons beaucoup plus purs et homogènes. L'AUC-SE, permet donc en plus de la validation de l'homogénéité d'un échantillon, une détermination plus exacte de la masse moléculaire, mais également la caractérisation des équilibres de liaison, comme les transitions monomère-dimère ou les interactions entre différentes protéines.

Dans mon projet de thèse, l'AUC a été utilisée pour analyser l'échantillon His10-TRX-ANP32E1 (ZID). Une ultracentrifugeuse ProteomeLab[®] XL-1 (Beckman Coulter) a été utilisée.

Pour l'AUC-SE, l'échantillon a été concentré à une DO 280nm ~ 0.26 (recommandée 0.1 à 0.3) et 3 vitesses de centrifugation ont été utilisées 18K, 27K et 32K rpm.

Pour les expériences d'AUC-SV, l'échantillon a été concentré à une DO 280nm ~ 0.7 (recommandée 0.3 à 1.2), et une vitesse de centrifugation de 50K rpm a été utilisée.

V. Caractérisation structurale

A. Cristallisation

Afin de pouvoir déterminer la structure 3D des protéines que j'étudie par la méthode de cristallographie par diffraction aux rayons X, une étape préalable est indispensable : la cristallogenèse.

1. Essais de cristallisation pour CHD1L

Des essais de cristallisation ont été effectués pour différentes constructions de CHD1L. Pour ce faire, j'ai utilisé des plaques MRC2 de 96 puits et les conditions de criblage disponibles sur la plateforme de biologie et génomique structurale de l'IGBMC. Parmi ces conditions de criblage, j'ai notamment utilisé le « screen TOP 96 » commercialisé par Anatrace qui combine les 96 conditions les plus représentées parmi tous les dépôts de la Protein Data Bank (PDB). Le volume de précipitant dans le réservoir était de 50 μ L. Les gouttes de cristallisation ont été préparées à l'aide du robot de cristallisation Mosquito (TTP Labtech) par méthode de diffusion de vapeur sur goutte assise. Les gouttes ont été formées par mélange précipitant : protéine, de 100 nL : 100 nL ou 100 nL : 200 nL, afin de concentrer d'avantage la protéine.

Les plaques sont ensuite scellées par un film transparent et incubé à 20°C dans le robot Rock Imager® de Formulatrix. Ce robot permet le suivi de l'évolution par prise automatique de clichés des gouttes de cristallisation dans un environnement sous température contrôlée.

2. Traitement du jeu de données du chaperon ANP32E6 -LRR

La cristallisation ainsi que l'acquisition du jeu de données pour la protéine ANP32E6 (LRR) ont été réalisées avant mon arrivée par les membres de l'équipe. L'acquisition du jeu de données a été effectué sur la ligne Proxima 1 du synchrotron SOLEIL (détecteur : Pilatus 6M de Dectris). La protéine ANP32E6 a été concentrée à 11 mg/mL et les conditions de cristallisation qui ont permis l'obtention de cristaux étaient les suivantes : 0.1 M Cacodylate de sodium pH7, 28% PEG 3350, et 0.2 M Formiate de sodium. La cryo-protection a été effectuée dans les mêmes conditions que celles de cristallisation supplémentées avec 20% PEG200.

La résolution de la structure n'avait cependant pas été effectuée lors ce que j'ai repris le projet, je l'ai donc réalisée. Les données de diffractions ont tout d'abord été traitées à l'aide du programme XDS (Kabsch 2010), puis Aimless (suite CCP4, (Collaborative 1994)). La structure a ainsi été résolue par remplacement moléculaire, en utilisant Phénix (Adams et al. 2002; 2010) et comme modèle la région riche et répétée en leucine (LRR) de ANP32A (identifiant PDB : 4XOS). Les cristaux appartiennent au groupe d'espace P_1 .

B. Microscopie électronique en coloration négative

Des analyses par coloration négatives ont également été mises en œuvre afin de vérifier la qualité des nucléosomes reconstitués.

La coloration négative est une technique de microscopie électronique en transmission (MET) qui permet d'obtenir une image à fort contraste de l'échantillon considéré. Pour cela, un « moulage » de l'échantillon est réalisé à l'aide d'une solution de sels d'uranium. La variation d'épaisseur en métaux lourds due à la présence ou à l'absence de biomolécules entraîne une forte variation de la diffusion du faisceau d'électrons, contribuant au contraste de l'image.

De manière pratique, les grilles de carbone CF300-CU-50 (Electron Microscopy Sciences) sont tout d'abord traitées par décharge de plasma (80% d'argon et 20% d'oxygène) durant 30 sec sur un appareil Model 1070 NanoClean (Fischione instruments) afin de rendre la surface de la grille hydrophile et de permettre l'adsorption de l'échantillon. 5 μ L d'échantillon de nucléosome H2A ou variant H2A.Z (gamme de dilution : 0.3 μ M à 0.03 μ M) sont ensuite mélangés à 0.5 μ L de glutaraldéhyde 1%, et déposés sur grille. Au bout d'1 min l'excédent est absorbé grâce à un papier filtre. 10 μ L de colorant, une solution d'acétate d'uranyle à 2%, sont ensuite déposés sur la grille et laissés 1 min. L'excédent est absorbé avec du papier filtre, l'opération de coloration est effectuée une seconde fois. Les échantillons ainsi colorés sont analysés à l'aide du microscope Tecnai F20 (FEI).

Chapitre 3 :

Interaction du variant d'histone H2A.Z avec ses chaperons YL1 et ANP32E

Chapitre 3 : Interaction du variant d'histone H2A.Z avec ses chaperons YL1 et ANP32E

I. Introduction

A. Le variant d'histone H2A.Z

1. Vue d'ensemble

Le variant d'histone H2A.Z a été identifié en 1980, grâce aux travaux de Michael H.P. West et William M. Bonner (West et Bonner 1980). Il fait partie des variants d'histone les plus étudiés. Le variant d'histone H2A.Z est un variant essentiel présent chez tous les eucaryotes (Ioualen, Moreau, et Méchali 1996). Il est hautement conservé avec ~90% d'identité de séquence entre les différents organismes (Suto et al. 2000).

H2A.Z partage une homologie élevée de 60 % avec H2A, mais diffère au niveau de son extrémité N-terminale, des boucles L1 et L2 et de sa queue C-terminale, en particulier au niveau de son hélice α -C, comme le montre la Figure 33. Cela suggère des fonctions uniques et importantes pour H2A.Z (Zlatanova et Thakar 2008).

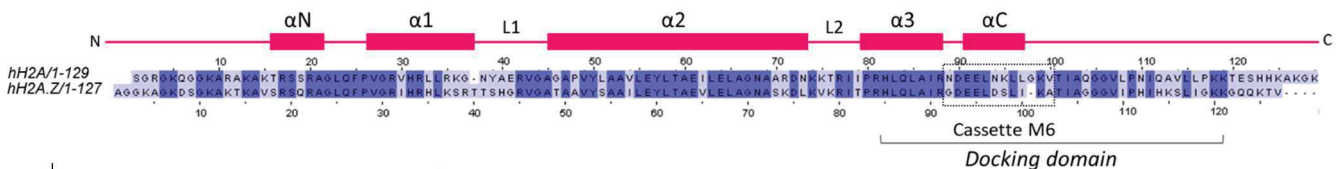


Figure 33 : Alignement de séquence entre hH2A et hH2A.Z

L'alignement a été réalisé en utilisant Jalview 2.11.1.0 et coloré en utilisant la méthode par pourcentage d'identité. Les séquences des histones proviennent de la base de données NCBI avec les numéros d'accès suivants : H2A NP_003501.1 et H2A.Z.1 NP_002097.1

Une partie du domaine d'ancrage (docking domain) de H2A.Z, nommée cassette M6, est nécessaire aux fonctions de H2A.Z et à la survie chez la Drosophile (Clarkson et al. 1999). Cette cassette M6 contient le motif de séquence « DEELD » caractéristique de H2A.Z au niveau de l'hélice α -C. En comparaison, l'histone canonique H2A contient le motif « DEELN ».

H2A.Z contient également une délétion d'un acide aminé « G » dans cette cassette M6 par rapport à H2A.

2. Structure

Malgré un pourcentage d'identité de 60% avec l'histone canonique H2A, le nucléosome H2A.Z a une structure globalement conservée (Suto et al. 2000), comme le montre la Figure 34.

Il existe cependant des différences notables au niveau structural. H2A.Z possède ainsi un patch acide plus étendu. Ce patch acide est lié au domaine d'amarrage de H2A.Z.

De plus, H2A.Z semble entraîner une légère déstabilisation de la particule de cœur, avec notamment une altération de l'interface du dimère H2A.Z/H2B. Plus précisément, H2A.Z impacte la liaison entre les dimères H2A.Z/H2B et le tétramère H3/H4, notamment au niveau de la boucle L1 de H2A.Z et au niveau des domaines d'ancrage avec H3/H4, avec des différences au niveau de l'hélice α N de H3 et α C de H2A.Z. Toutefois, malgré ces différences, le changement de stabilité de la particule reste subtil avec des résultats contrastés (Suto et al. 2000).

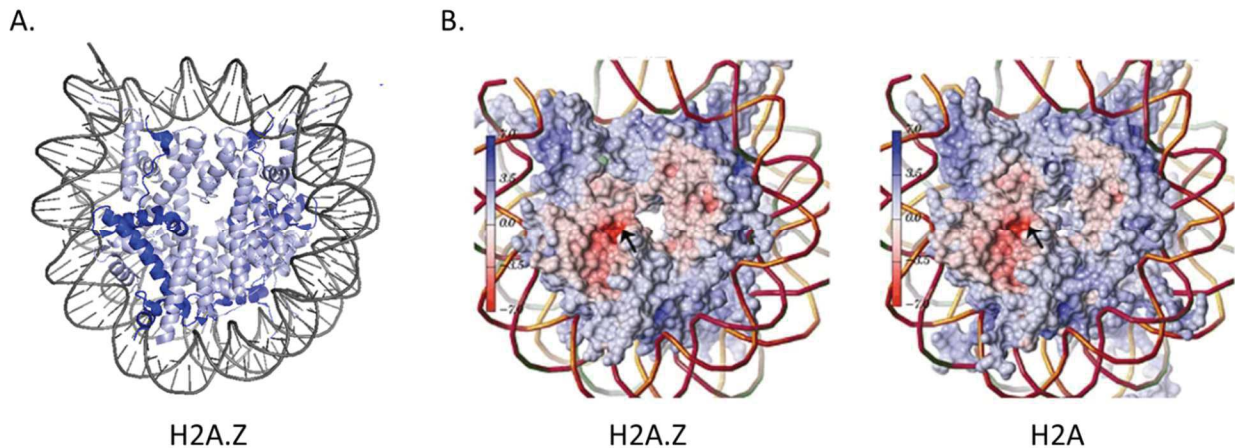


Figure 34 : Structure du nucléosome H2A.Z

A. Structure globale d'un nucléosome homotypique H2A.Z. H2A.Z est représenté en bleu foncé
B. Comparaison des potentiels électrostatiques de H2A et H2A.Z, mettant en avant le patch acide plus étendu de H2A.Z (Suto et al. 2000).

3. Les isoformes de H2A.Z

Le variant d'histone H2A.Z est codé par deux gènes paralogues, *H2AFZ* et *H2AFV*. Ces deux gènes codent pour deux isoformes, H2A.Z.1 et H2A.Z.2.1 respectivement, conservés chez les chordés. H2A.Z possède également un variant d'épissage alternatif de H2A.Z.2.1, spécifique aux primates, nommé H2A.Z.2.2 (Giaimo et al. 2019).

Ces différents isoformes sont présentés sous la forme d'un alignement de leurs séquences humaines dans la Figure 35.

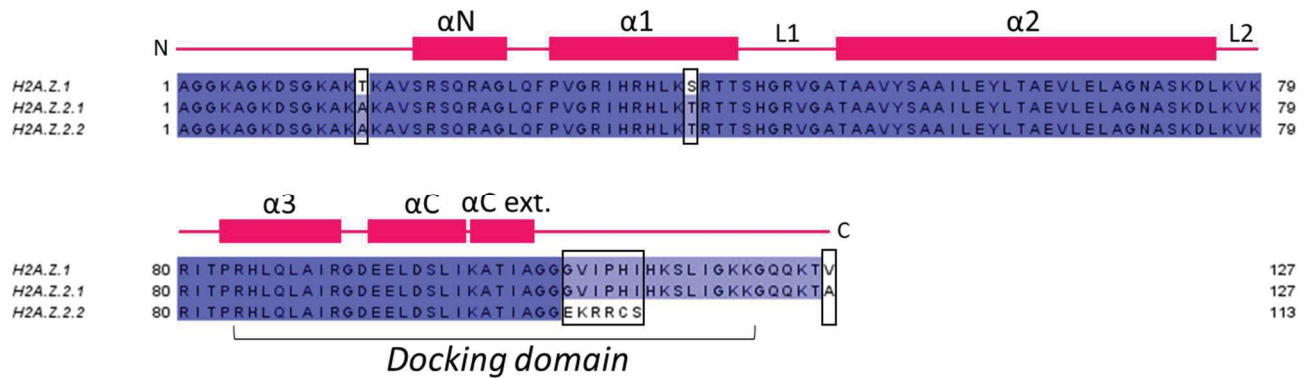


Figure 35 : Alignement des isoformes humains de H2A.Z

L'alignement a été réalisé en utilisant Jalview 2.11.1.0 et coloré en utilisant la méthode par pourcentage d'identité. Les séquences des histones proviennent de la base de données NCBI avec les numéros d'accès suivants : H2A.Z.1 NP_002097.1, H2A.Z.2.1 NP_036544.1, H2A.Z.2.2 NP_619541.1

αC ext. = extension de l'hélice C-terminale spécifique de H2A.Z. Elle est possible grâce à l'absence de G98 présente dans hH2A

Les deux isoformes H2A.Z.1 et H2A.Z.2.1 ne diffèrent que de trois résidus, le résidu 14 dans la queue N-terminale Thr/Ala, le résidu 38 Ser/Thr dans le HFD et le résidu 127 à la fin de la queue C-terminale Val/Ala. Quant aux isoformes H2A.Z.2.1 et H2A.Z.2.2, ils diffèrent dans leur queue C-terminale, celle de H2A.Z.2.2 étant plus courte. De ce fait, les nucléosomes contenant H2A.Z.2.2 ont une liaison réduite aux histones voisines au sein de l'octamère et sont donc nettement moins stables que ceux contenant H2A.Z.2.1 (Bönisch et al. 2012).

La majorité des études ont été menées chez la levure, qui ne possède qu'un seul gène codant pour H2A.Z : *HTZ1*. Ces études chez la levure ne sont donc pas représentatives de H2A.Z humain, qui présente une plus forte complexité avec ces trois isoformes.

De plus, ces trois protéines humaines sont souvent appelées collectivement H2A.Z, sans distinction entre les différents isoformes, ce qui rend d'autant plus complexe la caractérisation de ce variant. H2A.Z fait le plus souvent référence à H2A.Z.1, qui a été découvert en premier et est le plus étudié. C'est également H2A.Z.1 que j'ai utilisé dans la suite de ce manuscrit.

Ainsi, chez les chordés, les fonctions souvent opposées et les facettes contrastées de H2A.Z observées dans la littérature sont majoritairement liées à un manque de connaissance sur l'isoforme concerné.

Les publications les plus récentes tiennent compte des différents isoformes, permettant une meilleure compréhension de la biologie de H2A.Z. Il est d'ores et déjà clair que ces isoformes semblent avoir des fonctions qui leur sont propres.

Par exemple, les isoformes H2A.Z.1 et H2A.Z.2 sont exprimés dans divers tissus chez les vertébrés, avec une expression plus ou moins forte selon la localisation. H2A.Z.1 est présent majoritairement au niveau du cerveau et H2A.Z.2 au niveau du foie et des reins (Dryhurst et

al. 2009). Chez l'Homme, H2A.Z.2.2 est exprimé dans une large gamme de tissus avec une expression prononcée dans les tissus cérébraux (Bönisch et al. 2012).

De plus, la distribution de ces isoformes dans la chromatine semble également différente. H2A.Z.2 est préférentiellement associé à la marque H3K4me3 (Dryhurst et al. 2009), marque liée à la chromatine active et à l'activation de la transcription (Lawrence, Daujat, et Schneider 2016). H2A.Z.1 est, quant à lui, associé à la protéine BRD2 (contenant des bromodomaines) et est impliqué dans l'activation transcriptionnelle des gènes régulés par les récepteurs androgènes (AR) (Draker et al. 2012).

Ces différences associées à la létalité des souris génétiquement inactivées pour H2A.Z.1 suggèrent fortement que les isoformes H2A.Z peuvent avoir des fonctions non redondantes (Faast et al. 2001) (Vardabasso et al. 2014).

4. Rôles et localisation génomique de H2A.Z

Des expériences d'inactivation génétique de H2A.Z ont mis en avant les fonctions complexes et essentielles de H2A.Z. La suppression de H2A.Z dans les eucaryotes simples, comme chez la levure à fission, n'est pas létale, mais entraîne une croissance ralentie, ainsi que des défauts de ségrégation des chromosomes. Chez d'autres organismes modèles, tels que *Tetrahymena thermophila*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* et *Mus musculus*, ce variant est essentiel à leur viabilité (Carr et al. 1994) (Jackson et Gorovsky 2000) (Faast et al. 2001) (Zlatanova et Thakar 2008) (Vardabasso et al. 2014).

H2A.Z a été montré comme exerçant des effets pléiotropiques. H2A.Z contrôle des événements nucléaires majeurs, tels que la régulation de la transcription, la délimitation de la chromatine, avec notamment la régulation des barrières entre l'euchromatine et l'hétérochromatine, la réparation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes, l'intégrité des télomères, et ainsi, de manière globale, la stabilité du génome (Vardabasso et al. 2014) (Billon et Côté 2012) (Giaino et al. 2019). H2A.Z a également été lié à divers processus biologiques, tels que la mémoire et la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) (Ramzan et al. 2020) (Giaino et al. 2019).

La manière dont H2A.Z régule un si large spectre de processus divergents n'est que partiellement comprise. De plus, il est surprenant que H2A.Z régule à la fois la répression et l'activation transcriptionnelle.

a. Régulation de la transcription

H2A.Z a rapidement été associé à la régulation de la transcription. Cependant, son rôle dans ce processus reste flou et parfois contradictoire.

Le fait que H2A.Z joue un rôle dans la transcription a été initialement suggéré sur la base d'observations chez *Tetrahymena thermophila*, où H2A.Z n'est présent que dans le macro-noyau transcriptionnellement actif et est absent du micro-noyau transcriptionnellement inactif. Ces résultats montrent ainsi son implication dans l'activation de la transcription (Allis et al. 1980).

Adam et ses collègues émettent ensuite l'hypothèse selon laquelle H2A.Z permet de réguler positivement la transcription des gènes chez la levure, et notamment ceux du promoteur GAL1. H2A.Z module les interactions avec les facteurs associés à l'ARN polymérase et il peut contribuer au recrutement de l'ARN Polymérase II dans les régions promotrices (M. Adam et al. 2001).

Lors de l'activation de la transcription, le variant H2A.Z disparaîtrait après le remodelage de la chromatine (Santisteban, Kalashnikova, et Smith 2000) (M. Adam et al. 2001). Les nucléosomes contenant H2A.Z subissent donc un rapide *turnover*, ce qui est important pour la régulation génétique et pour de nombreux autres processus nucléaires (Gerhold et Gasser 2014).

Mais H2A.Z a également été impliqué dans l'inactivation de la transcription. Les travaux de Meneghini *et al.* ont mis en évidence, chez la levure, un effet dual de H2A.Z. En comparant les transcriptomes de souche sauvage et *htz1Δ* (inactivation de H2A.Z de *S.cerevisiae*), ils ont identifié 214 gènes, qui sont activés de manière significative par H2A.Z, et 107 autres gènes, qui sont réprimés par H2A.Z (Meneghini, Wu, et Madhani 2003).

D'autres travaux mettent également en avant cette dualité. L'inactivation de H2A.Z permet une régulation à la hausse des gènes impliqués dans la voie de signalisation Notch. La cascade de transduction du signal Notch est hautement conservée et est essentielle pour le développement embryonnaire et post-natal (Giaino et al. 2018).

Au contraire, l'inactivation d'H2A.Z permet une régulation à la baisse comme celle de la signalisation des œstrogènes (ER) (Gévry et al. 2009).

Ainsi, H2A.Z est capable de moduler soit la répression, soit l'activation transcriptionnelle (Giaino et al. 2019).

Il est possible que les isoformes de H2A.Z jouent un rôle dans ce processus, tout comme leurs PTMs, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant.

De plus, cette régulation par H2A.Z est potentiellement liée au recrutement de facteurs de transcription et d'autres protéines associées à la chromatine (Martire et Banaszynski 2020).

En effet, les levures *htz1Δ* montrent une altération du recrutement de nombreux co-activateurs de la transcription, mais aussi de remodeleurs, tels que le médiateur, SWI/SNF ou encore SAGA (Giaino et al. 2019).

b. Ségrégation des chromosomes / barrières euchromatine-hétérochromatine

H2A.Z est également nécessaire au fonctionnement des centromères. Sa perte entraîne une formation incorrecte de l'hétérochromatine, une perte de cohésion des centromères, des modifications de l'hétérochromatine péri-centromérique et des défauts de ségrégation des chromosomes (Greaves et al. 2007) (Hou et al. 2010) (Krogan et al. 2004) (Rangasamy, Greaves, et Tremethick 2004) (Martire et Banaszynski 2020).

De plus, H2A.Z est associé à la marque H3S10 phosphorylée, ce qui soutient leur rôle dans la condensation de la chromatine et pendant la mitose (Dryhurst et al. 2009).

Plus récemment encore, H2A.Z a été montré comme interagissant avec PWWP2A. L'inactivation génétique de PWWP2A, dans les cellules humaines, entraîne la prolifération cellulaire, via un retard mitotique. L'inactivation génétique de PWWP2A chez *Xénopus* entraîne de graves défauts crânio-faciaux. Cela est dû à des problèmes de différenciation et de migration des cellules de la crête neurale. Ainsi, PWWP2A permet de faire le lien entre H2A.Z, la ségrégation chromosomiques et le développement (Pünzeler et al. 2017).

De plus, PWWP2A interagit avec MTA1, un sous-complexe de NuRD comprenant MTA1, RBBP4/7, HDAC1 et HDAC2 et semble être impliqué dans le contrôle de l'acétylation de H2A.Z (Giaino et al. 2019).

H2A.Z a également été retrouvé acétylé au niveau des domaines de l'euchromatine, mais pas de l'hétérochromatine (Venkatasubrahmanyam et al. 2007).

Les travaux de Meneghini et al., chez la levure, (Meneghini, Wu, et Madhani 2003) ont mis en évidence que les nucléosomes H2A.Z permettent de définir la frontière entre les zones d'euchromatine et d'hétérochromatine, en empêchant la propagation de l'hétérochromatine.

c. Réparation de l'ADN

Chez les mammifères, la réparation des cassures double brin de l'ADN se fait de deux manières, soit par recombinaison homologue (HR), soit par la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). H2A.Z est important dans les deux mécanismes. En effet, son incorporation au niveau du site de dommage de l'ADN génère une structure de chromatine

ouverte, essentielle pour le fonctionnement du mécanisme de réparation de l'ADN (Y. Xu et al. 2012). L'élimination de H2A.Z par son chaperon ANP32E initie la recombinaison homologue, alors que le maintien de H2A.Z favorise la NHEJ (Gursoy-Yuzugullu, Ayrapetov, et Price 2015) (Buschbeck et Hake 2017). De plus, H2A.Z, de pair avec H3.3, semble contribuer avec PARP1 et CHD2 à l'assemblage des complexes NHEJ (Buschbeck et Hake 2017).

d. Localisation génomique

Plusieurs études pangénomiques ont permis de déterminer la localisation de H2A.Z. Tout d'abord, il est retrouvé au niveau du site d'initiation de la transcription (TSS), ainsi qu'au niveau des enhancers (Giaimo et al. 2019).

Chez la levure, H2A.Z est enrichi au niveau du TSS des gènes actifs et inactifs. Il se situe dans une zone bordant la NFR (Nucleosome Free Region) sur les nucléosomes -1 et +1 du TSS (Guillemette et Gaudreau 2006) (Raisner et al. 2005).

Chez la drosophile, la localisation de H2A.Z aux promoteurs semble se limiter au nucléosome +1 (Mavrigh et al. 2008). En plus des promoteurs, le variant d'histone H2A.Z est également présent au niveau d'éléments régulateurs, tels que les enhancers, ainsi qu'au niveau des isolateurs des régions chromatinienne (Barski et al. 2007).

De plus, l'occupation de H2A.Z est fortement corrélée avec la méthylation de H3K4 marquant davantage son implication dans la modulation de l'activation génétique (Giaimo et al. 2019). L'occupation de H2A.Z est inversement corrélée avec celle de l'ARN polymérase II (B. Li et al. 2005).

H2A.Z est activement exclu des régions codantes par les facteurs FACT et spt6 associés à l'ARN Polymérase II (Jeronimo et al. 2015). Ceci est en accord avec l'observation que les nucléosomes- H2A.Z ne sont pas enrichis avec la marque H3K36me3, une marque associée à l'élongation transcriptionnelle (Giaimo et al. 2019).

H2A.Z se situe également dans une moindre mesure dans le corps des gènes. Ces derniers sont alors associés à un état répressif, qui dépend de la mono-ubiquitination de H2A.Z effectuée par les complexes PRC1 (Gómez-Zambrano, Merini, et Calonje 2019) (Probst, Desvoyes, et Gutierrez 2020).

Ainsi, H2A.Z est également enrichi dans des régions non transcrites, à savoir l'hétérochromatine péricentromérique, centromérique et télomérique (Meneghini, Wu, et Madhani 2003) (Rangasamy, Greaves, et Tremethick 2004) (Greaves et al. 2007).

5. PTMs

H2A.Z peut tout comme H2A avoir plusieurs PTMs. Ces dernières sont présentées dans la Figure 36.

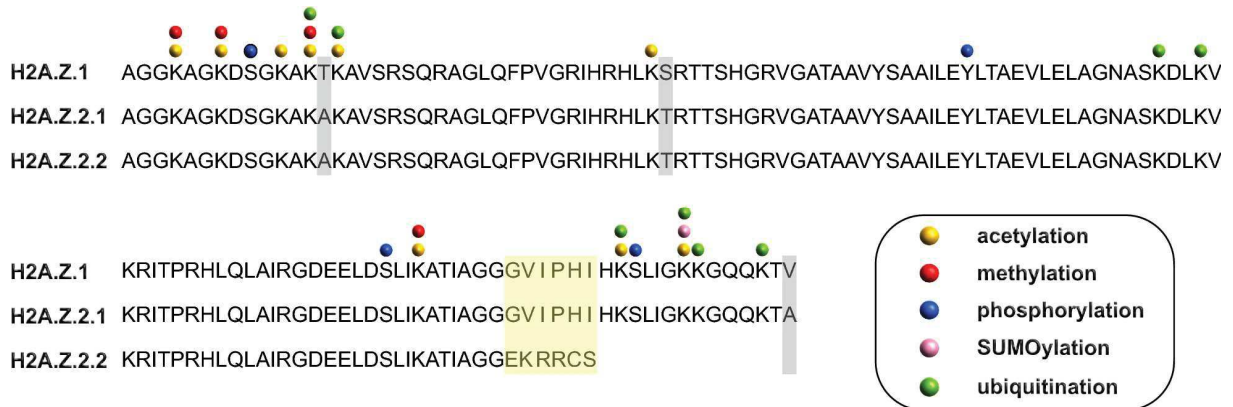


Figure 36 : Modifications post-traductionnelles de H2A.Z
Source : (Giaimo et al. 2019)

L'acétylation d'H2A.Z est connue depuis de nombreuses années et a été associée à l'activation de la transcription (Bruce et al. 2005) (Bellucci et al. 2013) (Valdés-Mora et al. 2012).

Plus récemment, ces observations ont été étendues aux mammifères (Dalvai et al. 2013) (Giaimo et al. 2019). La forme hyper-acétylée de H2A.Z est retrouvée au niveau des sites d'initiation de la transcription des gènes. Les nucléosome H2A.Z Ac sont moins stables et permettent une conformation de chromatine ouverte, qui convient à l'expression génétique (Vardabasso et al. 2014).

L'enzyme responsable de cette acétylation a initialement été identifiée chez *Saccharomyces cerevisiae* comme Esa1, une sous-unité du complexe NuA4 (Keogh et al. 2006). Par la suite, ses homologues Tip60 et dTip60 (mammifère et drosophile respectivement) ont également été liés à l'acétylation de H2A.Z (Dalvai et al. 2013). Deux protéines readers de cette acétylation ont également été caractérisées (Perell et al. 2017). Le facteur de transcription BPTF, contenant un bromodomaine et un PHD, est capable de se lier à H2A.Z K4acK11ac et H2A.Z K4acK7ac. La protéine GCN5 du *Plasmodium falciparum* se lie à H2A.Z K4acK11ac. Récemment il a également été découvert que le complexe NuRD (contenant HDAC1 et HDAC2) permet de désacétyler H2A.Z (Link et al. 2018).

H2A.Z est aussi retrouvé ubiquitiné. L'ubiquitination de H2A.Z sur les résidus K120 et K121 est liée à l'inactivation du chromosome X (XCI) (Sarcinella et al. 2007).

H2A.Z peut également être SUMOylé (ubiquitin-like modifier). La SUMOylation de H2A.Z dans la levure est liée à la réparation de l'ADN, car elle est nécessaire au recrutement des DSB à la périphérie nucléaire (Kalocsay, Hiller, et Jentsch 2009).

H2A.Z est également méthylé. En fonction de l'état de méthylation et du résidu modifié, H2A.Z peut avoir différents rôles. Ainsi, la monométhylation de la lysine 7 de H2A.Z (H2A.ZK7me1), par l'intermédiaire de SETD6, est associée à la répression génique dans les cellules souches de souris (Binda et al. 2013). En revanche, la diméthylation de la lysine 101 (H2A.ZK101me2) est liée à l'activation génique dans les cellules humaines (Tsai et al. 2016).

6. Implication dans les maladies

La surexpression de H2A.Z a été décrite dans plusieurs types de cancers, notamment dans les mélanomes métastatiques, les cancers de la vessie, de la prostate et du sein (Baptista et al. 2013) (Hua et al. 2008) (K. Kim et al. 2013) (Svotelis et al. 2010) (Vardabasso et al. 2015).

H2A.Z antagonise la méthylation de l'ADN (Zilberman et al. 2008). L'hypométhylation de l'ADN liée à H2A.Z peut avoir un effet direct, en affectant par exemple les promoteurs de gènes impliqués dans la cancérogénèse, mais également un effet indirect, en activant les gènes proximaux des éléments répétitifs LINE1 (éléments répétitifs LINE1) (Buschbeck et Hake 2017).

Dans les cancers du sein et de la prostate hormonodépendants, H2A.Z et son acétylation sont liés à l'activation transcriptionnelle et à la prolifération cellulaire. En conséquence, la surexpression de H2A.Z est associée à un mauvais pronostic dans ces cancers (Martire et Banaszynski 2020).

La limite de la plupart de ces études est l'absence de discrimination entre les isoformes d'H2A.Z. (Quénet 2018). Cependant, des travaux récents ont permis de différencier ces isoformes.

a. H2A.Z.2 et mélanomes

H2A.Z.1 et H2A.Z.2 semblent tous deux surexprimés dans les mélanomes, mais seule la délétion de H2A.Z.2, et non celle de H2A.Z.1, permet de réduire la prolifération cellulaire du mélanome (Vardabasso et al. 2015). De plus, la surexpression de H2A.Z.2 est corrélée à une faible survie des patients (Vardabasso, Hake, et Bernstein 2016).

Dans les cellules de mélanome, H2A.Z.2 favorise la prolifération, en permettant la surexpression des gènes cibles de E2F (Vardabasso et al. 2015). La surexpression de ces gènes résulte de l'accumulation de H2A.Z.2 au niveau des promoteurs, permettant de stabiliser le niveau d'acétylation des histones (H2A.Z mais également des histones en général). H2A.Z.2 permet alors le recrutement de la protéine BRD2 et du facteur de transcription E2F1.

La diminution du niveau d'H2A.Z.2, dans les cellules de mélanome, empêche l'acétylation de la chromatine au niveau des gènes cibles E2F et bloque la progression du cycle cellulaire au niveau de G1/S. De plus, le déficit en H2A.Z.2 sensibilise les cellules de mélanome à la chimiothérapie et aux thérapies ciblées.

H2A.Z.2 est donc un facteur de prolifération cellulaire, mais également de sensibilité aux médicaments dans le mélanome malin, ouvrant la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques (Pritchard 2019).

b. H2A.Z.1 et HCC

La surexpression de H2A.Z.1 chez les patients atteints d'un cancer du foie (HCC pour carcinome hépatocellulaire) a été présentée comme un marqueur de faible pronostic (Yan et al. 2016). Comme H2A.Z.2, H2A.Z.1 favorise la prolifération cellulaire, en régulant la transcription des protéines du cycle cellulaire. H2A.Z.1 module également la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un mécanisme cellulaire qui déclenche la métastase.

La diminution de H2A.Z.1 induit l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S et la mort apoptotique des cellules. Cela permet d'inhiber l'activation de la TEM, en modifiant le niveau d'expression des protéines impliquées dans la régulation de la TEM, telles que la E-cadhérine et la fibronectine de manière dépendante de TGF β (Yan et al. 2016).

Le rôle de H2A.Z.1, en tant que médiateur de la prolifération et de la transformation cellulaire, fait de H2A.Z.1 une cible prometteuse pour le traitement du cancer du foie.

De plus, H2A.Z.1 a également été proposé comme un biomarqueur dans le cadres des HCC (Nam et Hee-Doo 2019).

c. FHS

Le syndrome de *Floating-Harbor*, ou FHS, est une maladie génétique rare qui entraîne des déficiences du développement anatomique, avec notamment une dysmorphie cranio-faciale caractéristique, conduisant à une forme du visage triangulaire. Des études initiales réalisées par séquençage d'exomes ont permis d'identifier des mutations non-sens de la partie C-terminale de SRCAP, comme étant responsables de ce syndrome, sans comprendre totalement son mode de fonctionnement (Hood et al. 2012). Cette région C-terminale de SRCAP contient le domaine de liaison à l'ADN (A/T hook), ainsi que le signal de localisation nucléaire NLS, empêchant ainsi la localisation nucléaire des mutants (Flaus et Owen-Hughes 2019).

Des études supplémentaires ont mis en évidence que ces défauts FHS ne résultent pas directement de SRCAP mais d'une incorporation insuffisante d'un des isoformes de H2A.Z dans la chromatine, en raison d'une abondance réduite de SRCAP (Greenberg et al. 2019). SRCAP est capable de médier la déposition de H2A.Z sur la chromatine.

Il a été montré par délétion, surexpression et sauvetage *in vivo* chez *Xenopus*, que seul l'isoforme H2A.Z.2 semble être impliqué dans ce phénotype et non l'isoforme H2A.Z.1. Cette

sélectivité serait liée à un des trois acides aminés différents entre H2A.Z.1 et H2A.Z.2 : S38/T38.

H2A.Z.2 joue un rôle pivot dans la régulation génétique, notamment au niveau des enhancers de gènes régulés au cours du développement et dérégulés dans la FHS. Ainsi, la réduction des niveaux de H2A.Z.2 au niveau des activateurs spécifiques de la migration cellulaire et de la morphogenèse entraîne des anomalies cranio-faciales caractéristiques de la FHS (Flaus et Owen-Hughes 2019).

B. Dépôt et éviction de H2A.Z

La localisation de H2A.Z est un processus très dynamique, contrôlé non seulement par son incorporation, mais aussi par son enlèvement/éviction (Brahma et al. 2017).

1. Modèle proposé chez la levure

a. Dépôt

Chez la levure, le complexe d'échange d'histone et de remodelage de la chromatine SWR1 a tout d'abord été identifié comme permettant l'incorporation de H2A.Z (Htz1) à la chromatine (Krogan et al. 2003) (Mizuguchi et al. 2004). Cependant, ce processus complexe semble également être médié par un chaperon spécifique Chz1 (Luk et al. 2007) (Z. Zhou et al. 2008). Les chaperons FACT et Nap1 sont également capables de lier H2A.Z/H2B (Luk et al. 2007).

Ainsi, il a tout d'abord été proposé que le chaperon Nap1 permette l'import des dimères H2A.Z/H2B du cytoplasme vers le noyau. Ensuite le chaperon Chz1, qui semble faciliter la réaction d'échange, s'associe au dimère H2A.Z/H2B et le présente au complexe SWR1, afin que ce dernier procède à l'échange avec le dimère H2A/H2B (Hong et al. 2014) (Dronamraju et al. 2017).

Deux sous-unités de SWR1, Swc2 et Swr1, ont été identifiées comme étant associées au dimère H2A.Z/H2B directement *in vitro* (W.-H. Wu et al. 2005) (W.-H. Wu et al. 2009). YL1 est l'homologue de Swc2 chez les eucaryotes supérieurs. Les bases structurales, ainsi que le rôle précis de Swc2 dans ce mécanisme restent encore incompréhensibles (Hong et al. 2014) (Latrick et al. 2016) (Liang et al. 2016).

Quant à Swr1, il charge le dimère H2A.Z/H2B dans les nucléosomes par un mécanisme bien défini : un dimère H2A.Z/H2B est tout d'abord incorporé, générant un nucléosome hétérotypique H2A-H2A.Z, puis le second dimère H2A.Z/H2B est incorporé, générant un nucléosome homotypique H2A.Z (Luk et al. 2010).

La structure cristalline de la région N-terminale (599-627) de la sous-unité catalytique Swr1, appelée Swr1-Z, a été déterminée (Hong et al. 2014). Cette structure montre qu'un motif LxxLF conservé dans l'hélice de Swr1-Z reconnaît spécifiquement l'hélice α C de H2A.Z, permettant son extension de deux tours d'hélice supplémentaires (structure détaillée ci-après).

De plus, le domaine Swr1-Z peut chaperonner et délivrer le dimère H2A.Z/H2B au tétrasome (ADN+(H3/H4)₂), formant ainsi le nucléosome (Hong et al. 2014).

Comment le complexe SWR1 est adressé au nucléosome est une autre question centrale de ce mécanisme. Le complexe NuA4 et sa sous-unité Esa1 (Tip60 chez les mammifères) seraient essentiels pour permettre l'incorporation de H2A.Z à la chromatine. Ainsi, l'acétylation de H2A/H4 par Esa1 serait nécessaire pour recruter le complexe SWR1, via sa sous-unité Bdf1,

qui est capable de reconnaître, par son bromodomaine, les histones acétylées (Altaf et al. 2010) (Hong et al. 2014).

Récemment, la structure de Chz1 quasiment entière (combinaison des structures de (Z. Zhou et al. 2008) et (Y. Wang et al. 2019) a permis d'éclaircir le rôle du chaperon Chz1 dans ce mécanisme. Ainsi, Chz1 facilite le dépôt de H2A.Z catalysé par SWR1 *in vitro*, en atténuant les effets inhibiteurs des dimères H2A.Z/H2B libres. En effet, l'excès de H2A.Z/H2B libre entrave la réaction d'échange en formant des agrégats histones (H2A.Z/H2B)-ADN. Dans l'ensemble, cette étude montre comment Chz1 utilise 2 sites de liaison pour reconnaître coopérativement le dimère H2A.Z/H2B, assurant la biodisponibilité du substrat d'histone pour SWR1 (Y. Wang et al. 2019). Pour ce faire, Chz1 lie la paire d'histones de manière différente de ce qui a été observé pour Swr1-Z. Chz1 ne reconnaît pas l'hélice α C étendue de H2A.Z, mais protège l'interface de liaison à l'ADN du dimère H2A.Z/H2B, empêchant ainsi H2A.Z de former des agrégats histones-ADN. De plus, de multiples chaperons d'histones (Nap1, FACT) fonctionnent de manière redondante pour capturer la plupart, voire la totalité des dimères H2A.Z/H2B libres à l'intérieur de la cellule (Luk et al. 2010). La raison pour laquelle il est nécessaire de minimiser le niveau cellulaire des dimères H2A.Z/H2B libres n'est pas claire (Y. Wang et al. 2019).

- Structure de Swr1-Z avec H2A.Z/H2B

Si nous regardons de plus près la structure de Swr1-Z avec H2A.Z/H2B, (Figure 37), nous voyons tout d'abord que Swr1-Z interagit avec les hélices α 3 et α C de H2A.Z et α 2 de H2B par des interactions hydrophobes. Ainsi, les résidus Leu601, Leu604 et Phe605 de Swr1-Z (motif LxxLF) forment un patch hydrophobe avec les résidus Leu91 et Ile95 dans l'hélice α 3 et Ile105 et Ile109 dans l'hélice α C de sch2A.Z, comme illustré sur la Figure 37 – Zone 1. Ces résidus permettent l'extension de l'hélice α C de H2A.Z.

Par ailleurs, Swr1-Z interagit également avec la boucle L2, l'hélice α 3 de H2A.Z, la boucle L1 et l'hélice α 2 de H2B par des interactions électrostatiques (Figure 37 – Zone 2). Ainsi, les résidus du domaine Swr1-Z chargés négativement Asp614, Asp616, Asp618, Asp619, Glu621 et Asp622 sont entourés par les résidus chargés positivement Arg85 et Arg89 de H2A.Z et Lys60 de H2B. Pour finir, Swr1-Z interagit avec l'hélice α 1 et la région N-terminale de l'hélice α 2 de H2B par des interactions hydrophobes. Les résidus Phe623 et Val625 du domaine Swr1-Z interagissent avec le résidu Tyr45 dans l'hélice α 1 et Met62 dans la région N-terminale de l'hélice α 2 de H2B.

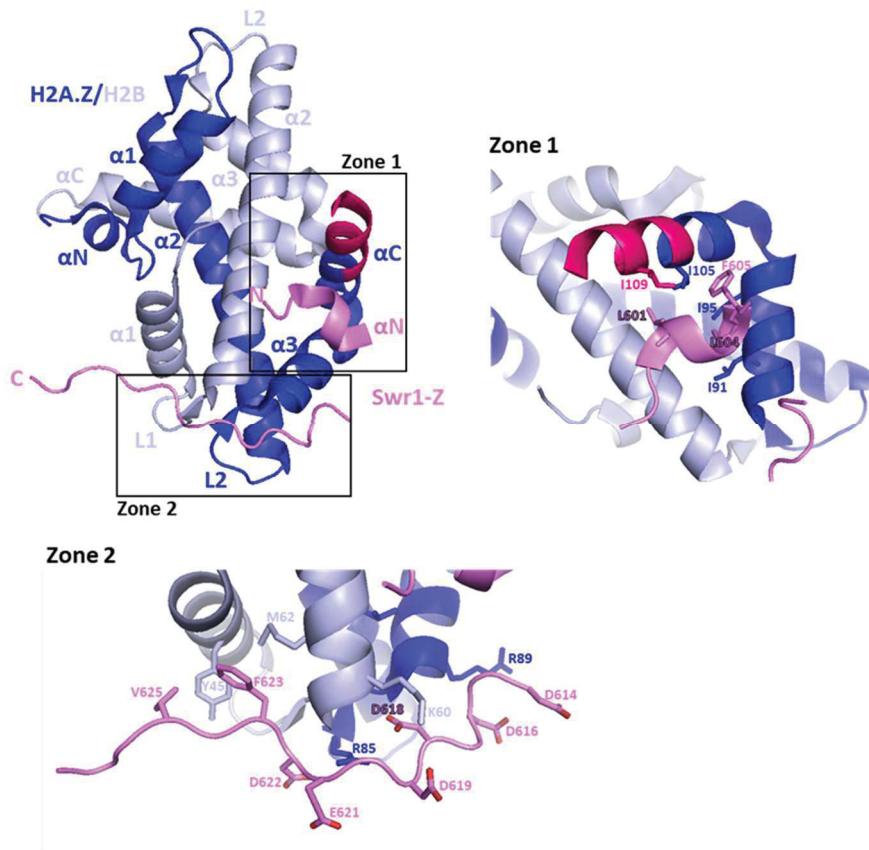


Figure 37 : Etude structurale de l'interaction entre Swr1-Z et H2A.Z/H2B
PDB : 4m6b

- Structure de Chz1 avec H2A.Z/H2B

Chz1 utilise deux domaines structuraux distincts pour lier le dimère H2A.Z/H2B (Figure 38). La région centrale de Chz1 interagit directement avec deux résidus hautement conservés et spécifiques de H2A.Z (Gly98 et Ala57) et permet une légère préférence du chaperon pour H2A.Z/H2B par rapport H2A/H2B. La région C-terminale de Chz1, contenant un motif DEF/Y conservé, permet d'engager une arginine et une poche hydrophobe présente dans H2A.Z/H2B. Initialement, ce motif DEF/Y ne semble pas contribuer à la spécificité pour H2A.Z/H2B, étant donné que les résidus impliqués sont conservés avec H2A/H2B. Néanmoins, la liaison du motif DEF/Y à H2A.Z/H2B améliore indirectement la reconnaissance préférentielle du dimère H2A.Z/H2B. Il est supposé qu'en ancrant Chz1 sur l'arginine de H2A.Z et sur la poche hydrophobe de H2B, l'extrémité C-terminale de Chz1 est guidée pour reconnaître H2A.Z G98. Cela renforce la préférence de liaison de Chz1 pour H2A.Z/H2B (Y. Wang et al. 2019).

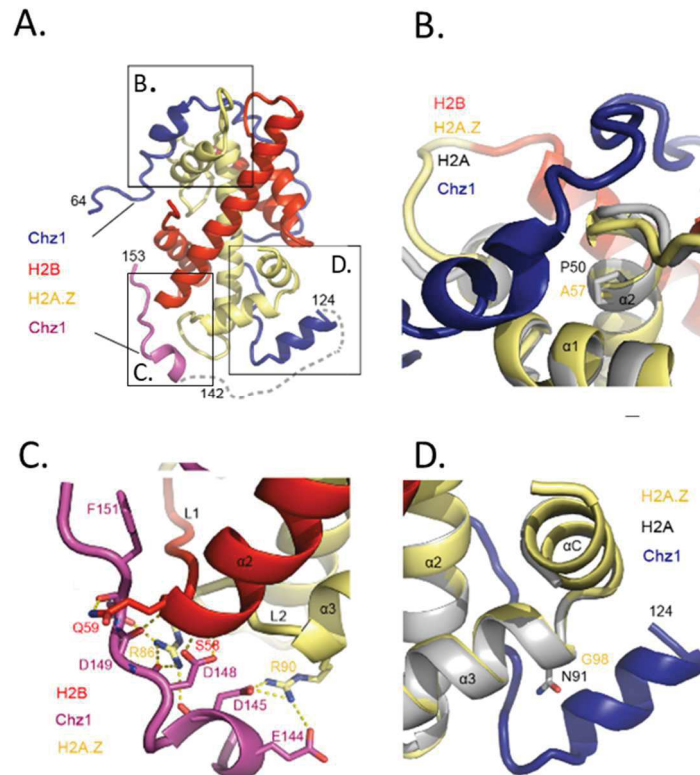


Figure 38 : Structure de Chz1 en complexe avec H2A.Z/H2B

(A) Structure globale combinant la structure RMN de (Z. Zhou et al. 2008) (Chz1 écrit en bleu) et la structure cristalline de (Y. Wang et al. 2019) (Chz1 écrit en violet).

(B) Interaction spécifique de Chz1 avec le résidu A57 de H2A.Z

(C) Interaction du motif DEF/Y de Chz1 avec H2A.Z/H2B

(D) Interaction spécifique de Chz1 avec le résidu G98 de H2A.Z

Adapté de (Y. Wang et al. 2019)

b. Eviction

INO80 a été trouvé comme impliqué dans l'éviction du dimère H2A.Z/H2B. Comme nous l'avons vu précédemment dans la partie « Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants (remodeleurs) », INO80 permet d'introduire une torsion et de dérouler environ 15 pb d'ADN, comme un levier moléculaire (*molecular ratchet*), introduisant ainsi une boucle d'ADN transitoire et exposant H2A.Z/H2B, qui peut alors être échangé avec H2A/H2B (Willhoft et al. 2018).

La translocation et la torsion de l'ADN créés par INO80 près du site d'entrée des nucléosomes favorisent à la fois la mobilisation des nucléosomes, l'échange sélectif des dimères H2A.Z/H2B hors des nucléosomes et leur remplacement par des dimères H2A/H2B sans chaperon d'histone supplémentaire (Brahma et al. 2017).

Il a été constaté que INO80 transloque et mobilise les nucléosomes contenant H2A.Z plus efficacement que ceux contenant H2A. Ce qui explique en partie la préférence de l'INO80 pour le remplacement de H2A.Z par H2A (Brahma et al. 2017).

Des données très récentes montrent également un lien entre l'ARN Polymérase II et l'éviction de H2A.Z chez la levure (Ranjan et al. 2020). En effet, l'expulsion de H2A.Z serait liée à l'initiation de la transcription par le passage de Pol II à travers le nucléosome +1, obligeant le renouvellement/turnover de H2A.Z.

2. Modèle proposé chez les mammifères

a. Vision d'ensemble

Comme nous l'avons vu précédemment dans la partie « Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants (remodeleurs) », chez les mammifères, il existe deux complexes multiprotéiques SRCAP et p400/TIP60, ce dernier provenant de la fusion de SWR1 et NuA4.

Des travaux de Hong et ses collègues, en 2014, ont permis de mettre en évidence que tout comme pour Swr1-Z avec son motif LxxLF, les remodeleurs p400 et SRCAP sont capables de fixer la paire d'histones variante H2A.Z/H2B, grâce à un motif Φ xx Φ (ou Φ est un résidu hydrophobe).

Ainsi, p400_{945-1,017} et SRCAP₅₀₁₋₆₀₇ lient H2A.Z/H2B, avec des affinités respectives de ~ 5 et ~ 200 nM.

p400_{945-1,017} peut également lier le dimère H2A/H2B avec un $K_D \sim 60$ nM (Hong et al. 2014).

De plus, p400 / TIP60 et SRCAP jouent tous deux un rôle clé dans le maintien de l'intégrité du génome, SRCAP étant le deuxième remodeleur le plus fréquemment muté dans les cancers humains (Kadoch et al. 2013).

Les travaux de mon équipe, en collaboration avec l'équipe d'Ali Hamiche à l'IGBMC, ont permis d'identifier deux chaperons d'histones humains impliqués dans les échanges entre H2A et H2A.Z sur la chromatine : YL1 et ANP32E (Obri et al. 2014) (Latrick et al. 2016). Plus précisément, YL1-SRCAP est responsable du dépôt de la paire d'histones variante H2A.Z/H2B dans le nucléosome, tandis qu'ANP32E-p400/TIP60 est responsable de son éviction. La Figure 39 permet de schématiser ce processus. Mon équipe a montré que des domaines spécifiques des chaperons YL1 et ANP32E reconnaissent H2A.Z de manière similaire, en induisant un changement conformationnel majeur dans l'hélice α carboxy-terminale de H2A.Z, malgré leurs rôles fonctionnels opposés. Ces domaines ont été nommés « H2A.Z-Interacting Domains », abrégé ZID (Figure 39).

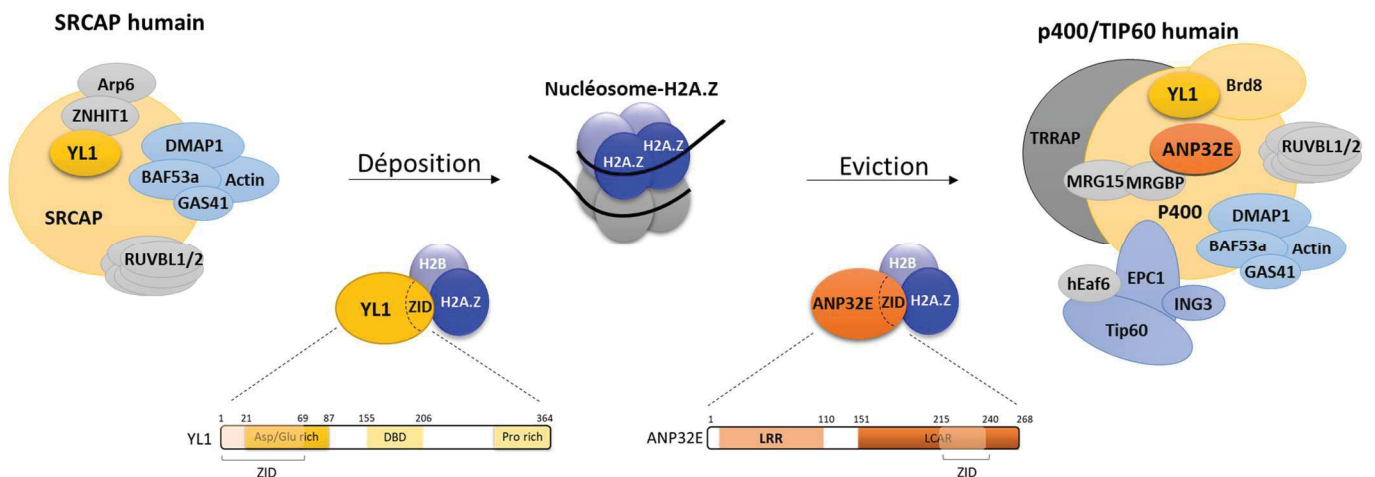


Figure 39 : Mécanisme d'échange d'H2A.Z sur la chromatine

(Panel du haut) Modèle de dépôt et d'éviction d'H2A.Z dans le nucléosome, mettant en avant les effecteurs épigénétiques impliqués dans ce processus.

(Panel du bas) Représentation schématique des différents domaines des chaperons ANP32E et YL1.

LRR = région riche et répétée leucine, LCAR = région acide de faible complexité, Asp/Glu rich = région riche en acide aspartique et glutamique, DBD = domaine de liaison à l'ADN, Pro rich = région riche en proline, ZID = domaine d'interaction à H2A.Z.

b. Eviction par ANP32E - p400/TIP60

- La famille ANP32

Il existe 3 membres conservés d'ANP32 chez les vertébrés :

- ANP32A (aussi nommé PHAPI, pp32, I1PP2A, LANP, HPPCn, Mapmodulin),
- ANP32B (aussi nommé SSP29, APRIL, PAL31, PHAPI2), et
- ANP32E (aussi nommé CPD1, LANP-L, PHAPIII).

Compte tenu de l'absence de preuves solides de leur transcription et traduction, ANP32C et ANP32D, qui ne possèdent également pas d'introns, ne sont pas considérés comme des membres *bona fide* de la famille ANP32 (Reilly et al. 2014).

La famille d'ANP32 est composée dans sa région amino-terminale de quatre motifs LRR (*Leucine-Rich-Repeat*) répétés et dans sa région carboxy-terminale d'une région acide de faible complexité (*Low Complexity Acidic Region* ; LCAR). La forte conservation de ces deux domaines des protistes aux vertébrés suggère qu'ils jouent tous deux des rôles essentiels.

Par ailleurs, les protéines de la famille ANP32 sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, allant de la transcription à l'apoptose (Khan, Vaidya, et Meucci 2011) (Mutai et

al. 2000). Cette famille de protéines est également impliquée dans la régulation de la transcription et l'architecture de la chromatine (Reilly et al. 2014).

Ainsi, ANP32A est un membre du complexe d'inhibition de l'histone acétyltransférase (*inhibitor of histone acetyltransferase* ou INHAT) (Seo et al. 2001). ANP32A bloque l'acétylation des histones en se liant, via son LCAR, aux queues des histones et en inhibant stériquement l'acétylation. Plus spécifiquement, ANP32A se lie de préférence aux queues d'histone H3 non modifiées (Schneider et al. 2004) (Seo et al. 2002). ANP32A pourrait également être recruté au niveau des promoteurs par des facteurs de transcription et impacter la transcription (Cvetanovic et al. 2007) (Hunter et al. 2013) (Kadota et Nagata 2011).

ANP32B est également capable de lier des facteurs de transcription et de moduler leur activité. Par exemple, la liaison d'ANP32B au facteur KLF5 (*Krüppel-like factor 5*) permet de réprimer la transcription de manière promoteur-spécifique (Munemasa et al. 2008).

ANP32B semble également lier les histones et plus précisément possède une activité de chaperon d'histones. Ainsi la région LRR d'ANP32B sert de chaperon pour les histones canoniques H3/H4 (Tochio et al. 2010). Certains de ces aspects seront plus détaillés dans la discussion de ce chapitre.

ANP32E est également impliqué dans la régulation de l'architecture de la chromatine, avec une activité de chaperon d'histones pour H2A.Z/H2B, via son LCAR, qui a été caractérisée par mon équipe et qui est détaillée dans le prochain paragraphe.

- **Caractéristique et composition d'ANP32E**

ANP32E (acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member e) est une protéine conservée chez les vertébrés, appartenant à la famille ANP32 (Matilla et Radrizzani 2005).

ANP32E est composée :

- dans sa partie N-terminale, de quatre répétitions riches en leucine, ou *leucine-rich repeat* (LRR). Cette région a donc été globalement nommée LRR,
- dans sa partie C-terminale, d'une région acide de faible complexité (LCAR).

ANP32E fait partie du complexe p400/TIP60, mais semble exclue du complexe SRCAP. Cela est en accord avec le fait qu'ANP32E interagisse, via son domaine N-terminal (LRR), avec MRGBP, un composant de p400/TIP60 (Obri et al. 2014).

Des expériences de pull-down ont montré qu'ANP32E est un chaperon spécifique d'H2A.Z, qui se lie au dimère H2A.Z/H2B, mais pas au dimère H2A/H2B. Cette interaction est très spécifique et très stable, car elle n'est pas affectée par un traitement avec 1M NaCl.

Par ailleurs, *in cellulo* la délétion du chaperon 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 dans le profil CHIP-seq au niveau des *enhancers* et des isolateurs de gènes. Ces résultats montrent que ce chaperon permet de retirer H2A.Z des nucléosomes.

ANP32E est ainsi un chaperon spécifique impliqué uniquement dans l'éviction de la paire d'histones H2A.Z/H2B (Obri et al. 2014).

Des expériences de délétions ont montré qu'une petite région (acides aminés 215-240) dans la partie C-terminale de l'ANP32E est suffisante pour la liaison à H2A.Z/H2B. Cette région a été nommée ZID pour *H2A.Z-interacting domain*. L'alignement des séquences d'ANP32E de divers organismes montre qu'ANP32E-ZID correspond à une région primaire conservée dans l'extrémité C-terminale d'ANP32E. Cette région englobe une insertion spécifique, qui ne se trouve pas chez les autres membres de la famille ANP32 (Figure 40).

Il est également important de noter que l'interaction entre la partie C-terminale d'ANP32E (151-268) incluant le ZID et H2A.Z/H2B est abolie par 1M NaCl, contrairement à ce qui a été vu précédemment pour la protéine ANP32E entière. Il est donc possible que d'autres domaines de ANP32E, et notamment son LRR, stabilisent l'interaction avec H2A.Z/H2B sans pour autant être impliqués dans sa reconnaissance.

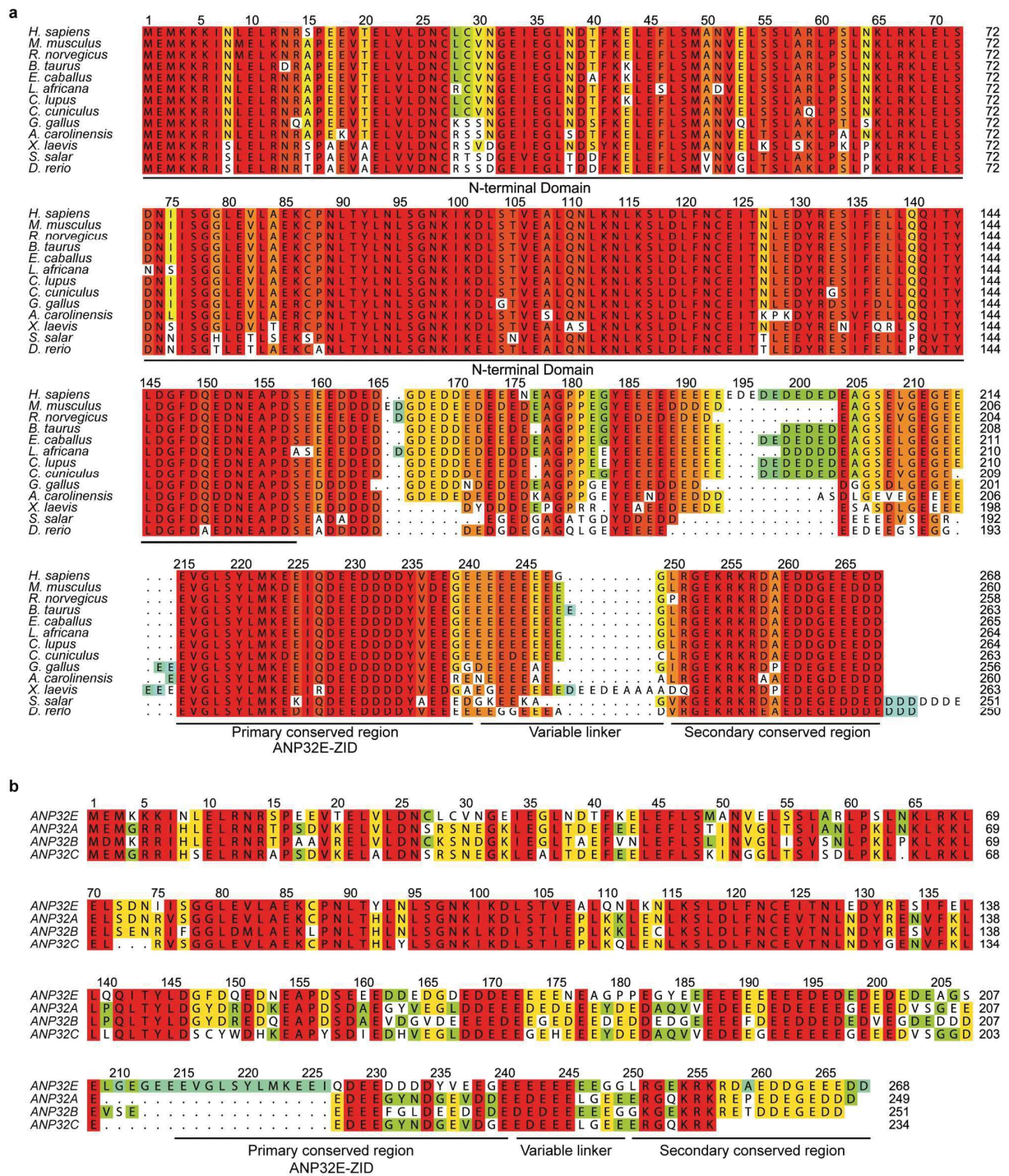


Figure 40 : Alignements d'ANP32E et de la famille ANP32

(A) Alignement de diverses séquences d'ANP32E chez des organismes modèles de vertébrés

(B) Alignement des protéines de la famille ANP32 humaine

Source : (Obri et al. 2014)

- Base moléculaire de l'interaction entre ANP32E-ZID avec H2A.Z/H2B

La façon dont les chaperons des histones reconnaissent spécifiquement les dimères H2A.Z/H2B par rapport aux dimères canonique est un thème central. Les travaux de mon équipe ont permis de comprendre les bases moléculaires de cette reconnaissance, grâce à une structure cristalline d'ANP32E-ZID en complexe avec H2A.Z/H2B. ANP32E-ZID ne comporte pas d'éléments de structure secondaire définis, à l'exception d'une petite hélice N-terminale (α N), qui interagit avec l'hélice α C de H2A.Z. La reconnaissance de la paire d'histones H2A.Z variante par ANP32E-ZID entraîne un changement conformationnel de l'hélice α C de H2A.Z, qui est doublement allongée par rapport à sa longueur canonique dans le nucléosome. De ce fait, le domaine d'amarrage d'H2A.Z n'est plus accessible, ne permettant pas la fixation de la paire d'histones H3/H4, comme cela serait le cas pour un nucléosome canonique (Figure 41).

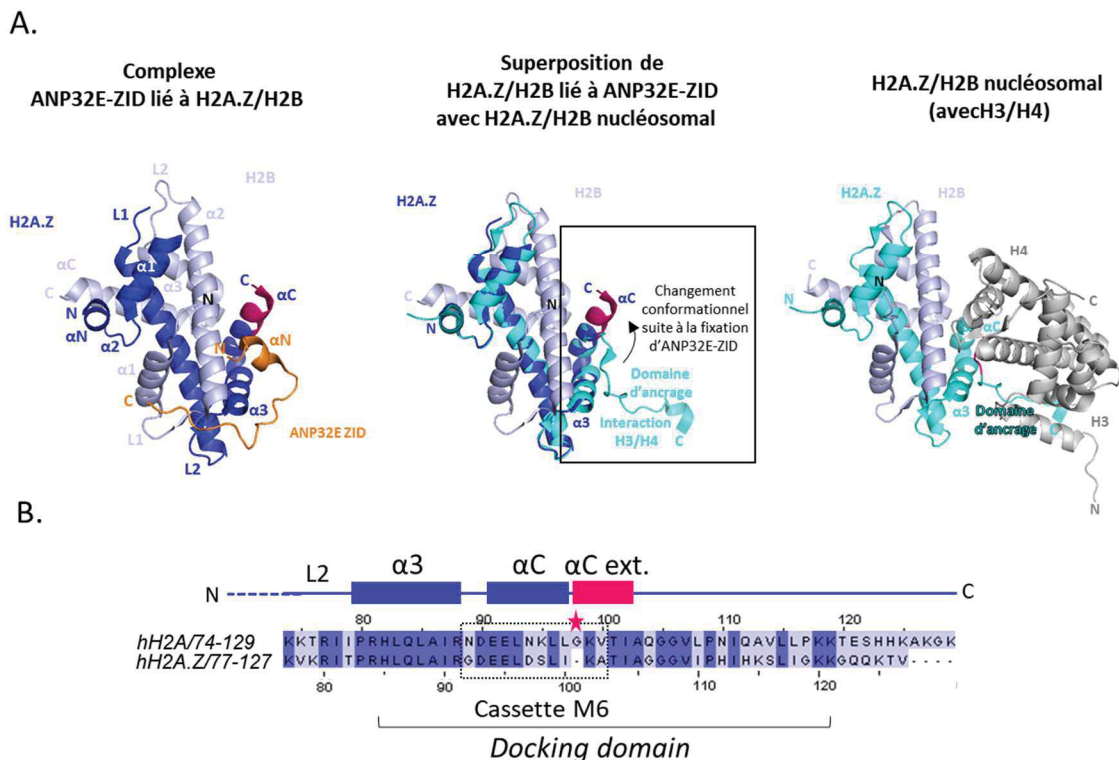


Figure 41 : Changement conformationnel de l'hélice α C de H2A.Z lié à la reconnaissance spécifique de ANP32E-ZID

- (A) Structure cristalline ANP32E-ZID avec H2A.Z/H2B
 (B) Comparaison de la structure de l'hélice α C en contexte nucléosomal ou avec le changement induit par le chaperon ANP32E
 (C) H2A.Z/H2B dans un contexte nucléosomal
 (D) Alignement partiel entre H2A.Z et H2A mettant en avant l'absence du résidu G dans H2A.Z permettant l'extension de l'hélice C-terminale.

Adapté d'(Obri et al. 2014)

Cette extension de l'hélice αC est possible, car elle est plus courte d'un acide aminé chez H2A.Z par rapport à H2A. Le résidu manquant est une glycine (G98 de H2A), qui est un acide aminé déstabilisant l'hélice αC .

De plus, l'introduction dans la cassette M6 de H2A.Z de cette glycine, observée chez H2A, abolit toute interaction avec ANP32E (Obri et al. 2014). Ainsi, ANP32E semble uniquement spécifique à H2A.Z, car tous les autres variants de la famille H2A possèdent ce résidu glycine dans l'hélice C-terminale.

En étudiant précisément l'interaction d'ANP32E avec H2A.Z/H2B, nous voyons que cette dernière s'effectue à deux niveaux (Figure 42).

ANP32E-ZID interagit avec les hélices $\alpha 3$ et αC de H2A.Z et $\alpha 2$ de H2B, par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes. Les résidus Leu218, Leu221 et Met222 forment un patch hydrophobe avec les résidus T103 et I104 de H2A.Z. Ces résidus sont également conservés chez H2A et ne permettent donc pas de discriminer H2A de H2A.Z (Figure 42 - zone 1). Le résidu I100 de H2A.Z (une leucine chez H2A) est également impliqué dans la formation de ce patch hydrophobe.

Il est intéressant de noter que ces interactions sont similaires à celles observées pour Swr1-Z, où un motif LxxLF forme un patch hydrophobe avec H2A.Z. Pour ANP32E, le motif semble être LxxLM.

ANP32E interagit également avec la surface formée par la boucle L2 de H2A.Z, ainsi que par la boucle L1 et l'hélice $\alpha 2$ de H2B, par des interactions hydrophobes et un réseau de liaisons hydrogènes (Figure 42 - zone 2). Plus précisément, les résidus D228, D232 et D234 d'ANP32E-ZID forment un réseau de liaisons hydrogènes avec H2A.Z (R80 et T82) et H2B (S55 et la chaîne principale du résidu L57), tandis que le résidu Y235 d'ANP32E-ZID est impliqué dans des interactions polaires Pi (Y42), hydrophobes (M59) et une potentielle liaison H (S38) avec les résidus de H2B. Ces interactions ne permettent cependant pas une discrimination entre H2A.Z et H2A. En revanche, ils protègent la surface formée par la boucle L1 de H2B et la boucle L2 de H2A.Z, région qui est connue pour interagir avec l'ADN à proximité des sites d'entrée/sortie du nucléosome.

Ce modèle d'éviction par ANP32E implique cependant que les boucles L2 de H2A.Z et L1 de H2B soient accessibles pour la liaison à ANP32E et qu'elles ne soient pas liées à l'ADN. Il est ainsi possible que le remodelleur p400/TIP60 joue un rôle dans ce mécanisme d'éviction. En effet, le remodelage des nucléosomes H2A.Z devrait faciliter ce mécanisme et l'éviction d'H2A.Z/H2B.

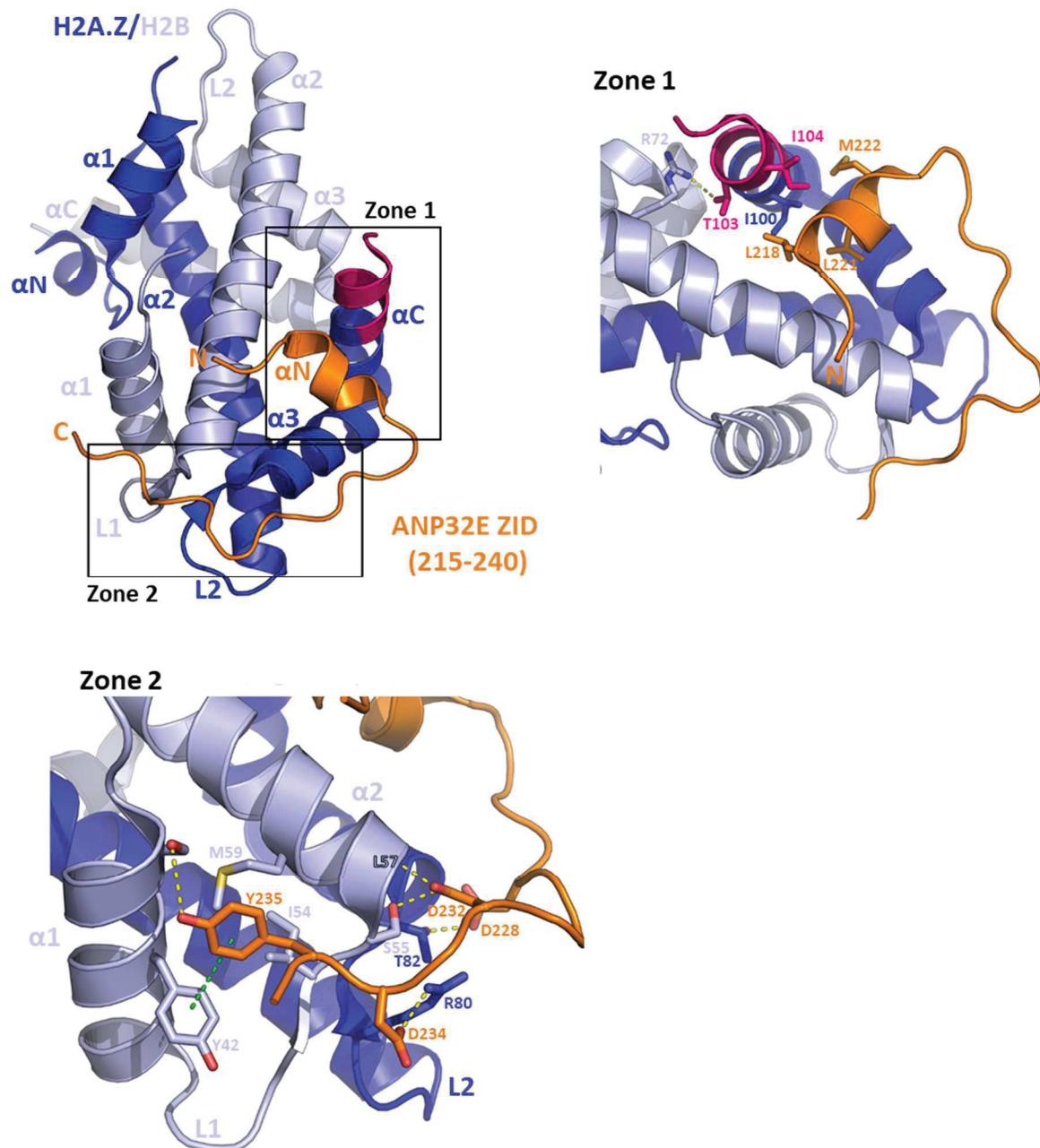


Figure 42 : Etude structurale de l'interaction entre ANP32E-ZID et H2A.Z/H2B
Adapté d'(Obri et al. 2014)

c. Dépôt par YL1 – SRCAP

- Caractéristiques et composition

Les travaux collaboratifs de mon équipe avec celle de Ali Hamiche ont également permis la caractérisation du chaperon spécifique d'H2A.Z, YL1 (Vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog). YL1 est conservé chez les métazoaires et est responsable du dépôt de la paire d'histones H2A.Z/H2B dans le nucléosome (Latrick et al. 2016). YL1 fait partie des sous-unités conservées à la fois dans les complexes p400/TIP60 et SRCAP (Cai et al. 2005). Cependant YL1 ne se retrouve pas en complexe avec ANP32E (Latrick et al. 2016), ce qui est en faveur de son implication dans le complexe SRCAP et potentiellement dans la composition alternative (avec ANP32E) de p400/TIP60.

YL1 se compose :

- dans sa partie N-terminale, d'une région riche en acide aspartique (Asp) et en acide glutamique (Glu),
- dans sa partie centrale, d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD),
- dans sa partie C-terminale, d'une région riche en proline.

Les travaux de mon équipe ont montré que l'extrémité N-terminale d'YL1, contenant les acides aminés 1 à 69, est suffisante à la liaison du dimère H2A.Z/H2B. Cette région a donc été nommée YL1-ZID.

- Structure d'YL1-ZID avec H2A.Z/H2B

D'un point de vue structural, nous remarquons que la liaison du chaperon YL1 à la paire d'histones H2A.Z/H2B entraîne aussi une extension de l'hélice α C de H2A.Z de 2 tours supplémentaires (également observé précédemment pour ANP32E et Swr1-Z).

De plus, la liaison avec YL1 semble être plus étendue et contenir des déterminants supplémentaires (Figure 43) (Latrick et al. 2016).

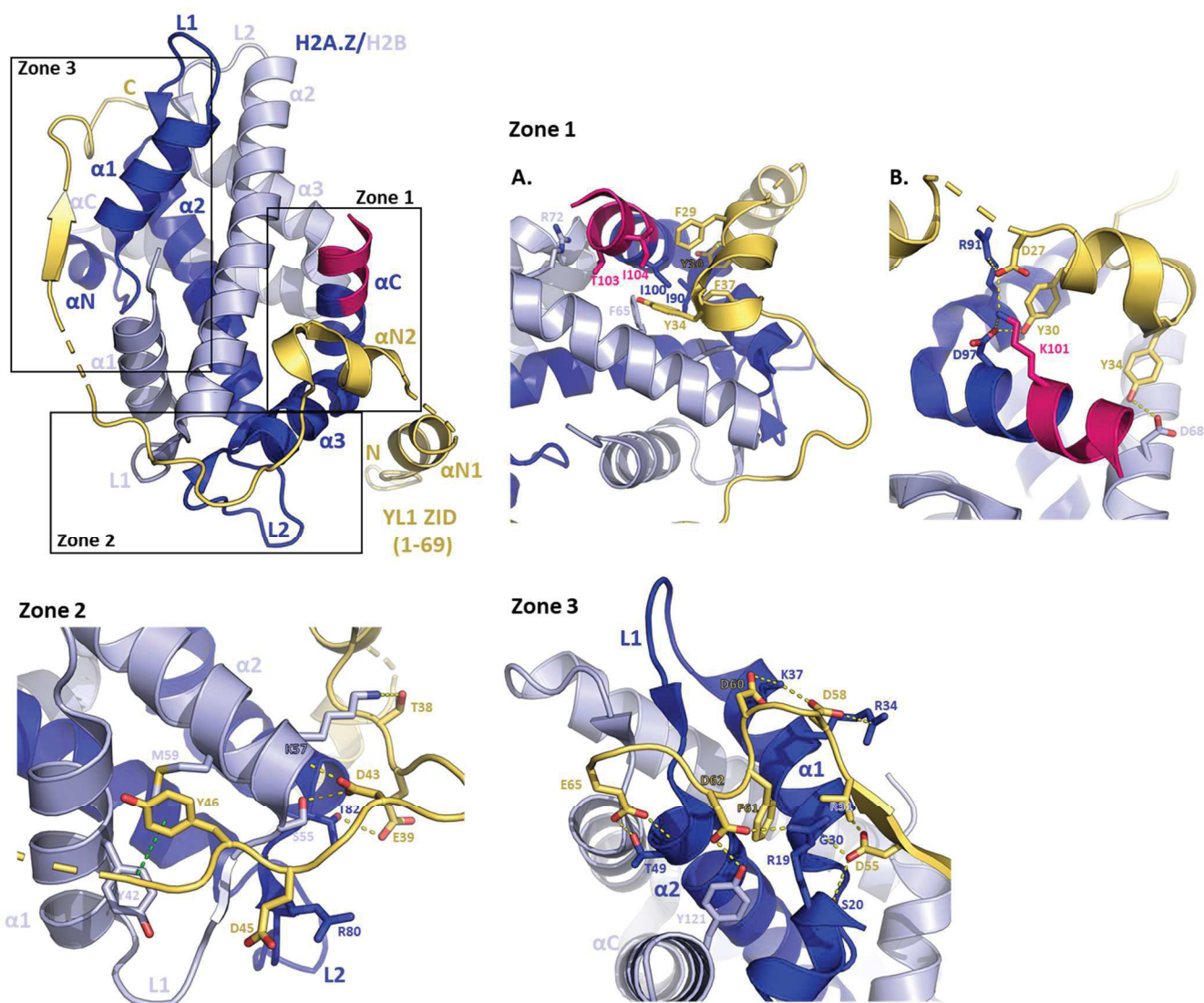


Figure 43 : Etude structurale de l'interaction entre YL1-ZID et H2A.Z/H2B
Adapté de (Latrick et al. 2016)

Ainsi, tout comme ANP32E, YL1 interagit avec les hélices $\alpha3$ et αC de H2A.Z et l'hélice $\alpha2$ de H2B, par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes (Figure 43 zone 1 et 2 respectivement). Cependant, l'interaction d'YL1 est plus étendue que celle d'ANP32E. En effet, le patch hydrophobe d'YL1 est renforcé et possède un réseau d'interactions hydrogènes spécifique (Figure 43 – Zone 1.B).

De plus, YL1 interagit également avec une région supplémentaire en suivant le sillon de fixation de l'ADN sur le dimère H2A.Z/H2B (Figure 43 – Zone 3).

Plus précisément et en lien avec la Figure 43 :

Zone 1 :

De manière identique à ANP32E, un réseau d'interactions hydrophobes est retrouvé. Ainsi, les résidus F29, Y30, Y34 et F37 de YL1 forment un noyau hydrophobe avec les résidus I90, I100 et I104 de H2A.Z et F65 de H2B. Ces résidus F29, Y34 et F37 de YL1 occupent des positions quasiment identiques à celles de M222, L218 et L221, d'ANP32E.

En plus de ces interactions hydrophobes au niveau de la zone 1, YL1 possède un réseau de liaisons hydrogènes qui lui est spécifique (Figure 43 – Zone 1.B). Le résidu Y30 d'YL1 renforce le noyau hydrophobe d'YL1 et interagit également, via sa chaîne latérale, avec le carboxyle du résidu D97 d'H2A.Z. Ce résidu D97 est spécifique à H2A.Z (N94 dans H2A) et est ainsi impliqué dans la discrimination de H2A.Z par rapport à H2A. Le carboxyle de D97 d'H2A.Z interagit également avec la chaîne latérale du résidu K101 de H2A.Z. Le résidu D27 de YL1 interagit aussi avec ce dernier (H2A.Z K101), mais aussi avec R91 de H2A.Z, renforçant d'autant plus ce réseau de liaisons H spécifique au chaperon YL1.

Zone 2 :

YL1 (comme ANP32E) interagit avec la surface formée par la boucle L2 de H2A.Z, la boucle L1 et l'hélice α 2 de H2B, par des interactions hydrophobes et un réseau de liaisons hydrogènes. Plus précisément, le résidu D43 d'YL1 forme une liaison H avec le résidu S55 de H2B, mais également avec la chaîne principale du résidu K57 de H2B.

Les résidus T38 et E39 d'YL1-ZID forment également un réseau de liaisons hydrogènes avec K57 de H2B et T82 de H2A.Z respectivement, tandis que le résidu Y46 d'YL1-ZID est impliqué dans des interactions polaires Pi (Y42) et hydrophobes (M59) avec les résidus de H2B.

Ces interactions sont similaires à celles observées avec l'ANP32E et ne permettent pas d'expliquer la reconnaissance spécifique d'H2A.Z par rapport à H2A.

Zone 3 :

La troisième zone d'interaction est spécifique à YL1-ZID. L'interaction d'YL1 sur H2A.Z/H2B suit le chemin du sillon de liaison de l'ADN, couvrant entièrement cette surface de liaison (Figure 43 – Zone 3). La liaison à cette interface implique à la fois des liaisons hydrogènes et la formation d'interactions hydrophobes.

Plus précisément, les résidus D55, D58, D60, D62 et E65 d'YL1-ZID forment un réseau de liaisons hydrogènes avec les chaînes latérales des résidus S20, R34, K37, R19, T49 de H2A.Z et Y121 de H2B, ainsi que les chaînes principales des résidus G30 et R31 de H2A.Z. Pour finir, le résidu F61 d'YL1 est impliqué dans des interactions hydrophobes.

Il est important de noter qu'aucune de ces interactions ne semble jouer un rôle dans la reconnaissance spécifique d'H2A.Z. En revanche, la liaison d'YL1-ZIDC au dimère H2A.Z/H2B empêche ce dimère de se lier à l'ADN, à la fois par encombrement stérique et par modification du potentiel électrostatique de la surface de liaison de l'ADN.

Pour finir, une dernière interaction est visible pour l'hélice α -N d'YL1. Il s'agit d'une interaction de packing cristallographique, où entre autres, une arginine conservée d'YL1 (R10) interagit avec un patch acide d'H2A.Z/H2B à la manière d'une ancre arginine. De plus, un résidu spécifique de H2A.Z G92 permet également d'apporter de la spécificité à l'interaction. Ce résidu est localisé au cœur de l'interaction avec α N d'YL1.

- **Caractérisation de la liaison entre YL1-ZID et H2A.Z/H2B**

En plus des études structurales, les travaux de mon équipe ont également caractérisé, par ITC, l'interaction entre YL1-ZID et H2A.Z/H2B. Cette interaction est très affine avec une constante de dissociation à l'équilibre de 4,4 nM. En contraste, aucune interaction n'est détectée par ITC avec la paire H2A/H2B. Ce type de caractérisation n'a pas été réalisé pour ANP32E (Latrick et al. 2016).

De plus, des approches mutationnelles ont révélé (en complément des études structurales) précisément les résidus de H2A.Z essentiels à la formation du complexe et à la spécificité d'YL1 (Latrick et al. 2016). Pour ce faire, mon équipe a muté des résidus de H2A en résidus équivalents de H2A.Z (décrit ci-dessous) impliqués dans la liaison. L'impact de chaque mutation sur la liaison avec YL1-ZID a alors été évalué par ITC.

Ainsi, les simples mutations H2A Δ G98 ou H2A I79T ou H2A N89G ou H2A N94D permettent un gain d'affinité, en comparaison à H2A non muté, qui ne lie pas YL1-ZID. Ce gain d'affinité reste tout de même faible et varie en fonction des mutants, de 100 à presque 1000 fois plus faible que le K_D obtenu avec H2A.Z/H2B.

La combinaison de deux de ces résidus et celle de trois de ces résidus permettent de mettre en évidence des interactions de plus en plus affines. Enfin, l'utilisation du quadruple mutant de H2A (H2A.Z-like) combinant les quatre mutations précédentes, H2A Δ G98, I79T, N89G, N94D, permet de rétablir entièrement la liaison, en obtenant un K_D d'environ 5.6 nM contre 4.4 nM avec H2A.Z/H2B (Latrick et al. 2016).

Ainsi, quatre résidus d'H2A.Z ont été trouvés comme étant essentiels à la liaison et à la spécificité d'YL1. Il s'agit de l'absence du résidu glycine, qui permet l'extension de l'hélice α -C de H2A.Z (G98 chez H2A), de la présence du résidu T82, impliqué dans la formation de liaison H au niveau de la zone 2, celle du résidu D97, impliqué dans la formation de liaisons H

spécifiques à YL1 dans la zone 1b, et celle du résidu G92, impliqué au cœur de l'interaction avec α N d'YL1.

Mon équipe a ainsi pu poser les bases moléculaires impliquées lors du dépôt de H2A.Z/H2B sur le nucléosome par YL1 et effectuer sa caractérisation biophysique.

3. YL1 vs ANP32E

Cependant de nombreuses questions restent en suspens, notamment les bases structurales impliquées dans la reconnaissance de la paire d'histones H2A.Z/H2B étant globalement identique pour ces chaperons YL1 et ANP32E, comment peuvent-ils avoir des rôles biologiques opposés de dépôt et d'éviction ?

La caractérisation de l'interaction entre ANP32E-ZID et H2A.Z/H2B, par ITC et par approche mutationnelle, n'a pas été réalisée et pourrait nous apporter des informations cruciales dans la compréhension de ce processus.

De plus, YL1 et ANP32E contiennent tous deux d'autres domaines qui pourraient participer, coopérativement avec leur domaine ZID, à la reconnaissance d'H2A.Z/H2B et qui pourraient également expliquer leur fonction opposée. Par conséquent, il est essentiel de comprendre précisément comment les différents domaines de ces chaperons sont impliqués dans les échanges H2A/H2A.Z.

Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre et comparer ces deux chaperons YL1 et ANP32E impliqués respectivement dans le dépôt et l'éviction de H2AZ.

De plus, il est également important de noter qu'il existe des différences notoires entre les espèces, accentuant la complexité du dépôt et de l'éviction de H2AZ/H2B. En effet, bien que YL1 des métazoaires et Swr1 de levure aient une fonction identique, à savoir le dépôt de la paire d'histones H2A.Z/H2B, l'homologue de YL1, chez la levure est Swc2 et non Swr1. A cela, s'ajoute le fait que la structure de Swr1-Z (Figure 37) est quasiment identique à celle d'ANP32E-ZID chez les mammifères (Figure 42), qui est impliquée dans l'éviction et non dans le dépôt de H2A.Z/H2B. Ces deux protéines ont donc des fonctions opposées, mais des structures très similaires. Ainsi, de nombreuses questions restent toujours sans réponse pour le moment concernant ces chaperons spécifiques d'H2A.Z/H2B.

C. Objectifs

Les travaux préliminaires de mon équipe ont permis de caractériser deux chaperons d'histones humains impliqués dans les échanges entre H2A et H2A.Z sur la chromatine : YL1 et ANP32E. Mon équipe a ainsi montré que des petits domaines ZID des chaperons YL1 et ANP32E reconnaissent globalement H2A.Z de manière similaire, en induisant un changement conformationnel majeur dans l'hélice α carboxy-terminale de H2A.Z, malgré leurs rôles fonctionnels opposés.

Il est donc essentiel de continuer de caractériser, d'un point de vue biochimique et biophysique, les différences de ces deux chaperons afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action opposés sous-jacent, et plus particulièrement celui du chaperon ANP32E, qui a moins été caractérisé qu'YL1.

De plus, YL1 et ANP32E contiennent tous deux d'autres domaines qui pourraient participer, coopérativement avec leur domaine ZID, à la reconnaissance d'H2A.Z/H2B et expliquer leur fonction opposée. En effet, la protéine ANP32E est composée, en plus de son domaine ZID, d'un domaine N-terminal composé d'une région riche répétée en leucine (LRR) auquel je me suis particulièrement intéressée durant ma thèse.

Mes objectifs de thèse ont porté sur :

- (i) La caractérisation de l'interaction du chaperon ANP32E-ZID avec la paire d'histones variante H2A.Z, en utilisant des approches d'ITC et mutationnelles. Ces approches sont similaires à celles utilisées pour la caractérisation de YL1. Cela m'a permis de comparer la liaison entre les ZID des deux chaperons et H2A.Z/H2B**
- (ii) La caractérisation du domaine LRR d'ANP32E et de son rôle dans le processus d'éviction de H2A.Z/H2B.**
- (iii) La caractérisation de l'interaction d'ANP32E et d'YL1 avec les nucléosomes canoniques et variants contenant H2A.Z.**

Au cours de ma thèse, j'ai donc abordé ces questions afin de parfaire la comparaison entre YL1 et ANP32E et de mieux comprendre la mécanistique impliquée dans le dépôt et l'éviction d'H2AZ/H2B.

Mon but est de caractériser, par une approche de biologie intégrative, l'interaction chaperon-nucléosome, afin de comparer les modes de liaison des chaperons aux rôles opposés et de proposer un modèle d'échange de H2A/H2A.Z sur la chromatine par YL1 et ANP32E. Les connaissances obtenues à partir de ces études pourront poser les bases du développement de nouvelles molécules anticancéreuses ciblant les mécanismes de dépôt/éviction d'H2A.Z par les facteurs de remodelage de la chromatine.

II. Résultats

A. Criblage des constructions pour ANP32E et YL1

Des travaux préliminaires conduits par le Dr. Nataliia Aleksandrova au sein de l'équipe ont permis les clonages des différents domaines d'ANP32E, c'est-à-dire les domaines LRR et ZID, et de la protéine entière, dans divers vecteurs d'expression. Ses travaux ont permis de vérifier l'expression et la solubilité des différentes constructions d'ANP32E fusionnées à différentes étiquettes. Ces différentes constructions ont été réalisées sur la base d'alignements de séquences présentés dans la Figure 40 (partie introductive de ce chapitre). Les limites des différents domaines utilisés sont schématisées dans la Figure 44.

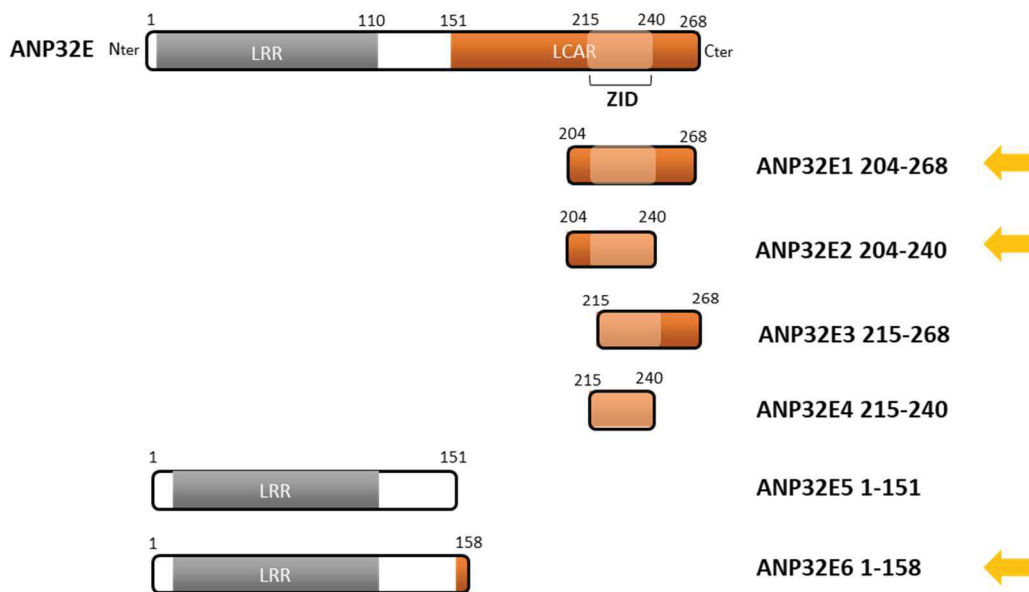


Figure 44 : Découpage de la protéine ANP32E en différentes constructions.

Les constructions 1 à 4, notées ANP32E1 à E4, contiennent le domaine ZID. Les constructions 5 à 6, notées ANP32E5 et E6, contiennent le domaine LRR.

Les flèches jaunes indiquent les constructions sélectionnées pour la poursuite du projet.

ZID = H2A.Z interacting domain

LRR= leucine rich region

Ses travaux ont permis la sélection des constructions ANP32E1 (204-268aa) et ANP32E2 (204-240aa) pour le domaine ZID, avec une étiquette His10-TRX en partie amino-terminale, qui améliore leur solubilité (LaVallie et al. 1993). Cela permet l'obtention de quantités de protéine suffisantes pour les études biophysiques. La protéine ANP32E1 possède, en plus de la protéine ANP32E2, une seconde région conservée en partie carboxy-terminale et est donc légèrement plus grande.

Pour le domaine LRR, la construction ANP32E6 fusionnée en partie amino-terminale avec une étiquette His6 a été choisie.

Pour le chaperon YL1, des travaux précédents, réalisés dans mon équipe par les Dr. Martin Marek et Dr. Tajith Shaik, ont permis de montrer que seul le domaine ZID (1-69) est exploitable lorsqu'il est exprimé chez *E.coli*. C'est cette construction qui a été utilisée dans le papier (Latrick et al. 2016).

B. Purifications des protéines

1. Purification des paires d'histones H2A/H2B ΔN_{ter} tails et variante H2A.Z/H2B ΔN_{ter} tails

L'expression et la purification des paires d'histones se fait en plusieurs étapes. Ces paires d'histones ont notamment été utilisées en ITC, afin de caractériser leurs interactions avec les chaperons YL1 et ANP32E.

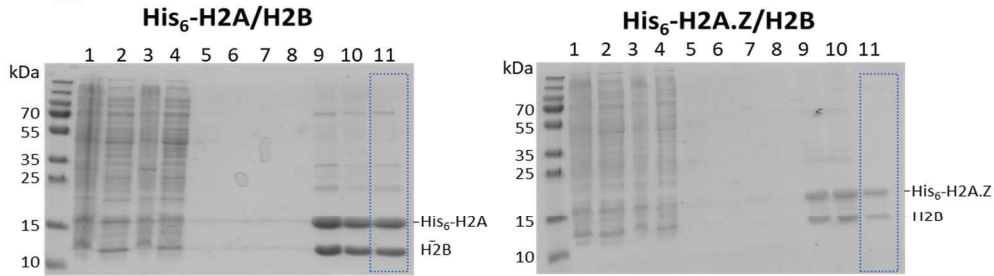
L'expression est réalisée en *E.coli* BL21(DE3) dans un milieu 2xLB. L'induction est effectuée lorsque la $DO_{600\text{ nm}}$ atteint 1, par ajout de 0.7 mM d'IPTG et est continuée sur la nuit à 25°C. 3L de culture ont été réalisés pour chaque paire d'histones, canonique ou variante, ces paires d'histones sont alors re-suspendues dans 50 mL de tampon de lyse (10 mM Tris pH 8 et 1000 mM NaCl) pour 1L de culture initiale.

Pour des questions de stabilité et de quantité, les histones utilisées ont été délétées de leur queue flexible en partie amino-terminale (noté ΔN_{ter} tails). J'ai ainsi utilisé pour H2A (NP_003501.1) $\Delta 1$ -15aa, pour H2A.Z (NP_002097.1) $\Delta 1$ -18aa et pour H2B (NP_0666402.2) $\Delta 1$ -30aa.

La purification des histones His6-H2A/H2B ΔN_{ter} tails et His6-H2A.Z/H2B ΔN_{ter} tails se fait en deux étapes, une étape d'affinité en utilisant la résine TALON® et une étape de gel filtration. L'étape d'affinité est tout d'abord réalisée à haute salinité (1M NaCl) puis dans les dernières étapes de lavage, ainsi que pour l'élution, le sel est diminué pour une concentration finale de 400 mM NaCl. Cette diminution est nécessaire afin d'obtenir un compromis entre la purification des histones et celle des chaperons, qui se fait à bas sel. En effet, les expériences d'ITC nécessitent un tampon strictement identique, correspondant alors au tampon de gel filtration (10 mM Tris pH 8, 400 mM NaCl et 0,5 mM TCEP). Les fractions correspondant aux paires d'histones sont ensuite concentrées à une concentration finale de 15 à 10 μM et seront utilisées en ITC. Un exemple de résultat de cette purification est présenté dans la Figure 45. Les paires d'histones H2A/H2B et H2A.Z/H2B, ont été purifiées indépendamment. Les rendements de purifications sont de 3 mg/L pour H2A/H2B et 0.45mg/L pour H2A.Z/H2B. Il est important de noter que H2A.Z/H2B est moins stable que H2A/H2B et que son rendement peut être augmenté, si l'intégralité de la purification se fait à 1 M NaCl.

Purification des paires d'histones (ΔN_{tails}):

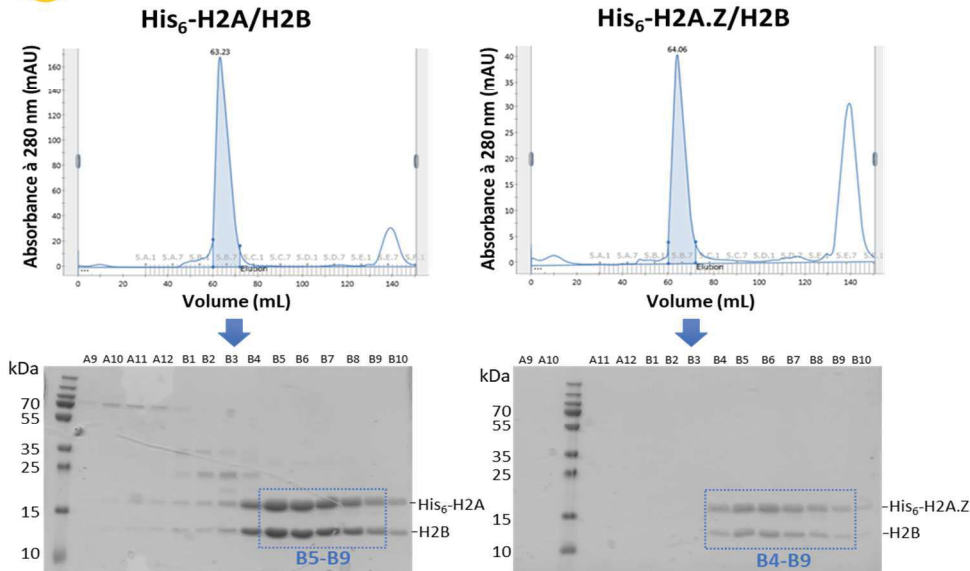
1 Affinité TALON



Légende:

- | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------------------|
| 1. Extraits totaux | 5. Lavage 1 | 9. Résine TALON avant élution |
| 2. Fraction non soluble | 6. Lavage 2 | 10. Résine TALON après élution |
| 3. Lysat clarifié | 7. Lavage 3 | 11. Eluât |
| 4. Fraction non retenue | 8. Lavage 4 | |

2 Gel filtration S75 16 600



3 Concentration, comparaison et rendements

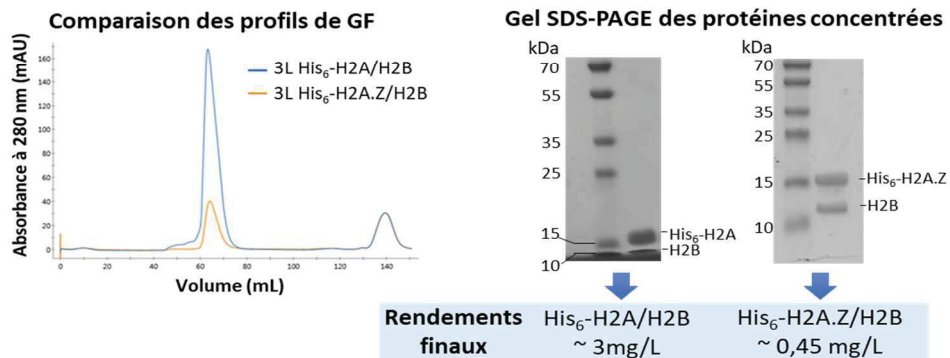


Figure 45 : Gels SDS-PAGE et chromatogrammes des purifications des paires d'histones H2A.Z/H2B ΔN_{ter} tails et H2A/H2B ΔN_{ter} tails

2. Purification des chaperons et des différents domaines des chaperons :

a. Les différents domaines d'ANP32E

J'ai ensuite entrepris les purifications des différents domaines d'ANP32E :

-His10-TRX-ANP32E1 (204-268) incluant le ZID et la seconde région conservée,

-His10-TRX-ANP32E2 (204-240) incluant le ZID,

-His6-ANP32E6 (1-158) incluant le domaine LRR.

Un exemple de ces purifications est visible dans la Figure 46.

L'expression de ces constructions est réalisée en *E.coli* BL21(DE3) en milieu 2xLB. L'induction est effectuée lorsque la $DO_{600\text{ nm}}$ atteint 0.7, par ajout de 0.7 mM d'IPTG et est continuée sur la nuit à 25°C. 3L de culture ont été réalisés pour chaque construction.

Les cellules sont alors re-suspendues dans un tampon de lyse adéquat : 10 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl pour His10-TRX-ANP32E1 et E2, et 10 mM Tris HCl pH 8, 400 mM NaCl pour His6-ANP32E6. Quelle que soit la construction, la purification est réalisée en deux étapes, une purification par affinité TALON® suivie d'une filtration sur gel.

Comme nous l'avons vu précédemment ; les expériences d'ITC nécessitent un tampon strictement identique. Ainsi, pour les constructions His10-TRX-ANP32E1 et E2, un gradient croissant de la concentration saline du tampon a été effectué lors de l'étape de lavage de l'affinité pour aboutir à une concentration finale de 400 mM NaCl lors l'élution. Pour ANP32E6, la concentration saline reste fixe tout au long de la purification.

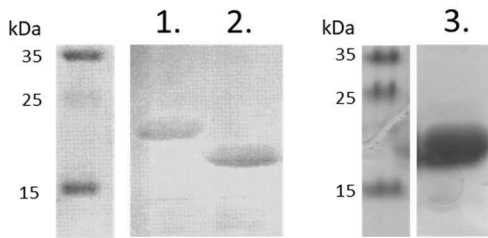
Une gel filtration S75 16/600 est ensuite réalisée pour chaque construction, en utilisant un tampon composé de 10 mM Tris pH 8, 400 mM NaCl et 0,5 mM TCEP.

Les fractions correspondant aux protéines d'intérêts sont ensuite concentrées. Cette concentration a pu être montée jusqu'à 300 μM pour certaines protéines. Une concentration finale de 90 μM a été utilisée en ITC.

Les rendements de ces purifications sont plutôt bons entre 1.3 et 2.5 mg/L. De plus, la monodispersité des échantillons a été vérifiée par DLS. Nous voyons sur la Figure 46 que ces protéines semblent homogènes avec des polydispersités faibles, excepté pour ANP32E2.

Purification des constructions d'ANP32E :

1 Affinité TALON

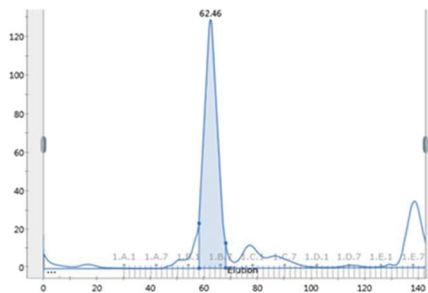


Elution:

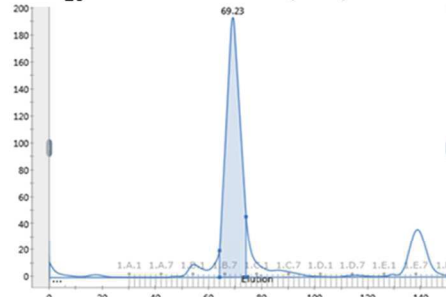
1. His10-TRX-ANP32E1 – 23 kDa
2. His10-TRX-ANP32E2 – 19 kDa
3. His6-ANP32E6 - 20,5 kDa

2 GF S75 16 600

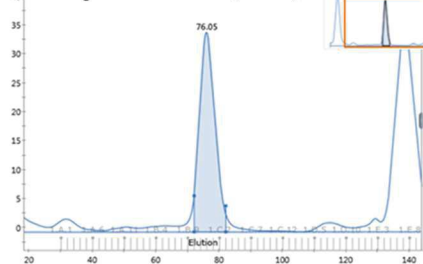
His₁₀-TRX-ANP32E1 (ZID)



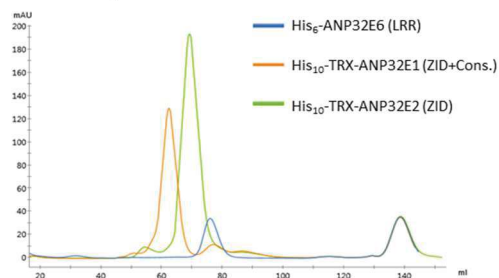
His₁₀-TRX-ANP32E2 (ZID)



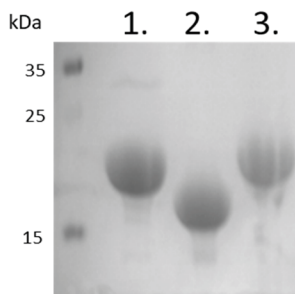
His₆-ANP32E6 (LRR)



Comparaison



3 Concentration, DLS et rendements



	His10-TRX-ANP32E1	His10-TRX-ANP32E2	His6-ANP32E6
DLS (Pd %)	23	Multimodale	18
Rendement (mg/L)	1,3	1,4	2,5

Figure 46 : Résultats de purification des différentes constructions d'ANP32E
Gels SDS-PAGE et chromatogrammes des différentes étapes de purification, (Pd) : polydispersité

b. Purification YL1-ZID (1-69)

Pour ces travaux, j'ai également purifié le fragment ZID du chaperon YL1 fusionné à une étiquette His6 en partie amino-terminale. L'expression et la purification de cette protéine se font de manière identique à ce qui a été décrit (dans le paragraphe précédent) pour le fragment His6-ANP32E6. Cependant le rendement de cette purification étant plus faible, 0.5 mg/L, il est essentiel de purifier 6 L de culture pour une expérience d'ITC.

Les résultats de cette purification sont présentés dans la Figure 47.

Purification d'YL1-ZID :

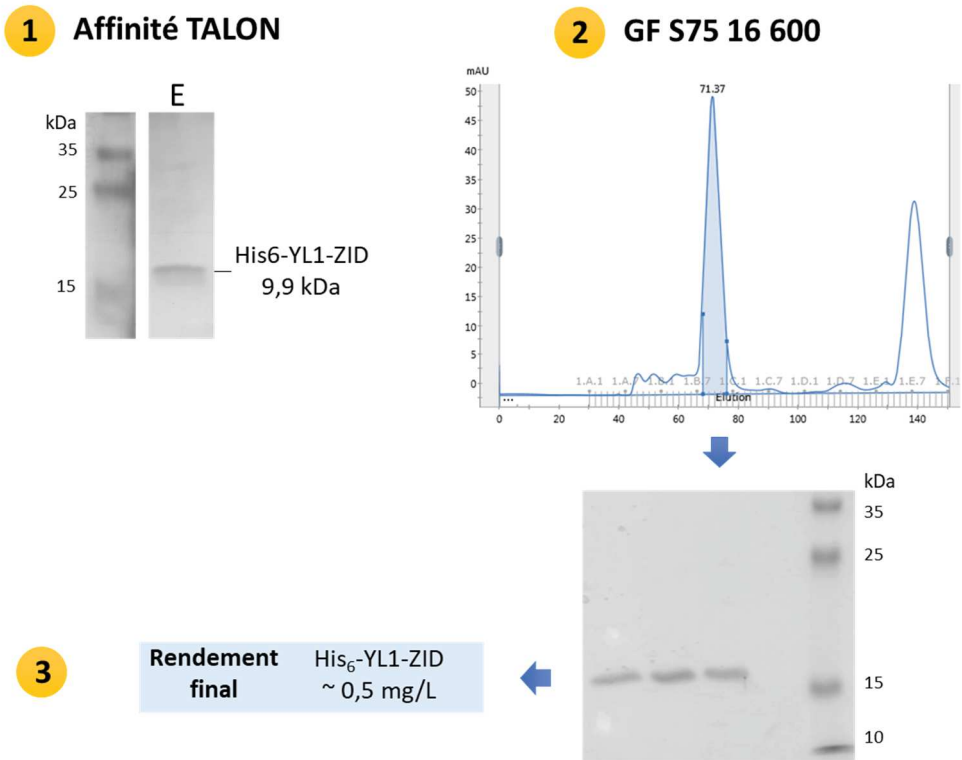


Figure 47 : Purification d'His6-YL1 ZID
Gels SDS-PAGE 15% et chromatogramme, (E) : élution.

c. Purification d'ANP32E FL

J'ai dans un second temps entrepris la purification de la protéine ANP32E entière avec une étiquette His6 ou GST en partie N-terminale.

Les rendements de ces purifications, inférieurs à 0,2 mg/L, ne permettent pas son utilisation en ITC. La protéine ANP32E FL a cependant été utilisée avec d'autres approches permettant de caractériser les interactions protéine-protéine, notamment des essais de SPR.

Pour ce faire, j'ai produit 6 L de culture en *E.coli* BL21(DE3) avec le milieu 2xLB. L'induction est réalisée à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.7, en ajoutant 0.7 mM IPTG, et est continuée sur la nuit à 25°C. Les cellules sont lysées dans un tampon contenant : 10 mM Tris HCl pH 8 et 150 mM NaCl. La purification est ensuite réalisée, avec une première étape d'affinité correspondant à l'étiquette utilisée et une seconde étape de gel filtration S200 16/600. Une salinité de 150 mM est gardée tout au long de la purification. La Figure 48 permet de donner un exemple de cette purification.

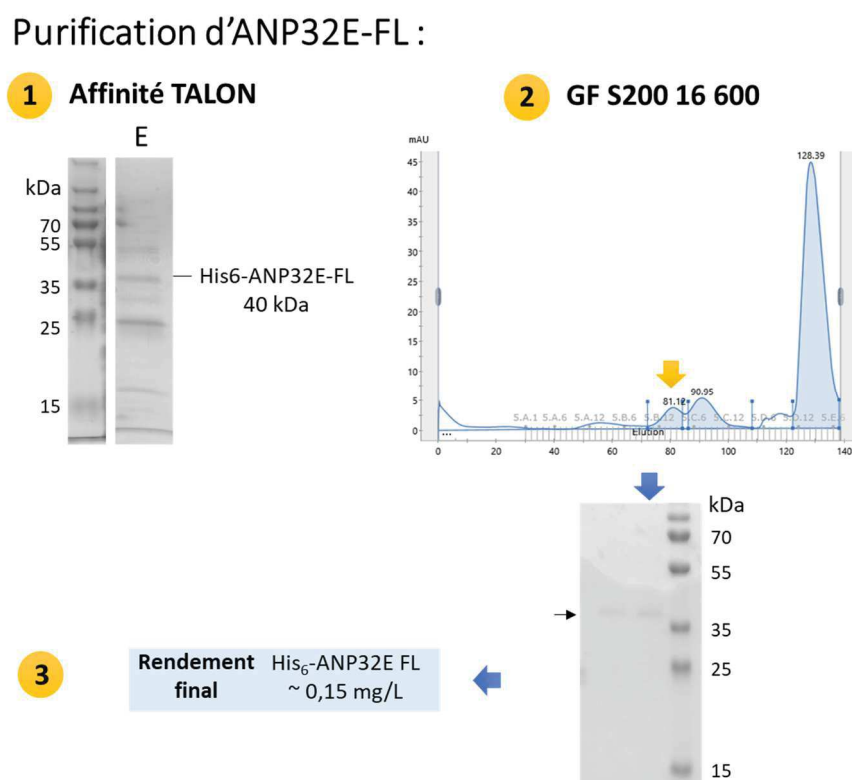


Figure 48 : Purification d'His6-YL1 ZID
Gels SDS-PAGE 15% et chromatogramme, (E) : élution.

C. Etude comparative d'ANP32E et YL1 avec la paire d'histones variante H2A.Z/H2B

Des travaux portant sur la caractérisation, notamment biophysique, du chaperon YL1-ZID ont été publiés par mon équipe en 2016 (Latrick 2016). Au contraire du chaperon ANP32E-ZID, qui reste peu caractérisé à ce jour.

J'ai ainsi comparé ces deux chaperons aux rôles opposés. Pour ce faire, j'ai tout d'abord caractérisé de manière biophysique, par ITC, l'interaction d'ANP32E et de ses différents domaines avec H2A.Z/H2B.

1. Caractérisation de l'interaction ANP32E-ZID avec H2A.Z/H2B en ITC

Les chaperons et les histones ont été purifiés séparément, puis mélangés à l'intérieur du calorimètre lors des expériences d'ITC. Les histones se situant dans la cuve du calorimètre ont progressivement été titrées par les chaperons (différentes constructions) présents dans la seringue.

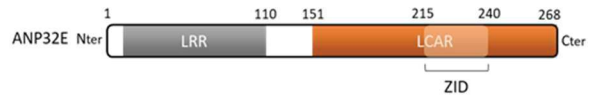
ANP32E est un chaperon spécifique de H2A.Z/H2B (Obri 2014), j'ai donc vérifié cette spécificité par ITC en testant son interaction avec la paire d'histones canonique H2A/H2B Δ Nter tails. La paire d'histones canonique a ainsi été titrée par les différentes constructions d'ANP32E (E1, E2 et E6). Les thermogrammes présentés en Figure 49 panel du haut, nous montrent qu'aucune des régions d'ANP32E, ZID (E1 et E2) ou LRR (E6) n'est capable de lier la paire d'histones H2A/H2B, confirmant sa spécificité.

J'ai ensuite utilisé l'ITC pour caractériser l'interaction du domaine ZID d'ANP32E (constructions E1 et E2) avec la paire d'histones variante H2A.Z/H2B Δ N_{ter} tails, non caractérisée à ce jour. J'ai également testé l'interaction entre le domaine LRR d'ANP32E (construction E6) et H2A.Z/H2B Δ N_{ter} tails. Ces résultats sont présentés dans la Figure 49 panel du bas.

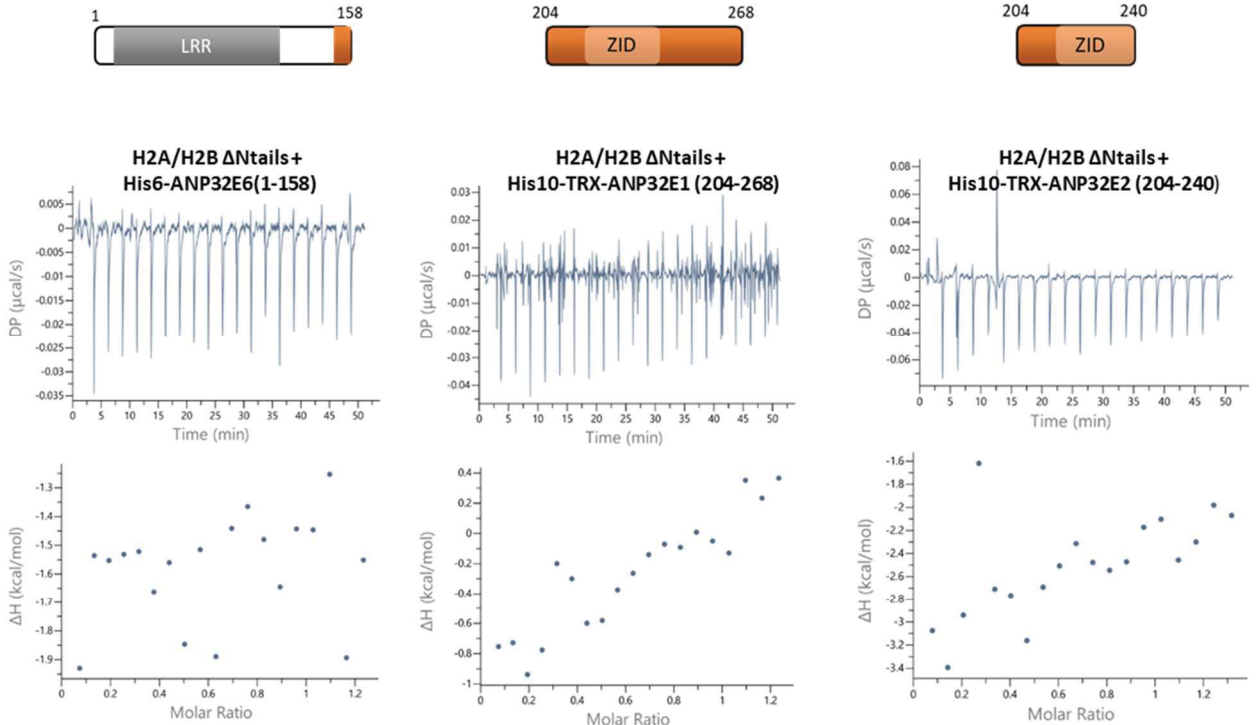
Nous voyons qu'ANP32E6-LRR seul n'est pas capable de lier la paire d'histones variante H2A.Z/H2B Δ N_{ter} tails dans les conditions d'ITC testées.

Pour le domaine ZID d'ANP32E, des résultats similaires sont obtenus pour les deux constructions His10-TRX-ANP32E1 et His10-TRX-ANP32E2. Dans ces deux cas, une liaison est observée avec la paire d'histones variante H2A.Z/H2B Δ N_{ter} tails. Cependant, nous observons un double événement de liaison. Il semble ainsi y avoir un premier événement avec un K_{D1} très affin < 1 nM pour ANP32E1 et ~ 3 nM pour ANP32E2, et un second K_{D2} toujours très affin d'environ 20 nM pour les deux constructions. Les stœchiométries observées pour ces deux événements sont respectivement comprises entre 0,41-0,45 et entre 1,84-1,85.

ITC avec ANP32E



H2A/H2B ΔNtails



H2A.Z/H2B ΔNtails

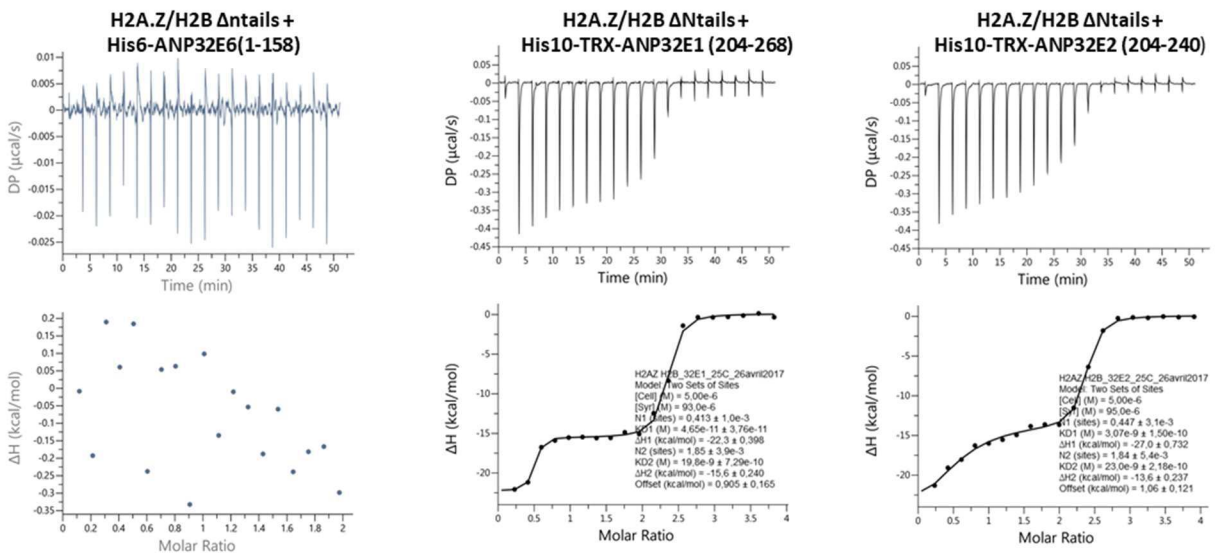


Figure 49 : Thermographes d'ITC pour les diverses constructions d'ANP32E avec la paire d'histones canonique ou variante H2A.Z

Ces résultats sont surprenants car au niveau structural il n'y a qu'un seul site de liaison entre H2A.Z/H2B et ANP32E-ZID, il ne devrait ainsi y avoir qu'un seul évènement de liaison.

Les résultats entre ANP32E1 et E2 étant identiques, j'ai décidé de poursuivre en utilisant uniquement ANP32E1. En effet, ce dernier donne de meilleurs résultats en DLS et possède également un domaine supplémentaire conservé en partie C-terminale.

Cette expérience d'ITC avec His10-TRX-ANP32E1 et H2A.Z/H2B ΔN_{ter} tails a été réalisée en quadruplicats sur des lots de protéines différentes, montrant toujours le même profil.

2. Comparaison avec YL1

J'ai ensuite comparé ces résultats à ceux obtenus pour l'interaction entre YL1-ZID et H2A.Z/H2B ΔN_{ter} tails. Cette interaction avait été caractérisée précédemment mais j'ai tout de même effectué la mesure par moi-même, afin d'avoir des résultats comparables, au niveau manipulateur, entre les deux chaperons.

Tout d'abord, mon résultat pour His6-YL1-ZID et H2A.Z/H2B ΔN_{ter} tails est comparable à celui trouvé précédemment. J'ai ainsi obtenu une affinité d'interaction de 2.3 nM, contre 4.4 nM précédemment publié par mon équipe. Dans les deux cas, la stœchiométrie est identique ($n=1$).

Mes résultats d'ITC montrent que l'interaction d'His10-TRX-ANP32E-ZID avec H2A.Z/H2B ΔN_{ter} tails est bien différente de celle d'His6-YL1-ZID avec la même paire d'histones variante. Plus précisément, deux évènements de liaison sont observés pour ANP32E-ZID, tandis qu'un seul est observé pour YL1-ZID (Figure 50 - A).

Cette différence n'est pas détectée au niveau de la structure. En effet YL1-ZID et ANP32E-ZID induisent le même changement de conformation de l'hélice C-terminale d'H2A.Z et semblent se lier par un mode de liaison similaire : un chaperon pour une paire d'histones H2A.Z variante (Figure 50 - B).

Il est donc impossible, en l'état, de déterminer l'affinité de l'interaction entre ANP32E ZID et H2A.Z/H2B, car nous obtenons deux K_D pouvant tous deux correspondre à cette liaison ($K_{D1} < 1\text{nM}$, $n_1=0,41$ et $K_{D2} \sim 20\text{ nM}$, $n_2= 1,85$).

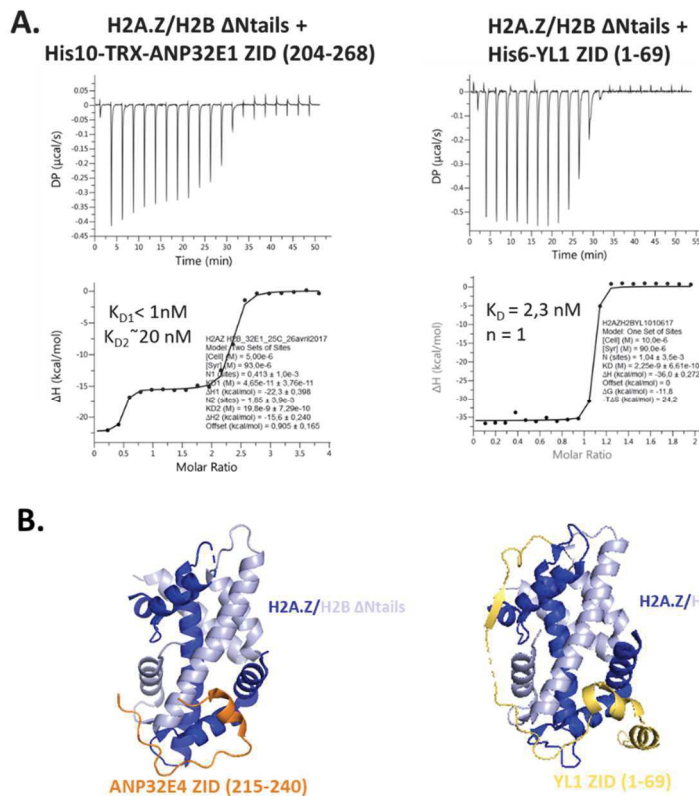


Figure 50 : Comparaison de l'interaction entre ANP32E1 ZID et YL1 ZID avec la paire d'histones variante H2A.Z

(A) Courbes d'ITC obtenues pour les interactions His10-TRX-ANP32E1 et His6-YL1 ZID avec H2A.Z/H2B ΔNtails

(B) Structure d'ANP32E-ZID-H2A.Z/H2B (à gauche) et d'YL1-ZID-H2A.Z/H2B (à droite)

J'ai ainsi cherché à comprendre d'où pouvait provenir ce 2^{ème} évènement de liaison. Sachant que la paire d'histones variante utilisée pour ces deux chaperons est la même et que j'ai pu reproduire les résultats avec YL1-ZID, nous pouvons conclure qu'il ne semble pas y avoir un effet des histones sur les mesures.

Je me suis alors demandée quelles étaient les différences au niveau de la purification de ces deux chaperons. Une différence de taille (15 kDa) est la présence d'une étiquette His10-TRX sur la construction ANP32E1, qui n'est pas présente pour YL1-ZID qui possède une étiquette His6.

Le contrôle négatif, tampon contre His10-TRX-ANP32E1, a été réalisé et il n'y a pas de liaison sur le thermographe (ce contrôle est visible sur la figure des prochaines expériences d'ITC, Figure 53).

J'ai alors vérifié que ce deuxième évènement de liaison ne soit pas un artéfact provenant de l'étiquette de purification. J'ai purifié l'étiquette His10-TRX seule et vérifié qu'elle ne lie pas la

paire d'histones variante H2A.Z/H2B, ce qui est bien le cas. Il n'y a donc pas de liaison aspécifique liée à cette étiquette de purification à la paire d'histones variante.

Afin, de mieux comprendre ce deuxième événement de liaison, j'ai ensuite décidé de caractériser l'échantillon His10-TRX-ANP32E1 par AUC.

3. Caractérisation en AUC

a. His10-TRX-ANP32E1

Pour caractériser l'échantillon His10-TRX-ANP32E1, des expériences d'AUC par vitesse de sédimentation (AUC-SV) ou par équilibre de sédimentation (AUC-SE) ont été réalisées avec le Dr. Nataliia ALEKSANDROVA, ainsi qu'avec l'aide du Dr. Catherine BIRCK sur la plateforme de Biologie et Génomique Structurale de l'IGBMC, qui a effectué l'analyse des résultats.

Les deux expériences d'AUC (SV et SE) sont en accords et montrent deux espèces présentes en solution. Les résultats d'AUC-SV sont montrés dans la Figure 51 – A.

Une première espèce est largement majoritaire (89%), cette espèce a une taille 25 kDa et correspond à His10-TRX-ANP32E1 sous forme monomérique (taille théorique 23 kDa). La seconde espèce est minoritaire (11%) et correspond à une protéine de 46 kDa. Ainsi cette seconde espèce pourrait être un dimère d'His10-TRX-ANP32E1.

L'AUC a ainsi permis de mettre en évidence une dimérisation de His10-TRX-ANP32E1 (ZID). Cette dimérisation, non détectée dans les analyses biochimiques précédentes, peut potentiellement s'expliquer du fait de la concentration élevée d'ANP32E1.

Si cette hypothèse est correcte, cela signifie que la proportion de forme dimérique est potentiellement plus importante en ITC. En effet, la concentration utilisable en AUC-SV est environ 10 fois plus faible que celle utilisée pour les expériences d'ITC (0.25 mg/mL contre 90 μ M soit 2.5 mg/mL).

J'ai ainsi pu proposer un modèle intégrant les deux événements de liaison visibles en ITC :

1. Dissociation du dimère His10-TRX-ANP32E1 (ZID).
2. Liaison d'ANP32E1 monomérique au dimère H2A.Z/H2B.

Ce modèle comporte cependant des faiblesses. En effet, comme nous l'avons vu précédemment le contrôle tampon contre His10-TRX-ANP32E1 n'indique pas de liaison sur le thermographe, or la dissociation du dimère, liée à sa dilution dans la cuve, devrait être visible. Ce premier événement reste donc mal caractérisé et pourrait potentiellement correspondre à plusieurs événements simultanés. La liaison de H2A.Z/H2B avec la forme dimérique d'His10-TRX-ANP32E1 semble se faire au même moment que la dissociation du dimère d'ANP32E1.

Ainsi, nous proposons que la liaison entre ANP32E1 et la paire d'histones variante corresponde au deuxième événement de liaison. Cette interaction aurait donc une affinité de 20 nM.

Afin de confirmer cette hypothèse j'ai décidé d'utiliser l'AUC SV, mais également l'AUC SE permettant de déterminer les constantes d'équilibre du complexe His10-TRX-ANP32E1 + H2A.Z/H2B Δ Ntails.

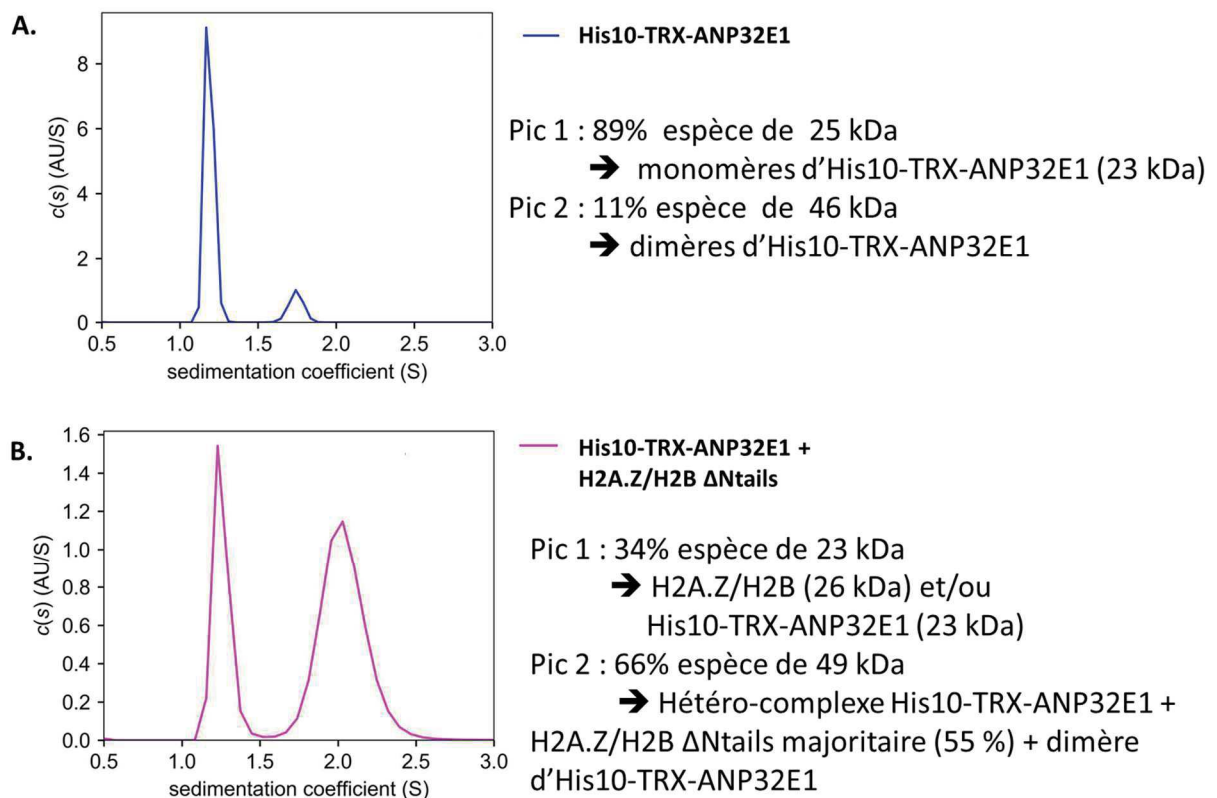


Figure 51 : Données d'AUC-SV pour les échantillons (A) His10-TRX-ANP32E1 et (B) His10-TRX-ANP32E1 + H2A.Z/H2B Δ Ntails

b. His10-TRX-ANP32E1 + H2A.Z/H2B Δ Ntails

J'ai donc utilisé l'AUC SV et SE pour caractériser le complexe His10-TRX-ANP32E1 + H2A.Z/H2B Δ Ntails. La Figure 51 - B présente les résultats d'AUC-SV obtenus.

Nous voyons ainsi un premier pic correspondant à 34% des espèces en solution. Ce pic est situé à environ 23 kDa. Il peut ainsi correspondre aux protéines His10-TRX-ANP32E1 ou H2A.Z/H2B Δ Ntails seules et non complexées.

Le deuxième pic de 49 kDa correspond à 64% des espèces en solution. Ce pic contient donc certainement une faible proportion d'His10-TRX-ANP32E1 sous forme dimérique mais semble très majoritairement composé d'hétéro-complexe His10-TRX-ANP32E1 + H2A.Z/H2B ΔNtails (taille théorique 49 kDa). Ainsi, plus de 55 % de l'échantillon semble être sous forme d'hétéro-complexe His10-TRX-ANP32E1 + H2A.Z/H2B ΔNtails.

J'ai également effectué de l'AUC-SE sur le complexe His10-TRX-ANP32E1 + H2A.Z/H2B ΔNtails. Les données montrent un équilibre de cet hétéro-complexe d'environ 31 nM.

De plus, pour l'expérience d'AUC-SE contenant uniquement le complexe His10-TRX-ANP32E1 l'équilibre est d'environ 63 μM, ce qui est largement négligeable par rapport au K_D de 31 nM observé lorsque la paire d'histones variante est présente.

Ce K_D de 31 nM pour la liaison entre His10-TRX-ANP32E1 et H2A.Z/H2B ΔNtails est en accord avec le K_{D2} obtenu en ITC qui est de 20 nM.

Cela confirme que le deuxième événement de liaison observé en ITC correspondrait bien à la liaison entre le chaperon ANP32E1 et la paire d'histones H2A.Z variante.

L'affinité de la liaison d'His10-TRX-ANP32E1 à la paire d'histones H2A.Z/H2B ΔNtails semble donc être comprise entre 20 et 30 nM, en fonction de la technique employée.

Ainsi, le deuxième événement de liaison observé en ITC a été caractérisé et validé par AUC. Toutefois, il reste toujours un questionnement sur le 1^{er} événement observé en ITC, qui impliquerait la présence d'un dimère d'His10-TRX-ANP32E1-ZID, confirmé par AUC. L'existence de ce dimère dans un contexte biologique n'ayant jamais été décrit dans la littérature, nous avons voulu nous assurer de la non-implication de l'étiquette His10-TRX dans la dimérisation. Pour cela, nous avons testé une construction d'ANP32E1 ZID fusionnée avec l'étiquette His10-SUMO.

4. Caractérisation de l'interaction ANP32E-ZID avec H2A.Z/H2B en ITC avec une autre étiquette

Nous avons caractérisé l'interaction entre His10-SUMO-ANP32E1-ZID et H2A.Z/H2B ΔNter tails par ITC. Les conditions de l'expérience sont identiques à celles réalisées précédemment avec His10-TRX-ANP32E1-ZID. La Figure 52, montre ce résultat. Nous voyons qu'il a bien une liaison entre His10-SUMO-ANP32E1-ZID et H2A.Z/H2B ΔNter. Cette interaction présente un K_D de 18 nM et une stœchiométrie de 0,5.

Ainsi, il semble n'y avoir qu'un seul événement de liaison, au contraire des deux événements observés avec la même construction fusionnée à l'étiquette His10-TRX. De ce fait, la formation du dimère d'ANP32E semble bien être liée à l'étiquette His10-TRX.

H2A.Z/H2B Δ Ntails + His10-SUMO-ANP32E1 ZID (204-268)

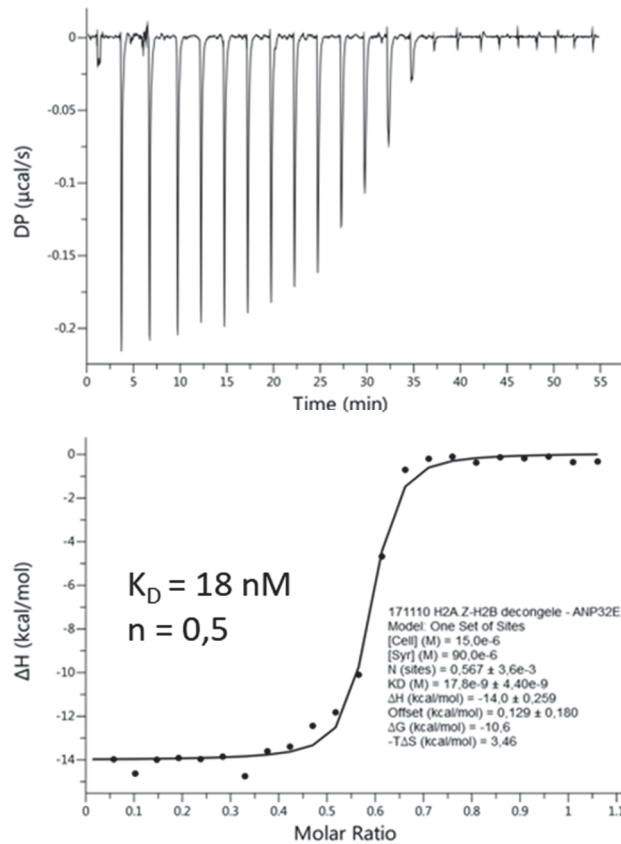


Figure 52 : Thermogrammes d'ITC pour l'interaction entre His10-SUMO-ANP32E1-ZID et H2A.Z/H2B Δ Nter tails

Ce K_D est du même ordre que la constante de dissociation à l'équilibre du deuxième événement de liaison obtenue avec la construction His10-TRX-ANP32E1-ZID en ITC, corroborant également les résultats d'AUC-SE pour lesquels nous obtenons un K_D de 30 nM.

Si nous comparons ces résultats à ceux du chaperon His6-YL1-ZID, nous voyons que la liaison d'YL1-ZID à H2A.Z/H2B serait dix fois plus forte que celle d'ANP32E1-ZID, avec des K_D de 2.3 à 4,4 nM et de 18 à 30 nM respectivement (selon les étiquettes et la méthode utilisées). Cela concorde avec les données structurales précédemment obtenues.

D. Etude comparative d'ANP32E et YL1 avec les paires d'histones H2A.Z-like/H2B et H2A-like/H2B

1. Les mutants de H2A qui sont H2A.Z-like

Les expériences d'ITC réalisées entre YL1-ZID et H2A.Z/H2B, ainsi que les études structurales d'YL1-ZID avaient permis de révéler précisément quels résidus de H2A.Z sont essentiels à la formation du complexe et à la spécificité d'YL1 (Latrick et al. 2016) et sont décrits dans la partie « Dépôt par YL1 – SRCAP » de ce chapitre.

Ainsi, cinq mutants de H2A (H2A.Z-like), décrits dans la Figure 54 - 1 avaient été construits. Les 4 premiers sont des simples mutants et le dernier est le quadruple mutant comprenant toutes les mutations. Les résultats pour YL1 avaient montré que chaque simple mutant présente un gain d'affinité en comparaison à H2A/H2B non mutés, qui ne lie pas YL1 ZID. De plus, l'utilisation du quadruple mutant de H2A, permettait de rétablir entièrement la liaison, en obtenant un K_D d'environ 5.6 nM contre 4.4 nM avec H2A.Z/H2B (Latrick et al. 2016).

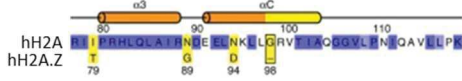
a. Caractérisation avec ANP32E1

J'ai donc utilisé ces mêmes mutants de H2A (H2A.Z-like), afin de vérifier et de caractériser leur implication sur la liaison avec le chaperon ANP32E1 ZID. Ces mutations et leurs positions sont décrites dans la Figure 53 - 1 et 2. J'ai produit et purifié ces 5 mutants en suivant une approche identique à ce qui a été fait pour les paires d'histones canonique et variante H2A.Z (Figure 53 - 3). J'ai ensuite caractérisé l'interaction de tous ces mutants avec ANP32E1-ZID par ITC. Les résultats sont présentés dans la Figure 53 - 4.

Nous n'observons pas de liaison, et ce sur aucune des courbes d'ITC. **Cela signifie qu'aucun des mutants, ni même le quadruple mutant H2A Δ G98, I79T, N89G, N94D (Mutant 5), ne permet de rétablir la liaison avec His10-TRX-ANP32E1.**

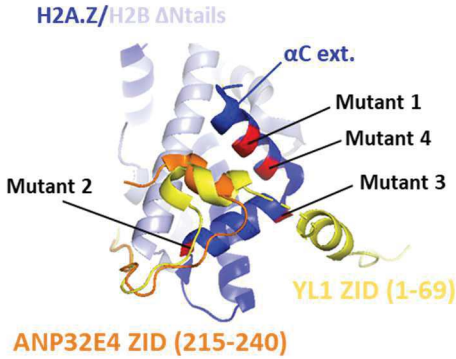
Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer ce résultat seront proposées en discussion de ce chapitre.

1 Design des mutants de H2A (H2A.Z-like)

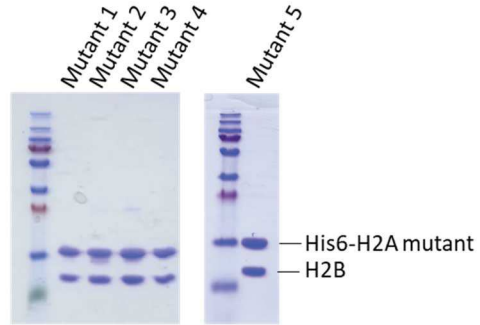


- Mutant 1 : H2A ΔG98/H2B ΔNtails
- Mutant 2 : H2A I79T/H2B ΔNtails
- Mutant 3 : H2A N89G/H2B ΔNtails
- Mutant 4 : H2A N94D/H2B ΔNtails
- Mutant 5 : H2A I79T, N89G, N94D, ΔG98 /H2B ΔNtails

2 Localisation des positions équivalentes des mutants de H2A dans la structure H2A.Z



3 Gel SDS-PAGE des mutants de H2A



4 ITC : Mutants de H2A avec ANP32E1 (204-268)

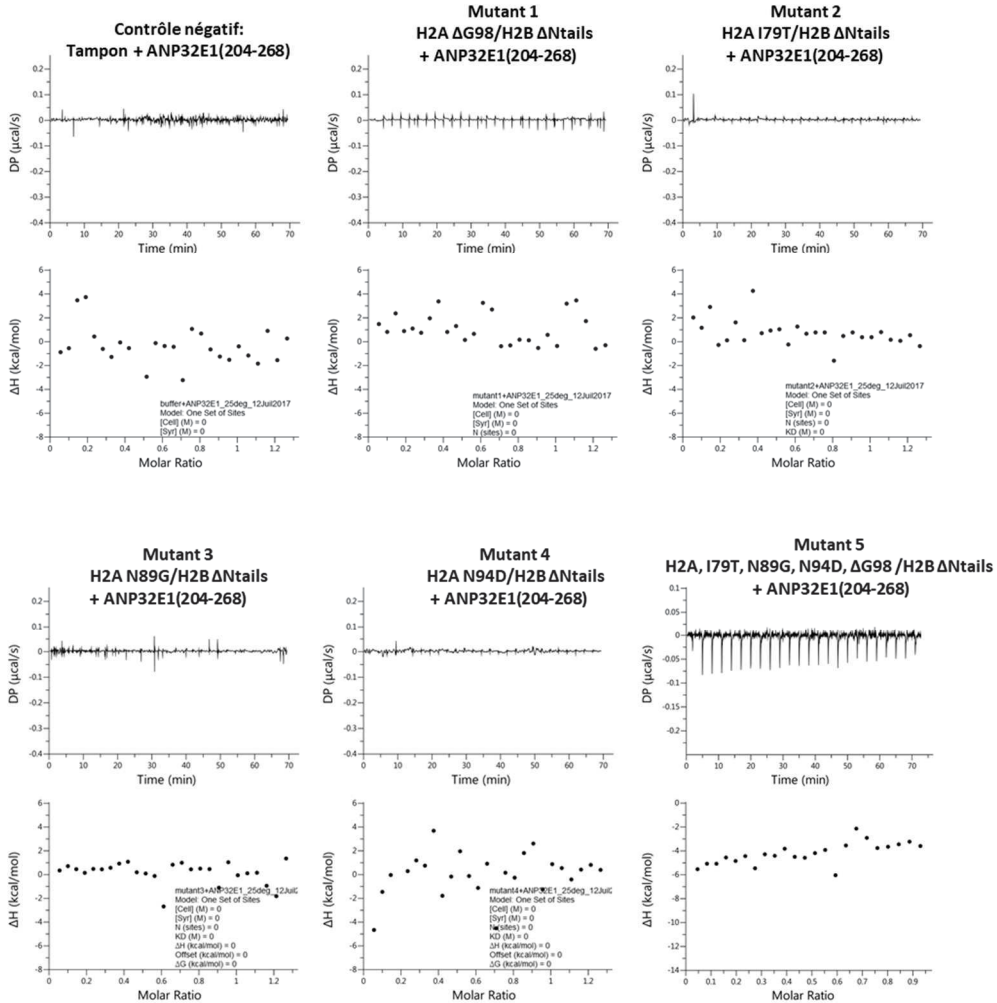


Figure 53 : Récapitulatifs des expériences réalisées avec les mutants H2A.Z-like/H2B

1. Représentation schématique des mutants sur la séquence d'H2A
2. Localisation des mutants sur les structures d'YL1-ZID et d'ANP32E4-ZID en complexe avec la paire d'histones variante H2A.Z.
3. Résultats des purifications des mutants H2A.Z-like/H2B sur gel SDS-PAGE 15%
4. Thermographe d'ITC testant l'interaction entre les divers mutants H2A.Z-like/H2B et ANP32E1-ZID

b. Comparaison avec YL1

La différence entre les deux chaperons est encore une fois significative, notamment en utilisant le quadruple mutant de H2A Δ G98, I79T, N89G, N94D qui est H2A.Z-like.

Pour ANP32E1 ZID, il n'y a pas de restitution de l'interaction avec le dimère H2A Δ G98, I79T, N89G, N94D /H2B, alors que la restitution d'interaction est complète pour YL1-ZID. Le K_D obtenu pour YL1-ZID avec ce quadruple mutant est ainsi de 5.6 nM contre 2.3 à 4.4 nM pour H2A.Z/H2B (Figure 54).

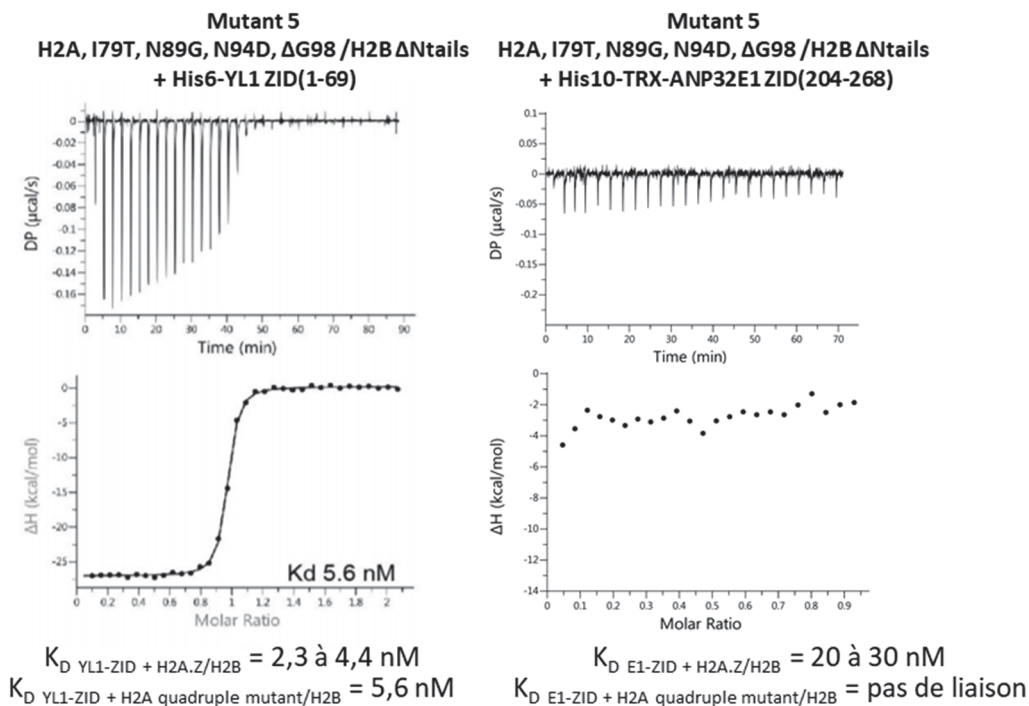


Figure 54 : Courbes d'ITC obtenues pour les interactions YL1-ZID et ANP32E ZID avec le quadruple mutant de H2A (H2A.Z-like)/H2B

Courbes permettant théoriquement d'évaluer le gain d'affinité lié à plusieurs résidus impliqués dans l'interaction.

Courbe YL1-ZID + H2A.Z/H2B reprise de (Latrick et al. 2016)

2. Les mutants de H2A.Z qui sont H2A-like

Ces résultats précédents interrogent car l'introduction dans la cassette M6 de H2A.Z d'une glycine observée chez H2A mais pas chez H2A.Z abolit toute interaction avec ANP32E (Obri et al. 2014). J'ai donc choisi une approche de mutation inverse H2A-like, c'est-à-dire muter H2A.Z par des résidus équivalents de H2A. De cette manière, il devait être possible de suivre la perte d'affinité plutôt que le gain d'affinité pour les différents mutants.

Ces mutants n'avaient pas été réalisés précédemment, je les ai donc réalisés moi-même. De même, l'interaction d'YL1 avec ces mutants n'avait jamais été testée. La liste des mutants réalisés est présentée dans la Figure 55 - 1.

J'ai ainsi cloné deux simples mutants de H2A.Z, contenant soit la mutation +G101 (Mutant 1*), soit la mutation T82I (Mutant 2*). J'ai ensuite effectué des doubles mutants (Mutant 3* et Mutant 4*), puis un triple mutant H2A.Z T82I, G92N, +G101 (Mutant 5*). Pour finir, j'ai effectué un quadruple mutant de H2A.Z qui est donc H2A-like (Mutant 6*). Si ce mutant présente un effet opposé au quadruple mutant H2A.Z-like (Mutant 5 : H2A I79T, N89G, N94D, Δ G98 /H2B Δ Ntails), il devrait alors permettre l'abolissement total de la liaison avec YL1-ZID.

J'ai ensuite produit et purifié ces mutants en utilisant la même approche que pour les paires d'histones sauvages. Cependant, les faibles expressions et stabilités des mutants obtenus n'ont pas permis de poursuivre en ITC. J'ai donc entrepris d'effectuer cette caractérisation en utilisant une méthode de co-expression et de co-purification à petite échelle chez *E.coli* (minitests). Ce test biochimique ne nécessite pas de grande quantité de protéines et permet de comparer facilement plusieurs conditions.

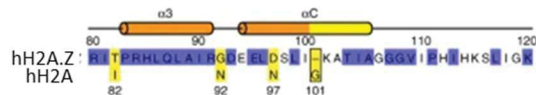
Pour des raisons de compatibilité lors de la co-expression, les chaperons ont été reclés de manière à obtenir une fusion GST en partie amino-terminale.

J'ai ainsi co-exprimé les différentes paires d'histones sauvages ou mutées avec les différents chaperons-ZID. La purification a été réalisée en utilisant l'étiquette GST des chaperons. Ainsi, si les paires d'histones interagissent avec les chaperons-ZID, elles seront co-purifiées et visibles sur gel SDS-PAGE.

Ces résultats de minitests sont présentés dans la Figure 55 – 2.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec cette approche H2A-like concordent avec ce que nous avons vu avec l'approche H2A.Z-like.

1 Design des mutants de H2A.Z (H2A-like)



- Mutant 1* : H2A.Z +G101 /H2B ΔNtails
- Mutant 2* : H2A.Z T82I /H2B ΔNtails
- Mutant 3* : H2A.Z T82I, +G101 /H2B ΔNtails
- Mutant 4* : H2A.Z T82I, D97N /H2B ΔNtails
- Mutant 5* : H2A.Z T82I, D97N, +G101 /H2B ΔNtails
- Mutant 6* : H2A.Z T82I, G92N, D97N, +G101 /H2B ΔNtails

2 Vérification de l'interaction par Minitests

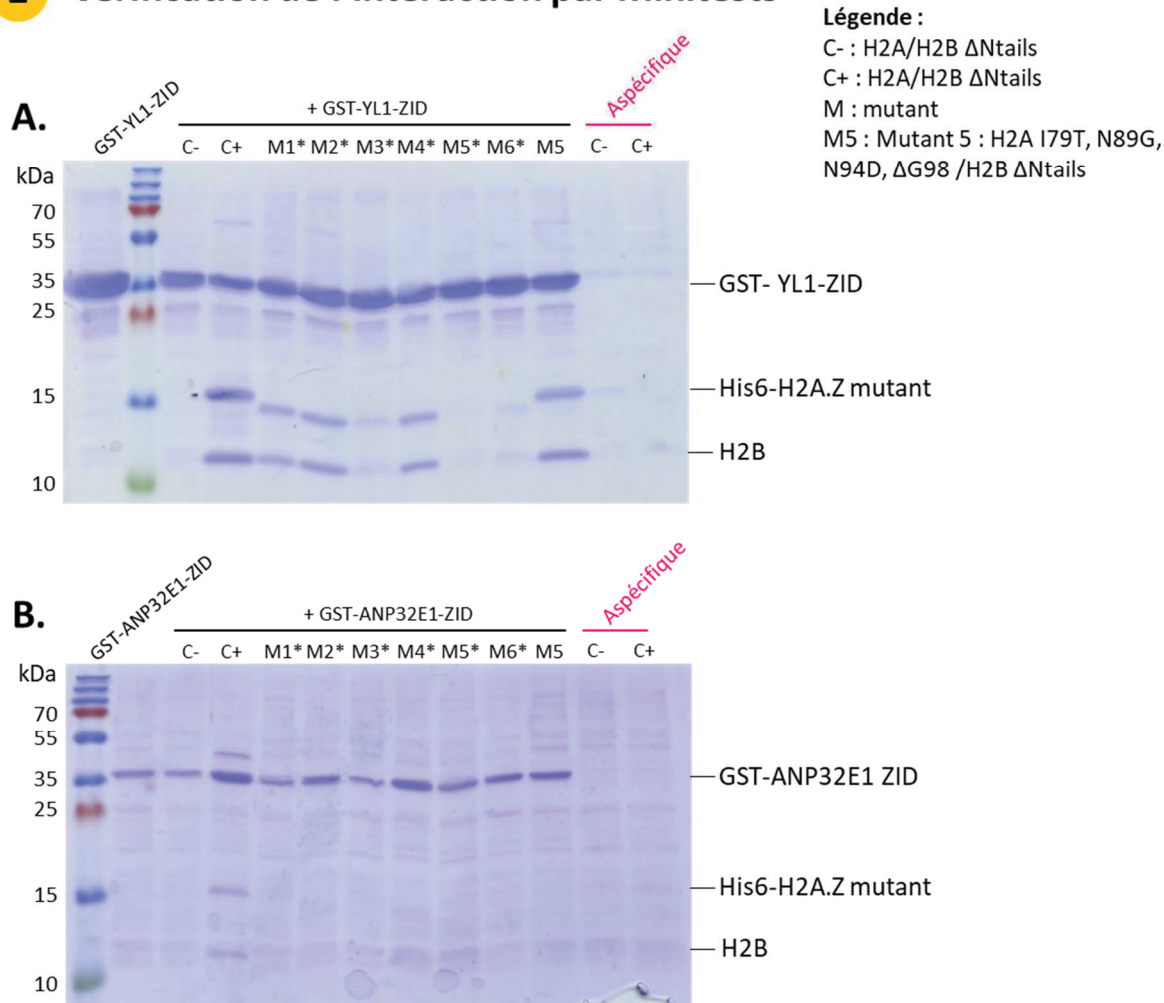


Figure 55 : Design des mutants H2A-like et résultats des minitests

1. Représentation schématique des mutants sur la séquence d'H2A.Z
2. Gel SDS-PAGE 15% des minitests

Pour YL1, nous voyons que les contrôles sont bien validés. YL1 n'interagit pas avec la paire d'histones canonique H2A (notée C-) et deux bandes sont bien visibles sur gel SDS-PAGE pour son interaction avec la paire d'histones variante H2A.Z (notée C+). Il n'y a pas de liaison aspécifique des paires d'histones canonique ou variante sur la résine d'affinité.

Comme pour ce qui a été observé en ITC, nous voyons que la liaison d'YL1 ZID avec le quadruple mutant de H2A (Mutant 5) permet d'obtenir des bandes d'intensité identiques à celles du contrôle positif contenant la paire d'histones variante H2A.Z. Le rétablissement de la liaison est donc bien observable avec cette technique de minitest, qui est donc adaptée à la comparaison des différents mutants.

De manière générale, nous observons que l'intensité des bandes a tendance à diminuer plus le nombre de mutations augmente. Nous observons donc bien une perte d'affinité avec les divers mutants de H2A.Z.

Ainsi, les bandes correspondant aux simples mutants, H2A.Z +G101 (Mutant 1*), et H2A.Z T82I (Mutant 2*) sont toujours bien visibles, avec toutefois une intensité plus faible par rapport aux contrôles (H2A.Z /H2B sauvage et quadruple mutant de H2A/H2B (Mutant 5)).

Concernant les doubles mutants, et notamment pour le mutant H2A.Z T82I, +G101 (Mutant 3*), la perte d'affinité semble encore plus forte. Pour le double mutant H2A.Z T82I, D97N, cette perte d'affinité est moins visible et semble identique à celle du simple mutant H2A.Z T82I (Mutant 4*). En revanche, lorsque le triple mutant H2A.Z T82I, +G101, D97N (Mutant 5*) est utilisé la perte d'affinité est stringente. Enfin, le quadruple mutant de H2A.Z (H2A.Z T82I, G92N, D97N, +G101, Mutant 6*) donne des résultats quasiment identiques au triple mutant, avec des bandes très faiblement visibles sur gel.

L'interaction avec le chaperon YL1-ZID semble donc être totalement abolie avec le triple et le quadruple mutant de H2A.Z (Mutant 5* et 6*).

Pour ANP32E1-ZID, l'analyse est plus rapide. Nous voyons que le contrôle positif (C+) correspondant à l'interaction d'ANP32E1 -ZID avec la paire d'histones variante H2A.Z permet l'observation de deux bandes sur gel SDS-PAGE. De plus, en concordance avec les résultats d'ITC, le quadruple mutant de H2A (Mutant 5) n'est pas suffisant pour rétablir la liaison avec ANP32E1-ZID, d'où l'absence de bande visible.

Tous les mutants H2A-like, même les simples (H2A.Z +G101 (Mutant 1*), et H2A.Z T82I (Mutant 2*)), semblent abolir la fixation des paires d'histones.

Ainsi, du fait que tous les mutants contiennent tous au moins une des simples mutations, H2A.Z +G101 ou H2A.Z T82I, nous pouvons dire que ces résidus de H2A.Z semblent bien impliqués et sont critiques pour la liaison avec le chaperon ANP32E1-ZID. En revanche, il est impossible de conclure sur la contribution des autres résidus mutés dans les doubles, triples et quadruples mutants, comme D97N et G92N.

Ces expériences apportent donc des informations supplémentaires concernant les résidus essentiels à l'interaction entre ce chaperon et les paires d'histones, complétant les analyses basées sur la structure d'ANP32E1-ZID. En revanche, le fait que les données d'ITC avec H2A muté ne soient pas concluantes suggère que la spécificité d'ANP32E pour H2A.Z par rapport à H2A fait intervenir d'autres déterminants qu'il reste à caractériser.

D'autre part, ANP32E possède également un autre domaine, le domaine LRR, qui pourrait participer coopérativement à cette liaison.

En concordance avec cette idée, des travaux préliminaires de mon équipe ont permis de mettre en évidence, lors de la liaison à H2A.Z/H2B, une sensibilité accrue au sel du domaine C-terminale d'ANP32E, incluant le domaine ZID (151-268), par rapport à la protéine ANP32E entière (Obri et al. 2014).

Ainsi, une concentration en NaCl de 1 M permet de perturber et d'abolir l'interaction entre H2A.Z/H2B et la partie C-terminale d'ANP32E. En revanche, cela ne semblait pas impacter la liaison avec la protéine ANP32E entière. Il est donc possible que le domaine LRR d'ANP32E joue un rôle stabilisateur dans cette interaction.

C'est pour cela que je me suis intéressée dans la suite de ces travaux au domaine LRR d'ANP32E (1-158), construction ANP32E6.

E. Etude de la partie N-terminale d'ANP32E et de son rôle potentiel dans la fonction de chaperonnage :

Bien que la partie N-terminale d'ANP32E correspondant au domaine LRR n'ait pas montré de liaison directe à H2A.Z/H2B dans mes expériences d'ITC précédentes (Figure 49). Il se peut que ce domaine ait un rôle stabilisateur pour l'interaction de la paire d'histones avec le ZID.

Par ailleurs, des études sur les autres membres de la famille ANP32, en particulier sur le LRR d'ANP32B ont montré que ce domaine se lie au tétramère H3/H4. Plus précisément, les auteurs montrent par une combinaison d'approches, notamment mutationnelles et d'ITC, que la partie concave du LRR d'ANP32B est responsable de l'interaction avec le tétramère d'histones (Tochio et al. 2010). A ce jour, il n'existe pas de données structurales de cette interaction, seules les structures des domaines LRR d'ANP32A (par cristallographie) et d'ANP32B (par RMN) sont disponibles.

1. Structure cristallographique d'ANP32E LRR

J'ai résolu la structure de la région N-terminale d'ANP32E à partir d'un jeu de données de l'équipe obtenu par cristallographie aux rayons X. Cette structure a une résolution de 1,1 Å et

est visible sur la Figure 56 – A. Les statistiques de collecte et de traitement des données pour cette structure sont présentées dans l'Annexe 3. La structure globale d'ANP32E LRR est conservée par rapport aux autres domaines LRR de la famille ANP32.

Le LRR d'ANP32E6 présente une forme de fouet avec six feuilletts bêta, formant la partie concave, et six hélices alpha dans la partie convexe.

En comparaison avec d'autres membres de la famille ANP32, le domaine LRR d'ANP32E présente des propriétés physico-chimiques spécifiques. En effet, de nombreux résidus, en rouge sur la Figure 56 - B sont divergents chez ANP32E. Ces résidus se situent principalement en surface et peuvent impacter la liaison à d'autres effecteurs. En effet, les domaines LRR sont connus pour être des plateformes d'interaction protéine-protéine, notamment au niveau de leur partie concave.

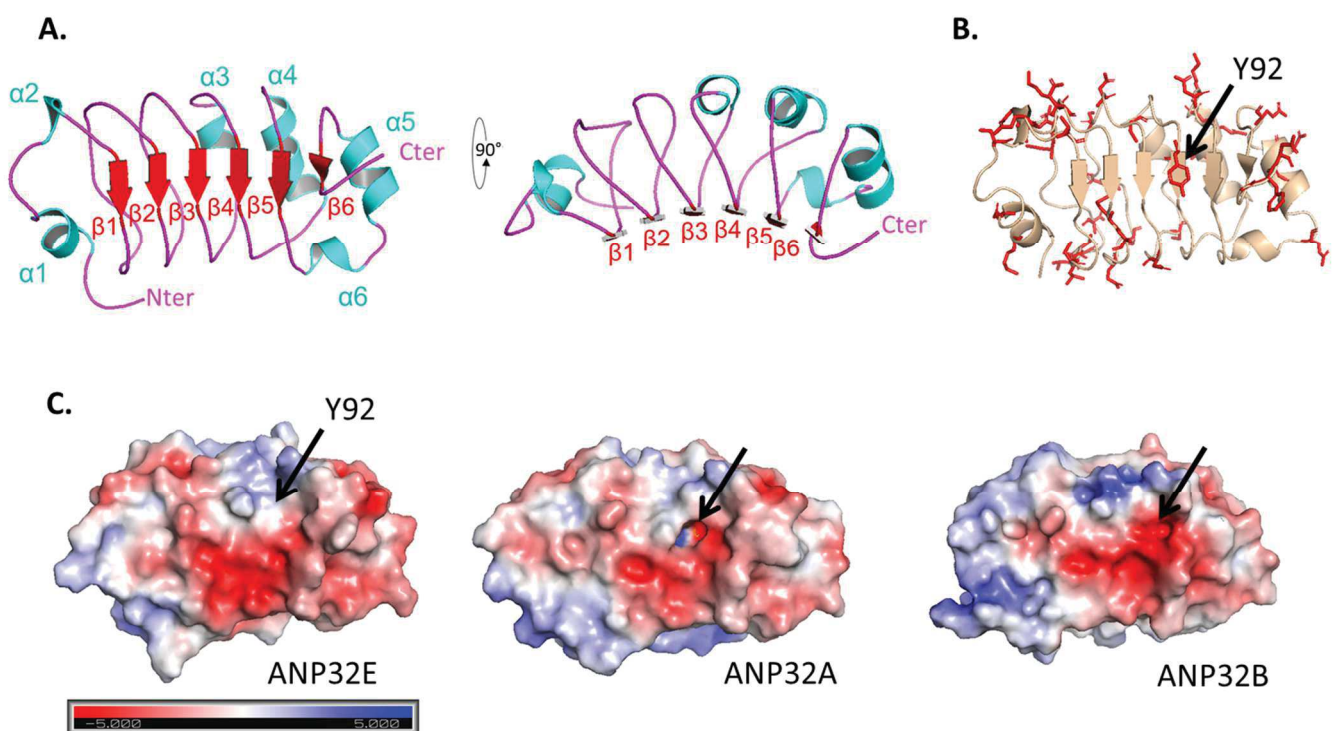


Figure 56 : Structure d'ANP32E LRR

(A) Représentation en ruban d'ANP32E LRR. Les hélices α et les brins β sont représentés respectivement en cyan et rouge.

(B) Représentation en ruban d'ANP32E LRR, les résidus en rouge correspondent aux résidus spécifiques à ANP32E non conservés chez ANP32A et ANP32B.

(C) Potentiel électrostatique des membres de la famille ANP32. Le potentiel a été calculé avec APBS et va de -5,0 (rouge) à 5,0 kT/e (bleu). L'orientation est la même que dans (B).

Mon intérêt s'est particulièrement porté sur la tyrosine 92 (Y92) d'ANP32E, se situant dans la partie concave. En effet, en comparant les potentiels de surface des différents membres de la

famille, on remarque que cette tyrosine chez ANP32E, une histidine pour ANP32A et B, permet de combler une cavité, changeant alors le potentiel électrostatique (Figure 56 - C). Cette tyrosine peut être impliquée dans la formation d'une liaison hydrogène chez ANP32E et/ou d'une interaction de Pi-stacking et sera discutée plus en détails dans la discussion.

Les LRR d'ANP32E et d'ANP32B, ayant respectivement 67% d'identité et une structure globalement conservée, nous avons ensuite voulu vérifier s'il y avait une potentielle interaction entre ANP32E LRR et H3/H4.

2. Mise en évidence biochimique du rôle d'ANP32E LRR

J'ai entrepris de tester biochimiquement l'interaction entre ANP32E LRR et H3/H4. Pour ce faire, j'ai tout d'abord utilisé une approche de co-expression en *E.coli* par minitest. Cependant, il a été difficile de conclure car la manipulation du tétramère H3/H4 est complexe et le faible volume de culture en minitest n'a pas permis de visionner clairement les bandes correspondantes à ces histones, et cela même dans les contrôles positifs.

J'ai donc décidé d'effectuer cette purification à plus grande échelle. J'ai co-exprimé xH4-His6/xH3 et GST-ANP32E6 (LRR). J'ai ensuite utilisé soit 2 L de culture initiale pour la potentielle co-purification, via l'étiquette His6 du tétramère d'histones, soit 2 L de culture initiale pour l'approche inverse en co-purifiant, via l'étiquette GST d'ANP32E6(LRR).

La protéine ANP32E LRR n'étant pas très sensible aux fortes salinités, la purification a été réalisée avec un tampon 10 mM Tris HCl pH 8 et 2M NaCl, essentiel à la stabilité du tétramère H3/H4. Les résultats de ces purifications sont présentés dans la Figure 57.

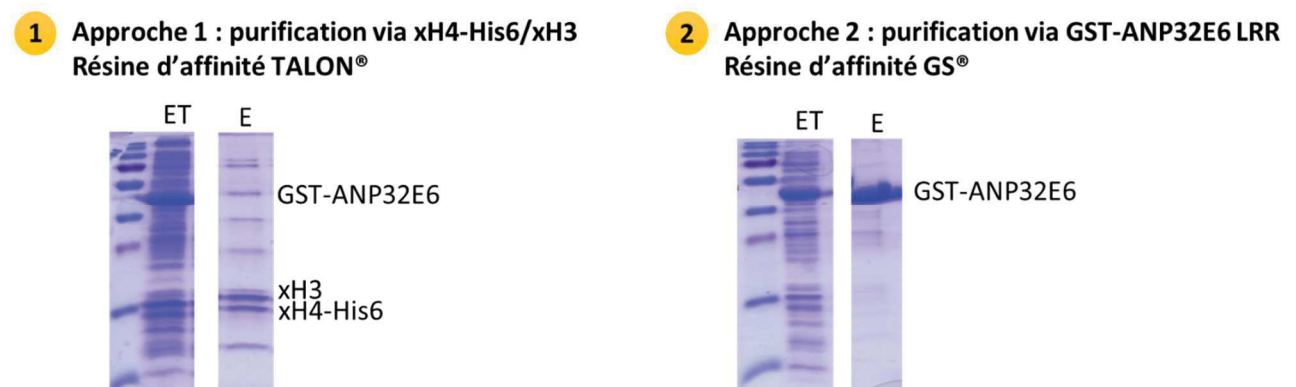


Figure 57 : Résultats des étapes d'affinités permettant de tester l'interaction entre xH4-His6/xH3 et GST-ANP32E6 (LRR)

(E) : Elution, (ET) : Extrait total

Nous voyons ainsi que pour la première approche, dans laquelle l'étiquette His6 de la paire d'histones xH3/xH4 est utilisée pour la purification, nous sommes capables de co-purifier GST-ANP32E6. Cependant, la bande correspondante à GST-ANP32E6 présente une plus faible intensité comparée aux bandes des histones xH3/xH4-His6.

De plus, nous voyons, grâce à l'extrait total, que la majorité de la protéine GST-ANP32E6 n'est pas co-purifiée avec les histones.

Cependant, GST-ANP32E6 est bien retrouvée avec xH3/xH4-His6. Il paraît donc y avoir une faible interaction entre le LRR d'ANP32E et le tétramère H3/H4.

Dans la seconde approche, où l'étiquette GST d'ANP32E6 a été utilisée, nous voyons que les histones xH3/xH4 ne semblent pas (ou peu) être co-purifiées. En effet, il est possible de voir sur gel des bandes de très faible intensité pouvant correspondre à H3/H4. Cependant, comparée à l'extrait total, cette fraction est négligeable. Il faut également prendre en compte le fait que la GST est une protéine qui adsorbe très fortement le bleu de Coomassie, ce qui explique de GST-ANP32E6 soit aussi visible.

Au vu de ces résultats, il semble difficile de conclure. Une faible interaction entre H3/H4 et ANP32E-LRR reste cependant possible.

Ainsi, afin de mieux comprendre le rôle d'ANP32E-LRR et de ses chaperons en général, il est essentiel de tester leurs effets dans un contexte nucléosomique. Je me suis donc attelée à la préparation du nucléosome.

F. Préparation du nucléosome

Afin d'obtenir une vue d'ensemble de l'interaction de tous les domaines de ces chaperons avec les histones et d'élucider les mécanismes moléculaires de déposition/éviction d'H2A.Z par YL1 et ANP32E, il est essentiel de mieux caractériser l'interaction des chaperons YL1 et ANP32E avec le nucléosome H2A.Z, mais aussi avec le nucléosome H2A, étant donné qu'YL1 interagit potentiellement avec ce dernier.

Pour reconstituer le nucléosome, j'ai utilisé deux approches :

- La reconstitution de l'octamère, puis la reconstitution du nucléosome par ajout d'ADN de positionnement.
- La purification de la paire H2A (ou H2A.Z)/H2B et de l'autre part du tétramère H3/H4, puis l'assemblage en présence de l'ADN de positionnement.

1. Préparation de l'ADN Widom 601 de 147 pb

Les deux approches nécessitent la préparation d'ADN de positionnement. J'ai utilisé la séquence Widom 601. Ce fragment de 147 pb a été purifié à partir du plasmide pGEM-3z/601, contenant 12 répétitions du fragment Widom 601. Les caractérisations biophysiques et structurales étant très exigeantes en termes de quantité et de qualité de matériel biologique nécessaire, une technique de production à grande échelle adaptée du protocole de (Dyer et al. 2003) a été réalisée. J'ai ainsi pu obtenir un ADN stock à 1800 ng/μL. J'ai également préparé un stock à 10 μM dans 10 mM Tris pH8 + 2 M NaCl, qui a été utilisé lors des assemblages à petite échelle.

L'ADN obtenu a été vérifié sur gel d'agarose et gel polyacrylamide 6% visibles dans la Figure 58.

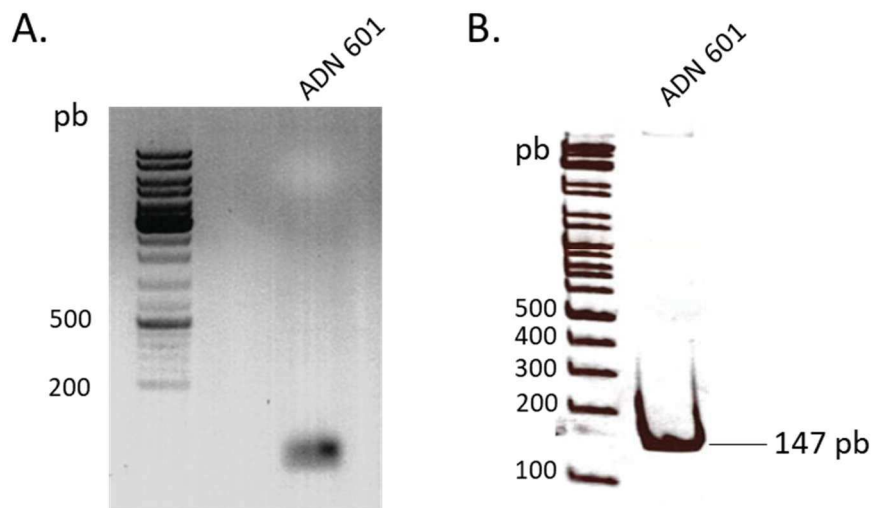


Figure 58 : ADN de positionnement 601 obtenu

(A) Gel d'agarose 2%

(B) Gel polyacrylamide 6%

2. Approche 1 : préparation de l'octamère

Ce projet a été débuté par une autre étudiante en thèse de mon équipe, Mme Marina VITORIA GOMES. Elle a travaillé sur l'obtention de l'octamère canonique. J'ai repris et étendu son travail jusqu'à aboutir à la reconstitution du nucléosome. J'ai également entrepris la reconstitution de nucléosome avec l'octamère H2A.Z.

La stratégie utilisée par Mme VITORIA GOMES était une co-expression en *E.coli* des quatre histones, deux à deux. Les histones utilisées dans ce travail sont les histones entières contenant les queues flexibles. Elle a donc co-exprimé deux vecteurs ; le premier contenant la

paire d'histones His6-xH2A/xH2B et le second contenant xH3/xH4-His6. L'expression a été réalisée en utilisant des cellules BL21(DE3), un milieu 2xLB avec une DO_{600 nm} d'induction de 0.5 et 0.7 mM d'IPTG. L'induction est réalisée sur la nuit à 25°C.

Son travail a ensuite visé à augmenter le rendement de purification. Pour ce faire, elle a ajouté une étiquette His10-TRX sur la partie amino-terminale de H4 en complément de l'étiquette His6 présente sur H2A.

La purification a tout d'abord été optimisée sur la base de deux étapes : une affinité TALON suivie d'une élution à l'imidazole, puis une gel filtration. Une étape de clivage enzymatique des étiquettes a ensuite été rajoutée en amont de la gel filtration. La lyse et la purification sont effectuées avec un tampon de base 10 mM pH 8 et 2 M NaCl.

J'ai ensuite poursuivi son travail et l'ai également implémenté sur le variant H2A.Z avec lequel elle n'avait pas encore travaillé (Figure 59 - A). J'ai ainsi pu obtenir des rendements à la fin de la première étape d'affinité d'environ 4 mg/L pour l'octamère canonique et 2.5 mg/L pour l'octamère H2A.Z variant. Cependant, la présence du tag His10-TRX s'est avérée problématique. En essayant de cliver ce dernier, nous avons obtenu un clivage partiel. De plus, il nous a été impossible de séparer l'octamère clivé du non clivé, créant un échantillon très hétérogène (Figure 59 - B). Malgré de nombreuses tentatives d'optimisation, nous n'avons pas réussi à résoudre ce problème d'hétérogénéité.

J'ai donc essayé de reconstituer le nucléosome en présence des étiquettes de purification (His10-TRX et His6) sans succès (Figure 59 - C). La procédure de reconstitution utilisée est une technique de reconstitution à petite échelle, utilisant une méthode de dilution progressive. Cette technique, recommandée par le Dr. Elisa BERGAMIN, chef d'équipe à l'IGBMC, a été adaptée de la procédure NEB (<https://international.neb.com/protocols/2012/06/02/dilution-assembly-protocol-e5350>) et est décrite dans l'Annexe 4.

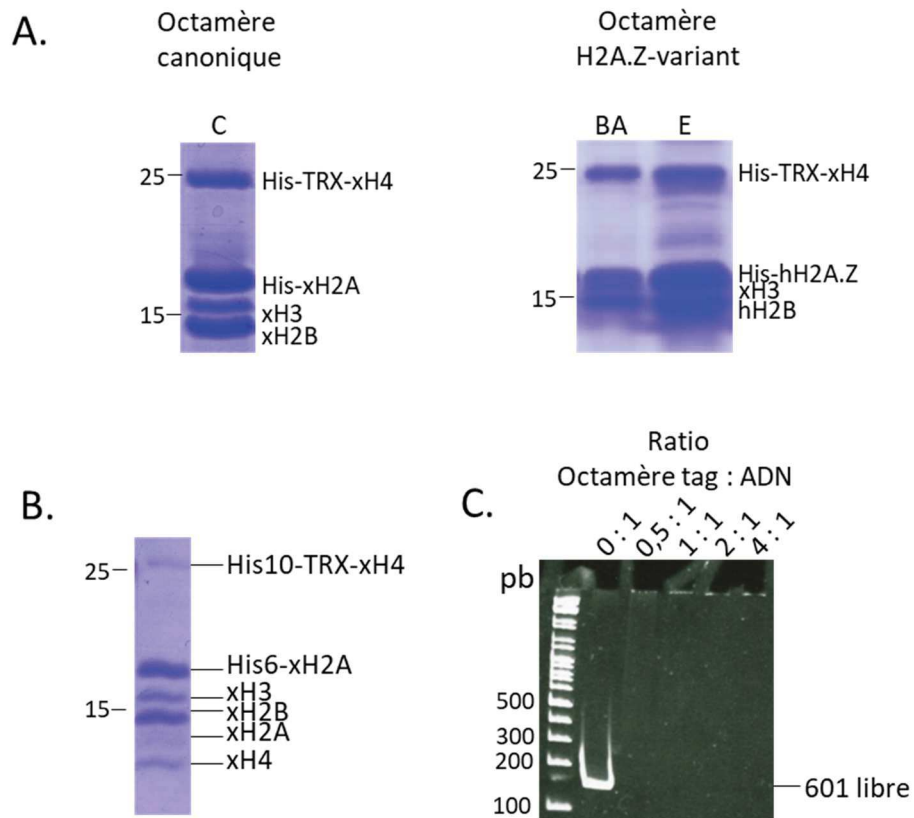


Figure 59 : Reconstitution des octamères canonique et H2A.Z variant par co-expression chez *E.coli*

A. Reconstitution des octamères (C) : échantillon purifié par affinité et concentré après l'étape de gel filtration, (BA) : Billes TALON après affinité, (E) : Elution de l'étape d'affinité. Pour l'octamère H2A.Z, l'étape de gel filtration n'est pas représentée car la coupure des étiquettes a été effectuée au préalable. Gel SDS-PAGE 17,5%.

B. Exemple montrant l'hétérogénéité de l'échantillon pour l'octamère canonique après coupure 3C. Gel SDS-PAGE 17,5%.

C. Essai de reconstitution du nucléosome canonique en gardant les étiquettes His10-TRX sur xH4 et His6 sur xH2A. Gel de retardation (polyacrylamide 6%) coloré au bromure d'éthidium.

3. Approche 2 : Purification de la paire d'histones et du tétramère séparément

J'ai décidé d'employer une autre stratégie, en purifiant d'une part la paire d'histones H2A/H2B et d'autre part le tétramère H3/H4. Je les ai ensuite assemblés avec de l'ADN 601 pour former le nucléosome, sans préparer au préalable l'octamère.

Afin de résoudre la problématique de clivage des étiquettes, j'ai décidé de garder ces dernières lors de l'assemblage. J'ai donc remplacé l'étiquette His10-TRX présente sur xH4 par une étiquette His6 plus petite.

J'ai ainsi produit et purifié les complexes suivants :

-His6-xH2A/xH2B

-His6-hH2A/hH2B

-His6-hH2A.Z/hH2B

-His6-xH4/xH3

La production des paires d'histones H2A/H2B ou H2A.Z/H2B, *Xénopus* ou Humaine, a été réalisée en milieu 2xLB. L'induction a été réalisée à une $DO_{600\text{ nm}} = 0,7$ avec 0,7 mM d'IPTG et continuée sur la nuit à 25°C. La purification a ensuite été réalisée en utilisant un tampon 10 mM Tris pH 8 contenant 1 M NaCl.

Pour le tétramère H3/H4, la production a été réalisée en utilisant un milieu TB. L'induction a été réalisée à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,6 en utilisant 0,2 mM d'IPTG et a été continué 2 h à 37°C. La purification du tétramère a été réalisée dans un tampon 10 mM Tris pH 8 + 2 M NaCl.

Ces purifications ont été réalisées en deux étapes, une étape d'affinité TALON et une gel filtration. Les gels SDS-PAGE présentés dans la Figure 60 - 1 correspondent aux histones après ces deux étapes de purification.

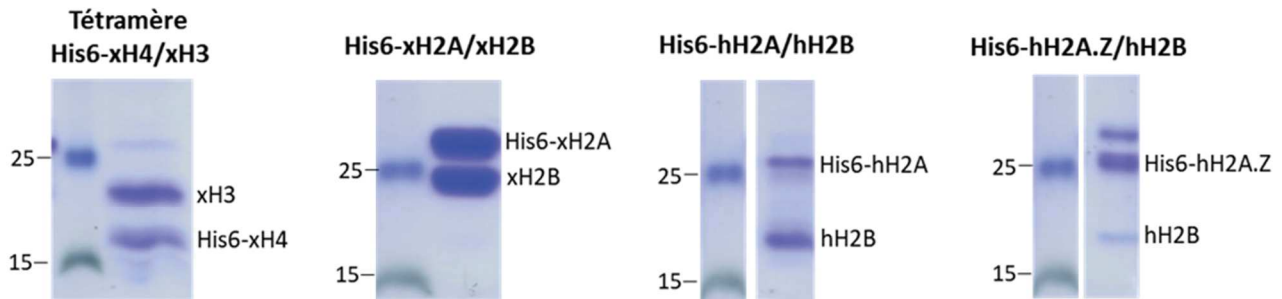
J'ai ensuite utilisé la même technique de reconstitution à petite échelle par dilution progressive. Il est à noter que cette procédure est normalement une procédure à petite échelle permettant par la suite de passer à un plus grand volume. Cependant, du fait des faibles quantités obtenues, je n'ai pas pu passer à grande échelle.

Les gels de retardations vérifiant la formation des différents nucléosomes à petite échelle sont présentés dans la Figure 60 - 2. Différents ratios ont été testés entre les constituants de l'octamère et l'ADN. La quantité d'ADN utilisée dans ces tests est constante (25 pmol) et des quantités croissantes de dimère et de tétramère d'histones ont été ajoutées (les paires d'histones sont doublement concentrées par rapport au tétramère et à l'ADN). Les gels de retardations présentés permettent également de mettre en évidence les ratios sélectionnés, c'est-à-dire le ratio à partir duquel il ne semble plus y avoir d'ADN libre et pour lesquels la quantité de nucléosome maximale de 25 pmol est obtenue.

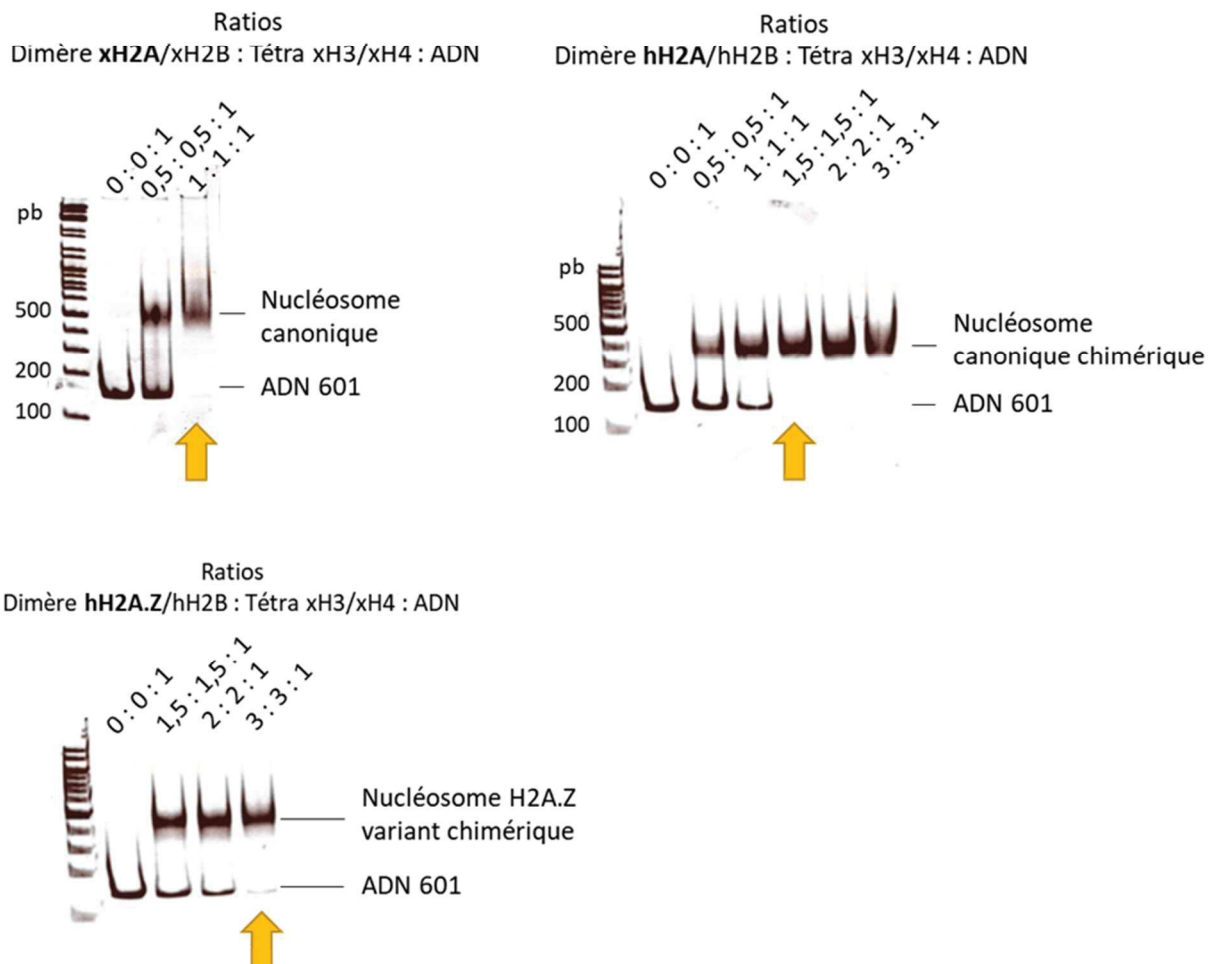
Les échantillons de nucléosome, aux ratios sélectionnés, ont ensuite été vérifiés par microscopie électronique, en utilisant la méthode de coloration négative, afin de vérifier leur qualité. Les images de microscopie électronique (Figure 60 - 3) mettent en évidence des sphères d'environ 11 à 13 nm de diamètre, correspondant respectivement au nucléosome sur la tranche et au nucléosome vu de face. Il est également possible de voir quelques agrégats. De plus, la qualité des nucléosomes obtenus semble variable. Le meilleur échantillon de nucléosome correspond au nucléosome canonique de *Xénopus*, le moins bon au nucléosome H2A.Z. Cela s'explique par le fait que ce dernier est moins stable *in vitro*. On remarque d'ailleurs la présence d'ADN libre dans l'échantillon formant un bruit de fond sur l'ensemble de l'image. Cette observation concorde avec le gel de retardation. La quantité de nucléosome

H2A.Z est donc très certainement sur-estimée. La reconstitution de ce nucléosome devra être réalisée et optimisée à nouveau.

1 Gel SDS-PAGE 17,5%



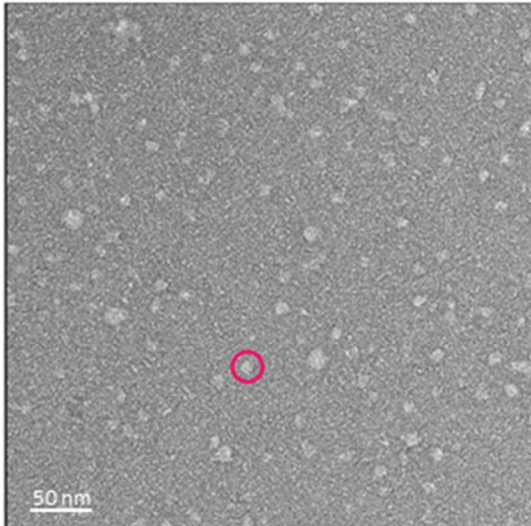
2 Vérification de la reconstitution des nucléosomes et choix des ratios par expérience de retardation sur gel



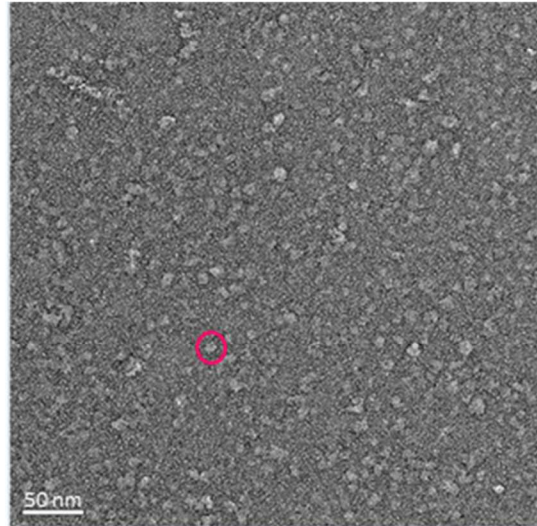
Légende et suite de la figure sur la page suivante

3 Vérification des nucléosomes par microscopie électronique (coloration négative)

Nucléosome canonique
Xenopus laevis



Nucléosome canonique
chimérique *Homo sapiens* -
Xenopus laevis



Nucléosome variant H2A.Z
chimérique *Homo sapiens* -
Xenopus laevis

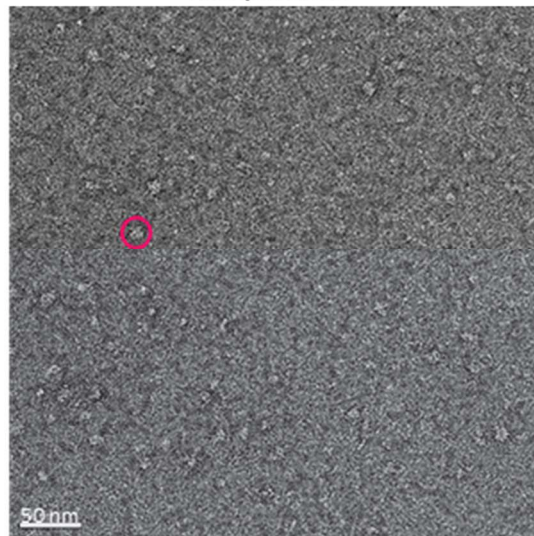


Figure 60 : Reconstitution des nucléosomes

1. Gels SDS-PAGE 17,5% finaux des purifications des paires d'histones xH2A/xH2B, hH2A/hH2B, hH2A.Z/hH2B et du tétramère xH3/xH4.
2. Expériences de retardation sur gel pour les trois types de nucléosomes reconstitués. La flèche orange met en évidence les ratios sélectionnés.
3. Image de microscopie électronique par coloration négative pour les trois différents types de nucléosomes. Les ronds roses mettent en avant un exemple de nucléosome.

G. Etude comparative d'ANP32E et YL1 en condition nucléosomique

J'ai ensuite cherché à développer une méthode robuste permettant la comparaison des différents chaperons et de leurs différents domaines en condition nucléosomique.

Compte tenu des faibles quantités de nucléosomes obtenues après reconstitution et de celle du chaperon ANP32E FL, l'ITC n'était pas une technique adaptée pour la mesure des affinités entre le nucléosome et les chaperons. Nous avons donc opté pour la Résonance Plasmonique de Surface (SPR), nécessitant des quantités moindres pour chaque partenaire. J'ai ainsi injecté une protéine concentrée au maximum à 100 nM afin d'avoir 20 à 50 unités de résonance (RU) fixée sur la puce. Pour l'analyte j'ai utilisé une gamme allant de 0 à 50 nM.

1. Mesure d'affinités des interactions par résonance des plasmons de surface (SPR)

Les interactions chaperons-histones que j'ai envisagées de caractériser sont présentées dans le **Tableau 13**. Afin de mettre en place l'expérience, j'ai commencé par caractériser les contrôles positifs et négatifs, à savoir ANP32E ZID et YL1 ZID avec les paires d'histones H2A.Z/H2B et H2A/H2B respectivement.

Tableau 13 : Plan de la manipulation pour les approches SPR

Chaperons	Histones
YL1-ZiD	H2A.Z/H2B
ANP32E1-ZID	H2A/H2B
ANP32E6-LRR	H3/H4
ANP32E entier	Octamère H2A.Z/H2B
	Octamère H2A/H2B
	Nucléosome H2A.Z
	Nucléosome canonique

Les mesures SPR ont été effectuées sur un instrument Biacore T200 (GE Healthcare - Biacore), en utilisant une puce de type CM5. Cette puce est composée d'une surface d'or, sur laquelle est fixée une matrice de dextran.

Le ligand est immobilisé covalamment sur la surface, via les groupements carboxyles présents sur le dextran. La pré-concentration permet de réaliser une immobilisation efficace grâce à une importante concentration du ligand à la surface de la puce. Cette procédure est réalisée, en utilisant un tampon de faible force ionique et dont le pH est inférieur au pI du ligand

d'environ 0,5 unité. Idéalement, le pH du tampon est compris entre 4 et 6. Compte tenu du pKa du dextran, il est difficile d'immobiliser un partenaire si le pH du tampon utilisé est inférieur ou égal à 3,5.

a. Approche 1

Dans un premier temps, nous avons tenté d'immobiliser les chaperons YL1-ZID, ANP32E1, ANP32E6 et ANP32E entier. Cependant, leur pI (respectivement 4,3, 4,39, 4,1 et 3,98) ne nous ont pas permis de réaliser une immobilisation efficace et stable.

b. Approche 2

Une alternative à l'immobilisation covalente sur puce CM5 est la capture de l'étiquette de purification du ligand par un anticorps spécifique. Nous avons donc immobilisé coalement des anticorps anti-GST sur la surface de la puce. Après capture de GST-ANP32E1 et de GST-YL1 – ZiD, nous avons injecté les paires d'histones H2A.Z/H2B et H2A/H2B, qui servent respectivement de contrôle positif et négatif. Nous avons alors pu observer un signal engendré par l'interaction aspécifique des paires d'histones sur la surface de la puce et cela malgré la présence de détergent (P20 0,01%) et d'une haute concentration en sel (400 mM NaCl). Nous avons donc essayé d'augmenter la concentration de NaCl dans le tampon de course à 1 M, ce qui a provoqué la perte du ligand capturé par l'anticorps anti – GST.

c. Approche 3

Nous avons alors choisi d'inverser le système, en procédant à l'immobilisation covalente des paires d'histones H2A.Z/H2B et H2A/H2B et du nucléosome. Nous avons obtenu un taux d'immobilisation satisfaisant pour les paires d'histones, toutefois pour le nucléosome, sa dissociation était observée après sa fixation sur la puce.

Cette méthode bien que prometteuse nécessite encore de nombreuses optimisations, afin de pouvoir effectuer les mesures d'interactions désirées, qui seront discutées dans la dernière session « discussion ».

2. Essai de retardation sur gel

En parallèle de cette méthode quantitative SPR, j'ai également testé la fixation au nucléosome de manière qualitative par une méthode de retardation sur gel polyacrylamide.

J'ai tout d'abord voulu tester l'interaction entre le nucléosome-H2A.Z et le domaine ZID du chaperon ANP32E. Le but de l'expérience est de voir si le domaine ZID d'ANP32E1 (204-268), qui lie la paire d'histones H2A.Z/H2B dans un contexte non nucléosomal (au niveau de région enfouis dans le nucléosome), est également capable de se lier au nucléosome H2A.Z.

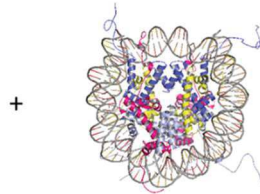
J'ai réalisé une expérience de retardation sur gel en mélangeant la protéine purifiée ANP32E1-ZID et le nucléosome telle que décrite dans la Figure 61.

1 Set up expérimental

**Protéine purifiée
ANP32E1 – ZID (204-268)**



Nucléosome H2A.Z variant



2 Expérience de retardation sur gel

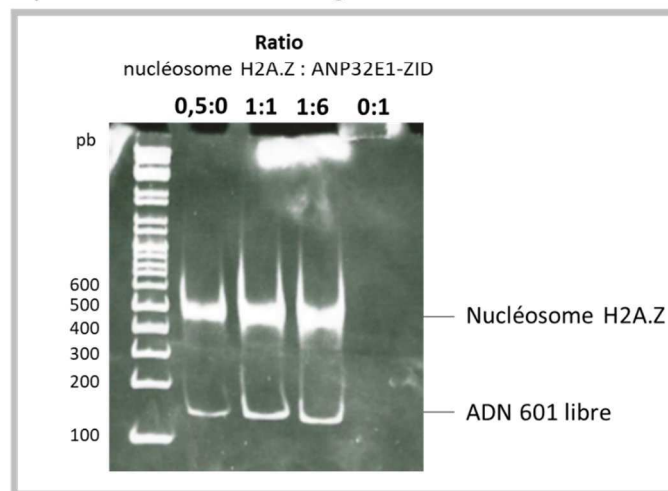


Figure 61 : Expérience de retardation sur gel testant la liaison d'ANP32E1-ZID au nucléosome H2A.Z humain

Gel polyacrylamide 6% coloré au bromure d'éthidium

La quantité de nucléosome utilisée pour chaque test est de 3 pmol soit 0,4µg, excepté pour le contrôle ne contenant que du nucléosome (ligne 1) où cette dernière est divisée par 2.

Nous voyons sur le gel de retardation qu'il ne semble pas y avoir de fixation directe entre le ZID d'ANP32E et le nucléosome et cela quel que soit le ratio testé. Ainsi ANP3E1-ZID n'est pas capable de se lier directement au nucléosome H2A.Z.

Il est donc nécessaire d'avoir au préalable un nucléosome déstabilisé pour que le domaine ZID d'ANP32E puisse permettre l'éviction de la paire d'histones H2A.Z variante.

Il serait alors intéressant de tester la fixation du domaine LRR d'ANP32E au nucléosome H2A.Z variant.

III. Discussion

A. Comparaison de l'interaction de YL1 ZID et ANP32E1 ZID avec la paire d'histones H2A.Z/H2B

Mes premiers résultats d'ITC ont permis de mettre en évidence un double événement de liaison pour la liaison d'His10-TRX-ANP32E ZID aux paires d'histones H2A.Z/H2B avec un premier K_{D1} très affin < 1 nM et un second K_{D2} toujours très affin d'environ 20 nM. Cependant, les stœchiométries observées pour ces deux événements sont respectivement comprises entre 0,41 et entre 1,85, signifiant qu'il ne semble pas y avoir une interaction 1:1 mais que les événements observés sont complexes. Nous touchons ici les limites de l'ITC qui ne permet pas de déconvoluer facilement plusieurs événements.

Les expériences d'AUC menées par la suite ont montré qu'His10-TRX-ANP32E1 ZID forme un dimère. Cette conformation, non détectée dans les analyses biochimiques précédentes, n'est peut-être pas biologique, n'étant pas décrite dans la littérature. Elle pourrait donc être potentiellement liée à la haute concentration en solution (90 μ M soit 2.5 mg/mL en ITC).

Une autre hypothèse est une éventuelle implication de l'étiquette TRX, bien qu'il n'y ait aucune trace de dimérisation liée à cette étiquette dans la littérature.

Afin de s'assurer de la non-implication de l'étiquette His10-TRX dans la dimérisation, nous avons testé une construction d'ANP32E1 ZID en fusion avec l'étiquette His10-SUMO. La titration par ITC de l'interaction His10-SUMO-ANP32E1-ZID avec H2A.Z/H2B Δ Nter tails ne montre qu'un seul événement avec un K_D de 18 nM et avec une stœchiométrie de 0.5.

Ce K_D de 18 nM correspond à la constante de dissociation à l'équilibre du deuxième événement de liaison obtenu avec la construction His10-TRX-ANP32E1 ZID en ITC, corroborant également les résultats d'AUC-SE pour lesquels nous obtenons un K_D de 30 nM.

Ainsi, la présence d'un événement de liaison unique avec un K_D similaire à l'interaction entre ANP32E et la paire d'histones variante, nous montre indirectement qu'ANP32E ne semble pas dimériser lorsqu'il est purifié avec une étiquette His10-SUMO. Cela nous conforte dans le fait que cette dimérisation n'est pas biologique et est induite par la présence de l'étiquette His10-TRX.

Mes différents travaux me permettent également de comparer l'interaction des deux chaperons (YL1-ZID et ANP32E-ZID) avec la paire d'histones variante H2A.Z/H2B.

Les résultats biophysiques nous montrent, qu'YL1-ZID semble 10 fois plus affin qu'ANP32E-ZID pour la paire d'histones variante, avec des constantes de dissociation à l'équilibre, allant

de 2.3 à 4.4 nM pour YL1-ZID et de 18 à 30 nM pour ANP32E1-ZID. Il est à noter que seule la stœchiométrie d'YL1 est de 1.

Les données d'ITC me permettent également de caractériser l'interaction entre les chaperons-ZID et H2A.Z/H2B d'un point de vue thermodynamique. Seules les courbes présentant un seul événement peuvent être utilisées (deux événements ne permettant pas de calculer le ΔG et $-T\Delta S$). C'est pour cela que je compare les paramètres thermodynamiques de l'interaction His10-SUMO-ANP32E1 ZID (204- 268) – H2A.Z/H2B par rapport à l'interaction His6-YL1 ZID (1- 69) – H2A.Z/H2B (Figure 62).

D'après les résultats obtenus, le mode d'interaction semble être identique, puisque la liaison est portée par l'enthalpie (*enthalpy driven*) avec ΔH inférieur à $-T\Delta S$. Pour YL1 ZID, le ΔH de la liaison est inférieur à celui de l'interaction ANP32E1-ZID – H2A.Z/H2B, concordant avec la présence d'une plus large zone d'interaction visible dans la structure.

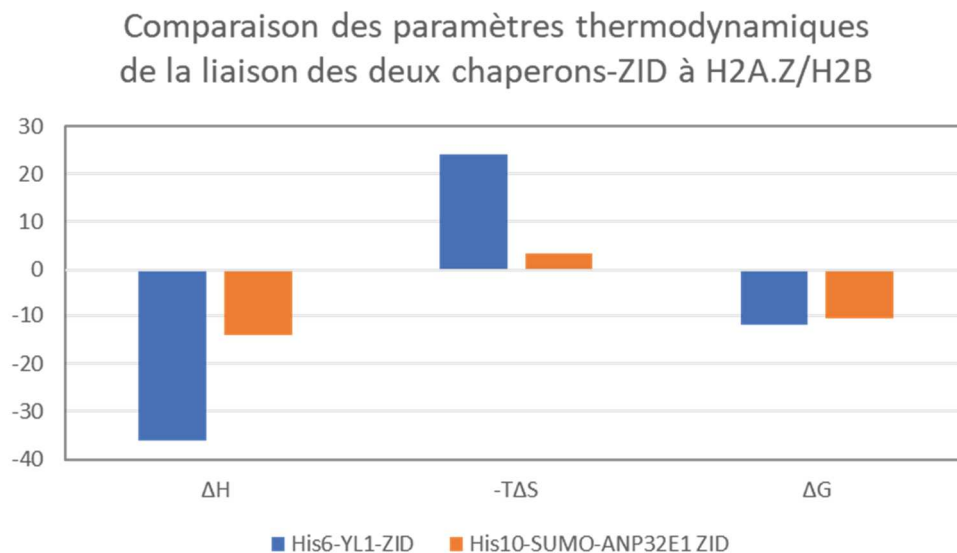


Figure 62 : Comparaison des profils thermodynamiques des liaisons His6-YL1-ZID – H2A.Z/H2B et His10-SUMO-YL1-ZID – H2A.Z/H2B. Les différents paramètres sont exprimés en kcal/mol.

Ces résultats sont donc en adéquation avec les données structurales, obtenues dans l'équipe avant mon arrivée, dans lesquelles YL1 présente une région supplémentaire interagissant avec la paire d'histones variante (Obri et al. 2014) (Latrick et al. 2016).

Ces caractéristiques sont potentiellement liées aux fonctions biologiques opposées de ces deux chaperons, même si ces deux interactions restent très affines.

Notamment, la déposition de H2A.Z/H2B par YL1 requiert de s'assurer que la paire d'histones variante est bien celle liée au chaperon et que celle-ci est déposée au sein d'un nucléosome. Les nombreux déterminants de reconnaissance de H2A.Z/H2B par YL1 ainsi que la forte affinité d'interaction permettent de s'assurer de ces prérequis, avec pour désavantage potentiel de réduire la vitesse d'exécution.

Dans le cas d'ANP32E, la reconnaissance de H2A.Z au cœur du nucléosome fait potentiellement appel à un nombre moindre de déterminants, au prix d'une moins grande affinité (qui reste tout de même de l'ordre du nanomolaire), avec éventuellement un risque d'enlever la mauvaise histone. Cette dernière problématique étant cependant réduite par le fait que les changements structuraux induits par ANP32E ne soient stabilisés que dans le cas de H2A.Z.

De manière plus générale, si nous comparons à présent mes résultats à ceux de la littérature. Nous remarquons que la sous-unité Swr1 du complexe SWR1 de levure, qui a un rôle similaire à YL1 humain (bien que ce ne soit pas son homologue) et permet donc le dépôt de la paire d'histones variante, interagit également avec H2A.Z/H2B de manière très affin avec une constante de dissociation à l'équilibre de cette interaction de l'ordre du nanomolaire. Ainsi, Swr1-Z (équivalent au domaine ZID chez Swr1) interagit avec scH2B-H2A.Z avec un $K_D \sim 7$ nM. Ce K_D est donc du même ordre de grandeur que celui observé pour la liaison YL1-ZID à H2A.Z/H2B qui est de 2.3 à 4.4 nM.

Il existe cependant une différence entre les chaperons Swr1 et YL1, car Swr1-Z semble également capable de lier la paire d'histones canonique avec un K_D d'environ 151 nM, alors qu'YL1 n'en est pas capable et est strictement spécifique à H2A.Z.

De plus, chez la levure, il n'existe pas à ce jour de chaperon spécifique connu responsable de l'éviction et pouvant être comparé à ANP32E humain. Cela qui est d'autant plus énigmatique au vu des similitudes structurales retrouvées entre Swr1 et ANP32E.

Ces différences homme vs levure soulignent la nécessité de caractériser le modèle humain afin de comprendre les mécanismes d'action de ces chaperons dans la biologie de H2A.Z.

B. Comparaison de l'interaction de YL1 ZID et ANP32E1 ZID avec des mutants de la paire d'histones variante et canonique

J'ai ensuite continué à caractériser les différences entre ces deux chaperons humains de H2A.Z en utilisant une approche mutationnelle. Nous avons observé qu'en utilisant un quadruple

mutant de H2A, donc *H2A.Z-like*, l'affinité de l'interaction avec YL1-ZID est rétablie avec un K_D de 5,6 nM pour le mutant contre 4,4 nM pour H2A.Z. Cependant, ANP32E1-ZID n'interagit pas avec ce mutant.

Deux hypothèses peuvent alors expliquer ce résultat :

- Les résidus testés ne sont pas impliqués dans la liaison avec ANP32E1-ZID. Cependant, cela est fortement improbable au vu de la structure notamment pour les mutants 1 (H2A Δ G98) et 2 (H2A I79T). Il est intéressant de noter que les mutations 3 (H2A N89G) et 4 (H2A N94D), impliquées dans la liaison avec YL1 ZID, sont assez éloignées du site d'interaction avec ANP32E4-ZID, d'après la structure décrite précédemment (Obri et al. 2014). Ces résidus pourraient tout de même être impliqués dans la liaison car la construction d'ANP32E1-ZID que j'ai utilisée pour ces expériences est plus grande que celle présentée dans la structure.
- Les résidus, ou une partie des résidus, sont bien impliqués dans la liaison. Cependant, **ces résidus ne sont pas suffisants au rétablissement de la liaison**. Pour vérifier cela, j'ai effectué une approche inverse en partant de H2A.Z et en le mutant progressivement en H2A.

Nous avons alors tenté d'abolir progressivement l'interaction en mutant 1 à 4 résidus de H2A.Z pour obtenir un profil d'interaction *H2A-like*. J'ai ainsi réalisé les mutations H2A.Z +G101 (Mutant 1*), H2A.Z T82I (Mutant 2*), H2A.Z T82I, +G101 (Mutant 3*), H2A.Z T82I, D97N (Mutant 4*), H2A.Z T82I, +G101, D97N (Mutant 5*) et H2A.Z (H2A.Z T82I, G92N, D97N, +G101, Mutant 6*).

Nous avons constaté que tous les mutants de H2A.Z, même les simples (H2A.Z +G101 (Mutant 1*), et H2A.Z T82I (Mutant 2*)), semblent abolir l'interaction avec la paire d'histones *H2A-like*/H2B.

Ainsi, du fait que l'ensemble des mutants contiennent tous au moins une des simples mutations, H2A.Z +G101 ou H2A.Z T82I, nous pouvons conclure que les mutations simples de H2A.Z T82I et +G101 sont suffisantes à abolir la liaison d'ANP32E-ZID. Le résidu T82 et l'absence de G entre les résidus 100 et 101 de H2A.Z sont donc indispensables à la liaison du chaperon ANP32E1 ZID, en accord avec les données structurales.

En revanche, il est impossible de conclure sur la contribution des autres résidus mutés dans les doubles, triples et quadruples mutants, comme D97N et G92N.

Il serait intéressant d'effectuer et de tester les simples mutants des résidus G92N et D97N afin de voir si ces résidus sont également cruciaux pour l'interaction d'ANP32E-ZID avec H2A.Z/H2B.

De plus, le fait que le quadruple mutant de H2A vers *H2A.Z-like* ne permette pas le rétablissement de l'interaction signifie qu'il y a certainement d'autres résidus impliqués dans l'interaction avec ANP32E1 ZID et qui ne sont pas indispensables pour l'interaction avec YL1 ZID.

Ces résidus sont très certainement spécifiques de H2A.Z, sinon le quadruple mutant de H2A aurait du permettre de rétablir la liaison.

Etonnamment, d'un point de vue structural, seul un résidu semble ne pas être conservé entre H2A et H2A.Z au sein de ce domaine d'interaction entre ANP32E4-ZID + H2A/H2B. En effet, le résidu I100 de H2A.Z impliqué dans la formation du patch hydrophobe avec ANP32E est une leucine (L97) chez H2A. Cette mutation pourrait être envisagée bien que ces deux acides aminés aient des propriétés physico-chimiques similaires.

De plus, les données structurales ont été obtenues à partir de ANP32E4 correspondant au ZID minimal (215-240). Durant les expériences réalisées tout au long de cette thèse, nous avons utilisé une construction plus longue : ANP32E1 ZID (204-268) contenant une seconde région conservée en C-terminal. Ainsi, des résidus de H2A.Z pourraient interagir avec la région C-terminale de ANP32E1 ZID, mais également avec la région en N-terminal, qui ne sont pas présentes dans la structure résolue par mon équipe (Obri et al. 2014).

Il serait également intéressant de muter d'autres résidus, tels que le résidu Q22 de H2A.Z en S équivalent de H2A, qui pourraient potentiellement se lier, par formation d'une liaison H, à la région conservée située en C-terminal. Il est actuellement difficile d'expliquer de manière moléculaire une telle différence entre les chaperons puisqu'aucune structure des chaperons entiers en complexe avec la paire d'histones n'est disponible. Il est également possible que les différences de constante de dissociation et de leurs comportements vis-à-vis des mutants soient liées à leurs rôles biologiques opposés.

Cette analyse mutationnelle confirme et apporte donc des informations supplémentaires concernant les résidus essentiels à l'interaction entre ANP32E1-ZID et les paires d'histones variante, complétant les analyses structurales.

Par ailleurs, YL1 et ANP32E contiennent d'autres domaines qui pourraient participer, en coopération avec le domaine ZID, à la reconnaissance de la paire d'histones variante H2A.Z/H2B. Compte tenu de la très faible expression et solubilité des différents domaines de YL1 lorsqu'ils sont produits en *E. coli*, nous nous sommes intéressés à l'autre domaine de ANP32E : le domaine LRR.

Il serait également intéressant de travailler sur les chaperons entiers. Il faudrait alors envisager un autre système d'expression permettant l'expression des protéines entières. Le système baculovirus/cellule d'insecte pourrait par exemple être envisagé.

L'objectif à plus long terme serait d'obtenir les structures des protéines entières en complexe avec la paire d'histones variante. Cet objectif est complexe car ces deux chaperons (sauf exception pour le domaine LRR d'ANP32E) paraissent intrinsèquement désordonnés (Figure 63). Il est probable qu'il y ait un repliement par le biais de l'interaction avec les histones partenaires ou avec les sous-unités de SRCAP et de p400/TIP60. Toutefois, dans les structures du domaine ZID lié à H2A.Z/H2B, une grande partie de ces chaperons reste désordonnée.

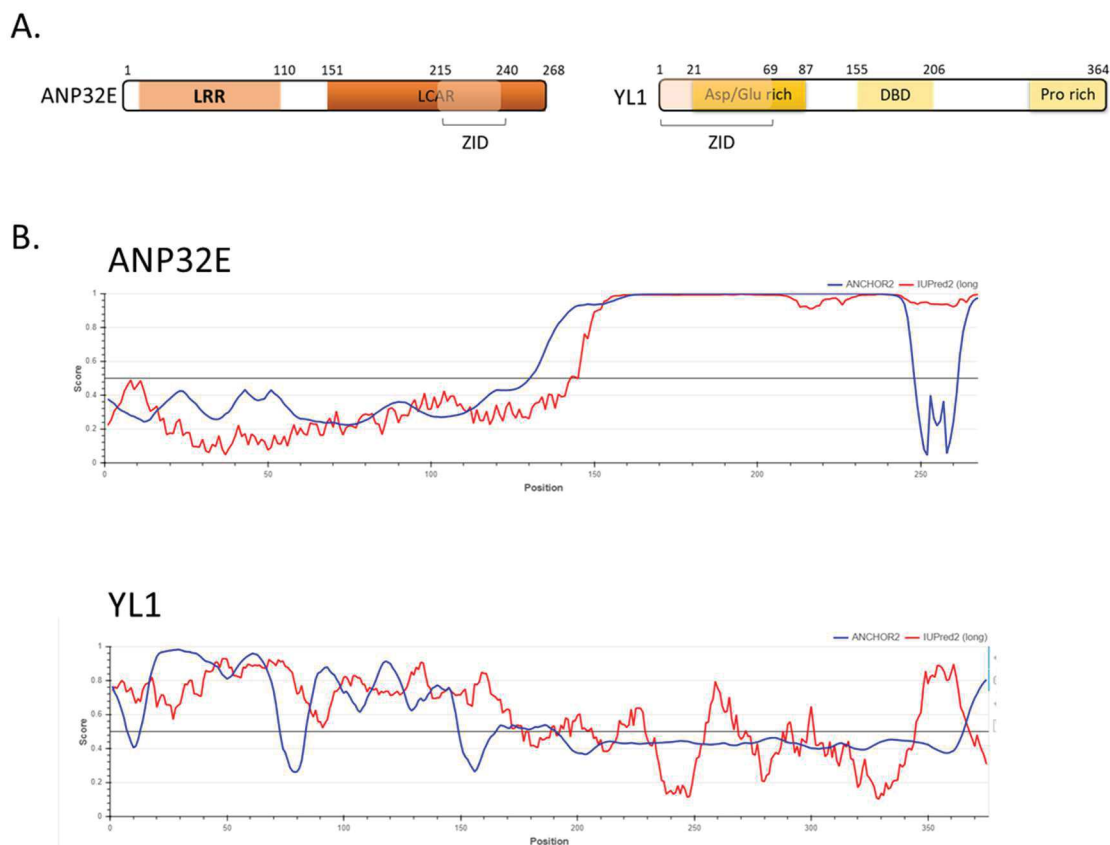


Figure 63 : Prédiction des régions intrinsèquement désordonnées des chaperons ANP32E et YL1

A. Rappel de la composition des deux chaperons

B. Prédiction des régions intrinsèquement désordonnées effectuée en utilisant l'interface en ligne d'IUPred (iupred2a.elte.hu). En ordonnée sur le graphique, un score prédisant le désordre. Au-dessus de la ligne, on considère la région comme intrinsèquement désordonnée, en dessous comme ordonnée.

C. Structure ANP32E LRR – Un potentiel rôle du domaine LRR dans la fonction de chaperonnage

1. Structure du domaine LRR

Dans notre objectif d'étudier les domaines complémentaires de ces chaperons, nous avons obtenu la structure du domaine LRR d'ANP32E à une résolution de 1,1 Å. Nous avons alors pu comparer notre structure à celles du domaine LRR d'ANP32A et d'ANP32B. Nous avons constaté que les résidus non conservés sont présents à la surface du domaine et qu'ils pourraient être impliqués dans la modulation de l'interaction avec les paires d'histones et d'autres partenaires.

Parmi ces résidus, la tyrosine 92 semble particulièrement intéressante puisqu'elle se situe dans la partie concave du domaine et change localement le potentiel électrostatique d'une poche d'interaction globalement chargée négativement. Les domaines LRR sont notamment connus pour interagir avec leurs partenaires via cette zone. Pour ANP32B, c'est cette partie concave qui interagit avec la paire d'histones H3/H4 (Tochio et al. 2010).

C'est pourquoi, nous avons effectué des tests d'interaction d'ANP32E LRR avec H3/H4 par des méthodes biochimiques de co-expression et co-purification en *E.coli*. D'après les résultats obtenus, une interaction faible semble probable. Il serait donc intéressant de valider ce résultat en utilisant une approche biophysique telle que l'ITC.

Pour ANP32B, des expériences combinant RMN et approches mutationnelles ont démontré que certains résidus chargés négativement et présents au sein de cette zone concave (D25, E45, E70, E73, D119) sont essentiels à la liaison des histones H3/H4. Il a également été démontré qu'il existe un réseau d'interactions hydrophobes au niveau de la partie concave impliqué dans l'interaction avec H3/H4, grâce aux résidus V23, F46, I50, **H92**, F121. La mutation non conservative de ces résidus hydrophobes abolit l'interaction avec les histones H3/H4 (Tochio et al. 2010).

Parmi ces résidus d'ANP32B impliqués dans la liaison à H3/H4, le résidu 92 est le seul résidu n'ayant pas des propriétés physico-chimiques conservées entre ANP32E (Y92) et ANP32B (H92).

Il serait donc intéressant de muter ce résidu et de créer le mutant Y92H d'ANP32E, afin d'étudier l'impact de cette mutation sur la liaison à H3/H4.

Les LRR d'ANP32E et d'ANP32B ont 67% d'identité, en suivant ce même raisonnement, d'autres mutants d'ANP32E pourraient être réalisés, en mutant cette fois des zones plus vastes, comme une boucle entière, notamment les boucles 3 (résidus 27 à 31 sur la Figure 40)

et 8 (résidus 108 à 114 sur la Figure 40) de la partie convexe du LRR, qui divergent particulièrement par rapport aux autres membres de la famille ANP32.

L'impact de ces mutants pourrait alors être évalué par méthodes biochimiques et biophysiques, dans un contexte nucléosomal ou avec d'autres effecteurs, tels que MRGBP, un composant de p400/TIP60, qui a précédemment été montré comme interagissant avec le LRR d'ANP32E (Obri et al. 2014) et dont les mécanismes d'actions sont inconnus.

J'ai ainsi pu montrer que ce domaine LRR, en plus de son rôle d'interaction dans le complexe de remodelage de la chromatine p400/TIP60 et de son potentiel rôle stabilisateur dans l'interaction entre ANP32E-ZID et H2A.Z/H2B, pourrait également avoir un rôle dans l'interaction et le chaperonnage de H3/H4.

Si les caractérisations biophysiques révèlent une interaction avérée entre ANP32E LRR et H3/H4, l'obtention d'une structure cristallographique du domaine LRR d'ANP32E en complexe avec H3/H4 permettrait de compléter l'étude.

De manière plus générale, il serait également intéressant de résoudre la structure du domaine LRR d'ANP32B avec H3/H4, cette interaction avérée a un K_D de 13 μ M (Tochio et al. 2010).

2. Simulation moléculaire

Etant donné qu'il n'existe pas de structure, j'ai souhaité modéliser l'interaction entre ANP32E LRR et H3/H4 en utilisant une approche de simulation moléculaire grâce au logiciel Prism (Protein Interactions by Structural Matching).

Les résultats obtenus *in silico* montrent que la partie concave du LRR d'ANP32E peut potentiellement interagir avec le tétramère d'histones H3/H4. L'interaction semble se faire sur la tranche d'un des dimères H3/H3, là où se fixe l'ADN nucléosomal (Figure 64).

Ainsi, le LRR, via sa partie concave chargée négativement, se lie au niveau du SHL -1.5 ou +1.5 à la place de l'ADN.

Cette même simulation en présence d'un nucléosome entier n'a pas aboutie, signifiant qu'il faudrait que l'ADN soit déjà partiellement déroulé pour permettre au LRR d'ANP32E de se fixer au tétramère, une possibilité du fait de l'activité de remodelage de p400/ TIP60. Afin de vérifier cette information, il serait nécessaire de tester l'interaction entre le LRR et l'ADN/le nucléosome.

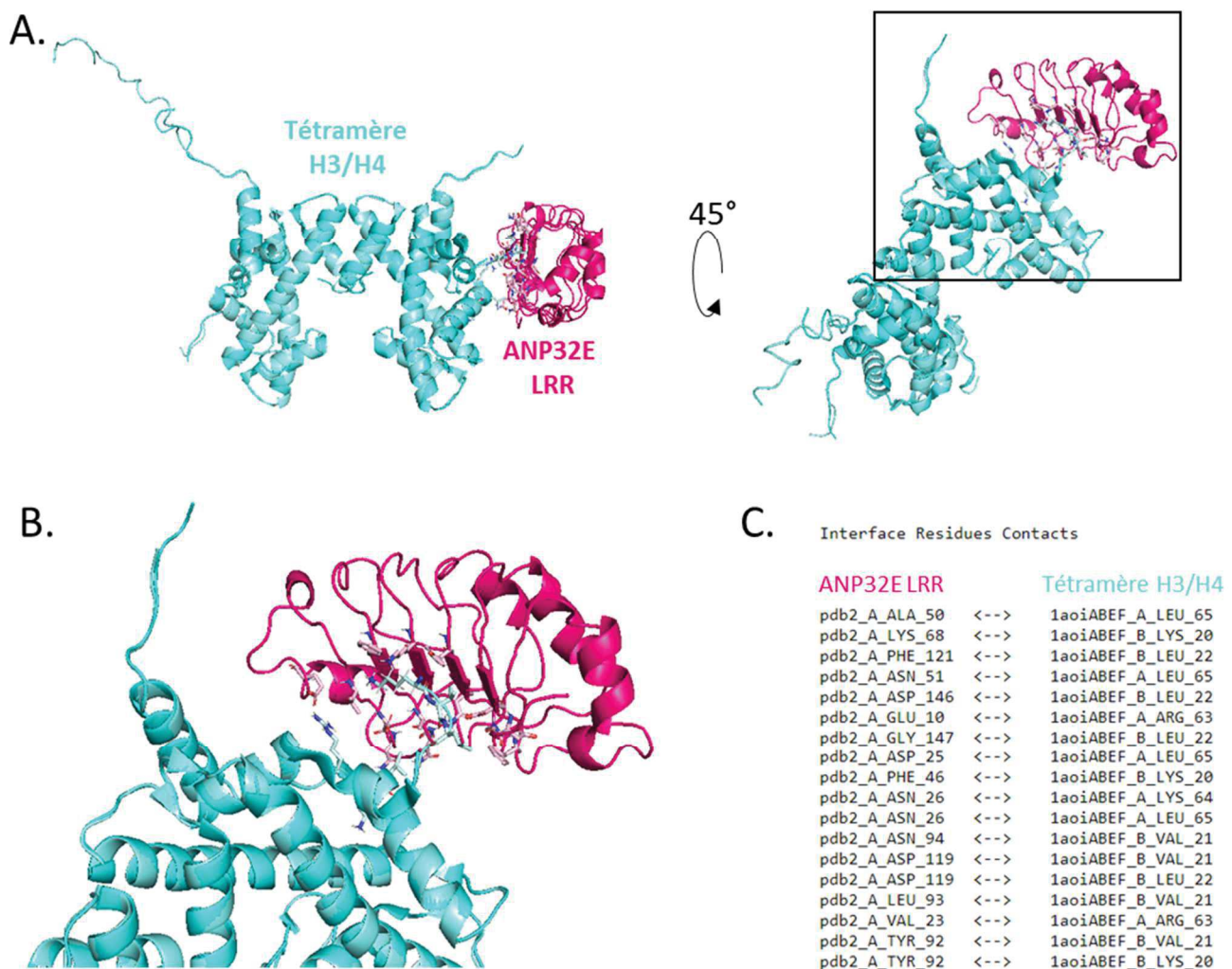


Figure 64 : Modélisation de l'interaction entre ANP32E LRR et xH3/xH4

A. Vue d'ensemble sur le modèle de l'interaction obtenu grâce au logiciel PRISM (<http://cosbi.ku.edu.tr/prism/index.php>)

B. Vue agrandie sur le domaine d'interaction

C. Interactions possibles entre les résidus du tétramère et d'ANP32ELRR proposées par PRISM pour ce modèle

Dans cette modélisation, la tyrosine 92 d'ANP32E pourrait potentiellement interagir avec la valine 21 (interaction électrostatique) et la lysine 20 (liaison H) de la chaîne H4. Les interactions proposées par PRISM sont détaillées dans la figure X.C. Il faut cependant rester prudent avec cette simulation, car la queue de l'histone H4 sur laquelle semble se fixer le LRR n'est pas entière. Cette simulation indique cependant qu'une telle interaction serait faisable, avec une énergie de liaison de -10.26 kcal/mol.

D. Comparaison de l'interaction de YL1 ZID et ANP32E1 ZID en contexte nucléosomique

1. Préparation du nucléosome

Afin de pouvoir comparer l'interaction des deux chaperons en condition nucléosomique, je me suis attelée à la production et formation du nucléosome.

La première stratégie employée, qui a consisté à co-purifier l'octamère puis à assembler le nucléosome en ajoutant l'ADN de positionnement, n'a pas fonctionné. En effet, la présence de l'étiquette de purification volumineuse His-10-TRX sur l'histone H4 empêche certainement la reconstitution du nucléosome (gel de retardation présenté en Figure 59-C). Sur ce gel, nous remarquons que l'ADN 601 disparaît du gel et semble être retrouvé au niveau du puits. Ainsi il y a probablement formation d'agrégats ADN-histones dans cette condition.

J'ai donc décidé d'utiliser une seconde stratégie consistant à purifier séparément les paires d'histones H2A ou.Z/H2B et le tétramère d'histones H3/H4, puis de les assembler directement avec de l'ADN de positionnement. J'ai également remplacé l'étiquette His10-TRX par une étiquette His6 moins volumineuse.

J'ai ainsi reconstitué trois types de nucléosome :

- **canonique de *Xenopus laevis***
- **canonique chimérique *Homo sapiens* - *Xenopus laevis***
- **variant H2A.Z chimérique *Homo sapiens* - *Xenopus laevis***

La vérification des nucléosomes par microscopie électronique et coloration négative a montré que la qualité des différents nucléosomes n'est pas totalement identique.

L'échantillon donnant les meilleurs résultats est celui correspondant au nucléosome canonique de *Xenopus laevis*. Ce résultat n'est pas surprenant car c'est le nucléosome le plus stable, qui a été utilisé historiquement dans les premières études (Luger et al. 1997).

L'échantillon de nucléosome donnant le moins bon résultat correspond au nucléosome variant H2A.Z chimérique. Cela est en accord avec la plus faible stabilité de la paire d'histones H2A.Z. Sur l'image de microscopie électronique, nous observons un bruit de fond élevé qui correspond à de l'ADN libre. Cette observation est en adéquation avec l'expérience de retardation sur gel, où de l'ADN libre est toujours visible.

Il sera donc nécessaire de retravailler les ratios d'assemblage pour ce nucléosome H2A.Z. L'inexactitude des ratios utilisés lors de cette expérience est liée à la difficulté d'estimer la quantité précise de H2A.Z/H2B, qui est instable, en solution.

Il est également important de garder en tête que la méthode de dilution employée n'est qu'une méthode à petite échelle et qu'elle devra être reproduite à plus grande échelle. Pour ce faire, il sera nécessaire d'obtenir de plus grandes quantités d'histones, mais également de refaire une préparation d'ADN 601.

La technique de production des histones employée ici est une technique de co-expression en *E.coli* adaptée du protocole de Shim et ses collègues (Shim et al. 2012). Cette méthode m'a permis d'obtenir des rendements pour les paires d'histones H2A ou H2A.Z/H2B de 0,35 et 0,15 mg/L respectivement. Pour le tétramère H3/H4, un rendement de 0.15 mg/L a été obtenu. Ces rendements sont faibles et ne m'ont pas permis pour l'instant de mettre en place une reconstitution du nucléosome à grande échelle.

Il est à noter qu'il existe une autre technique pour la production et la purification d'histones chez *E. coli*. Il s'agit d'une méthode de *refolding* à partir de corps d'inclusion chez *E. coli*. Cette technique permet d'obtenir des quantités de nucléosome largement supérieures, mais elle est plus longue (Dyer et al. 2003). Cette méthode pourrait être envisagée, si des approches d'ITC s'avèrent nécessaires. Elle devra cependant d'abord être mise en place dans l'équipe.

2. Test de l'interaction chaperon-nucléosome

a. Méthode quantitative

Les méthodes de reconstitution à petite échelle m'ont permis de reconstituer au maximum 25 pmol de nucléosome dans 80 μ l (soit 0.3 μ M de nucléosome ou 33.7 μ g/mL).

Mon objectif a été de mettre en place une technique robuste permettant d'évaluer l'interaction entre les chaperons (entiers ou domaines) et les nucléosomes. J'ai donc opté pour la technique de la SPR ne nécessitant que très peu de protéine.

Cependant, jusqu'à présent, mes essais n'ont pas permis de mesurer ces interactions. Afin d'obtenir une immobilisation stable du nucléosome, nous pourrions envisager de biotinyler l'ADN 601 permettant d'immobiliser le nucléosome via un système Streptavidine-Biotine.

Une fois cette méthodologie optimisée, nous pourrions tester les différents domaines des chaperons, ainsi que les protéines entières. Pour ANP32E, les différents mutants proposés à partir de l'étude structurale du LRR seront également implémentés.

La force et la stabilité des complexes formés pourront également à l'avenir être testées par d'autres techniques biophysiques, telles que l'AUC ou encore par essais de stabilité thermique (nanoDSF).

A plus long terme, nous envisageons d'étudier la structure de ces complexes. L'approche cristallographique n'est pour l'instant pas possible, en revanche des études par cryo-microscopie électronique pourront être envisagées.

b. Méthode qualitative

Nous voyons sur l'expérience de retardation sur gel qu'ANP3E1-ZID n'est pas capable de se lier directement au nucléosome H2A.Z. Il semble donc nécessaire d'avoir au préalable un nucléosome déstabilisé pour que le domaine ZID d'ANP32E puisse permettre l'éviction de la paire d'histones H2A.Z variante. Ce résultat est en accord avec la structure d'ANP32E ZID - paire d'histones variante H2A.Z, la liaison se faisant au niveau de sites qui normalement sont enfouis dans le nucléosome.

Il serait alors intéressant de tester la fixation du domaine LRR d'ANP32E au nucléosome H2A.Z variant, afin de mieux comprendre son rôle dans ce mécanisme. Est-il, en plus de son rôle potentiel dans l'interaction avec H3/H4, impliqué dans la reconnaissance générale au nucléosome ?

En effet, même si dans notre simulation moléculaire, le LRR n'a pas été montré comme liant le nucléosome, il existe des exemples dans la littérature où les domaines LRR sont impliqués dans la liaison à l'ADN (Gupta et Meek 2005).

E. Ouverture sur un modèle spéculatoire

Les nombreuses fonctions d'H2A.Z et son implication dans diverses pathologies en font une cible thérapeutique de choix. Cependant, une compréhension détaillée de ses mécanismes d'actions et notamment de son association à la chromatine (localisation génomique) sont au préalable nécessaire.

A ce jour, il reste encore beaucoup d'inconnues autour des mécanismes de dépôts et d'évictions d'H2A.Z sur la chromatine. Notamment les rôles précis des complexes de remodelage de la chromatine SRCAP et p400/Tip60, qui sont associés aux chaperons YL1 et ANP32E. Cet axe sera un axe de recherche à développer sur le long terme.

Mon but a donc été de caractériser par une approche de biologie intégrative l'interaction chaperon-paire d'histones variante et chaperon-nucléosome afin de comparer les modes de liaison des chaperons et de proposer un modèle d'échange de H2A/H2A.Z sur la chromatine par YL1 et ANP32E.

Dans mes travaux, j'ai principalement travaillé sur le chaperon ANP32E, qui était moins caractérisé qu'YL1.

Je propose ici à partir de mes données et de la littérature un modèle spéculatoire de l'éviction de H2A.Z. par ANP32E – p400/Tip60 :

1) Le complexe p400/Tip60 se lie au nucléosome grâce à un ou plusieurs de ces domaines *reader*. Par exemple, MRG15 est capable de reconnaître H3K4me1 et H3K4me3, Tip60 est capable de lier H3K4me1, et GAS41, via son domaine YEAST, reconnaît les queues d'histones acétylées ou succinylées (Giaino et al. 2019).

L'hydrolyse de l'ATP permet alors de décoller localement l'ADN du nucléosome, possiblement au niveau du SHL-2.

2) Le LRR d'ANP32E qui interagissait avec MRGBP peut alors reconnaître le tétramère d'histones H3/H4 partiellement libre, au niveau du SHL 1.5. De manière similaire, la partie de ANP32E-ZID peut se fixer sur la paire H2A.Z/H2B proche de l'interface d'interaction avec l'ADN maintenant découverte. Cela va permettre de positionner le chaperon ANP32E, déstabilisant d'avantage le nucléosome et notamment l'interaction entre le tétramère d'histones et les paires d'histones H2A.Z variantes.

3) Le domaine ZID d'ANP32E peut alors reconnaître H2A.Z/H2B. Son positionnement entraîne le détachement de la paire d'histones H2A.Z par l'allongement de l'hélice C-terminale de H2A.Z, permettant son éviction.

La Figure 65 représente un octamère d'histones sur lequel la structure du domaine ZID d'ANP32E et la modélisation moléculaire du domaine LRR sont rassemblées.

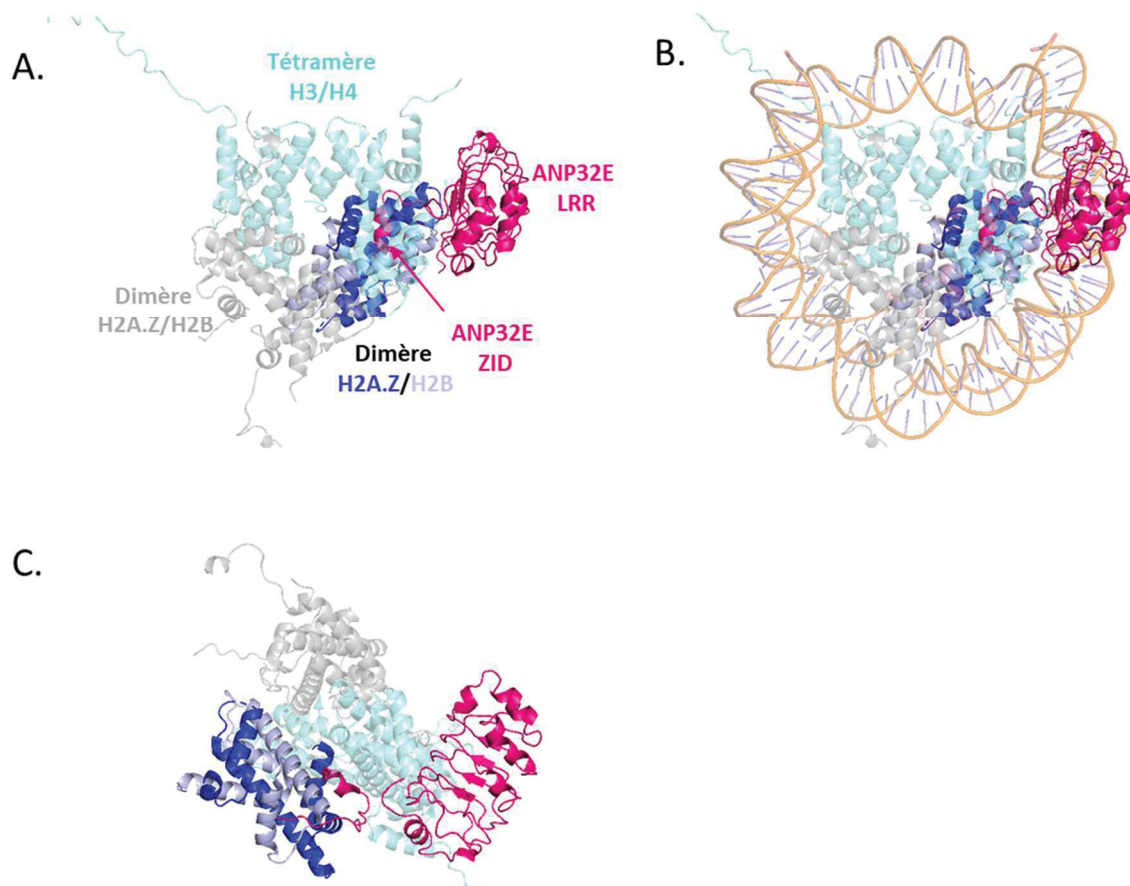


Figure 65 : Modèle intégrant les domaines LRR et ZID d'ANP32E

A. Vue sur l'octamère H2A.Z

B. Vue en contexte nucléosomique

C. Vue A. renversée et retournée

Réalisé à partir des entrées PDB 1F66, 4CAY et de ma structure d'ANP32E-LRR.

Ce travail contribue à une meilleure compréhension des processus de régulation épigénétique fondamentaux, permettant d'aborder les aspects mécanistiques et fonctionnels de la biologie de H2A.Z. Les connaissances obtenues à partir de ces études pourront guider vers le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses ciblant les mécanismes de déposition/éviction d'H2A.Z par les facteurs de remodelage de la chromatine.

Chapitre 4 :

CHD1L un remodeleur unique et un acteur dans les phénotypes associés aux réarrangements chromosomiques de la région 1q21.1., incluant des troubles du spectre autistique

Chapitre 4 : CHD1L, un remodeleur unique et un acteur dans les phénotypes associés aux réarrangements chromosomiques de la région 1q21.1., incluant des troubles du spectre autistique.

Ce chapitre est le fruit d'un travail collaboratif avec l'équipe du Dr. Christelle Golzio, et plus particulièrement avec le Dr. Maria Nicla Loviglio à l'IGBMC. Toutes deux travaillent sur les réarrangements chromosomiques dans les troubles neuro-développementaux et notamment les troubles du spectre autistique (TSA). Leur laboratoire utilise des outils génomiques et de modélisation *in vivo* chez le poisson zèbre afin de mieux comprendre les TSA. La combinaison de nos travaux a permis d'obtenir une approche intégrative et multidisciplinaire mêlant caractérisation *in vivo* chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et analyses biochimiques *in vitro* (correspondant à ma contribution). Ces travaux ont permis d'identifier et de caractériser le gène *CHD1L* comme étant un gène candidat robuste dans l'apparition des signes cliniques associés aux réarrangements chromosomiques de la région 1q21.1.

I. Introduction

A. Polymorphisme génétique et CNVs

Le séquençage du génome humain a permis la découverte de millions de variations de séquence dans le génome humain (Le Morvan et al. 2005). Cette grande variabilité et diversité génétique s'explique par le polymorphisme génétique. Par définition, on parle de polymorphisme lorsqu'une même variation est trouvée dans 1% ou plus de la population étudiée à un locus donné.

Il existe ainsi plusieurs types de variations, tels que le polymorphisme nucléotidique (ou SNP pour *single nucleotide polymorphism*) qui est la forme la plus étudiée. Elle se limite à une variation par substitution d'un seul nucléotide. Elle est très courante et se rencontre environ

toutes les 1000 paires de bases dans le génome humain (soit 4-5 millions de SNPs dans un génome humain). D'autres types de polymorphismes peuplent également nos génomes, tels que les indels (insertion/délétion), les inversions, les translocations, le polymorphisme des microsatellites ou encore les variations de nombre de copies (Almal et Padh 2012).

La variabilité du nombre de copies, ou *copy number variation* (CNVs), est reconnue comme étant une des variations génomiques humaines les plus répandues et représente le type le plus fréquent de lésions génétiques présentes dans les maladies génétiques rares et communes (Furuya et al. 2015) (Golzio et Katsanis 2013). Elle correspond à une variation du nombre de copies d'un gène ou d'une région chromosomique (duplication ou délétion) entre différents individus de la même espèce. En effet, on trouve normalement deux copies identiques de chaque région des autosomes dans le génome humain. Cependant, il existe de nombreuses régions du génome où le nombre de copies est différent entre plusieurs personnes (Feuk, Carson, et Scherer 2006).

La taille des CNVs varie ainsi de 1 kilobase à plusieurs mégabases, pouvant aller jusqu'à la suppression ou l'ajout d'un chromosome entier dans le cas des monosomies et des trisomies respectivement. Ces CNVs ont une taille moyenne de 2,9 kb (Conrad et al. 2010). Plus de 12 % du génome sont concernés par ces CNVs (Carter 2007), avec en 2013, 300 000 régions identifiées et réparties dans le génome (Furuya et al. 2015). Le nombre moyen de CNVs chez les individus est d'environ 1100. Ainsi, il peut y avoir jusqu'à 0.2 %, soit 6 Mb, de différence entre deux individus liés aux seuls CNVs (Conrad et al. 2010) (McCarroll et al. 2008).

Les CNVs peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur fréquence, les variants communs et les variants rares. Les variants communs ont une fréquence >1% de la population, on parle alors de polymorphisme du nombre de copies (CNPs) (Feuk, Carson, et Scherer 2006). Ces CNPs représentent plus de 80% de tous les CNVs et sont en général stables et hérités. Les effets de ces CNPs sont souvent neutres, mais peuvent également entraîner des conséquences fonctionnelles et être impliqués dans le développement de maladies communes (McCarroll et al. 2008).

Les 20% restants correspondent aux variants rares (<1% de la population). Ces CNVs rares peuvent être hérités ou *de novo*. Les *de novo* CNVs apparaissent spontanément pendant la méiose ou à un stade précoce du développement embryonnaire. Les CNVs rares donnent plus fréquemment lieu à des changements phénotypiques que les CNPs et sont souvent pathogéniques (Merikangas, Corvin, et Gallagher 2009) (Furuya et al. 2015).

Les CNVs rares sont particulièrement enrichis chez les individus présentant des phénotypes neurodéveloppementaux complexes (Nowakowska 2017) (J. Barone et al. 2019).

La détection des CNVs se fait de manière routinière grâce à l'utilisation de puce à ADN, aussi appelée puce d'hybridation génomique comparative (*CGH-array* en anglais). Elles permettent d'étudier les corrélations entre phénotypes et variations génétiques et ainsi de détecter les déséquilibres structuraux des chromosomes (Mefford et al. 2009) (Shinawi et Cheung 2008).

Des techniques de séquençage à haut débit, telles que le séquençage d'exome, peuvent également si leur couverture est bonne, détecter des CNVs (Nowakowska 2017).

Des études ont révélé qu'une partie des CNVs, hérités mais également *de novo*, jouent un rôle important dans le développement de conditions pathologiques complexes, telles que des anomalies congénitales (cranio-faciale, cardiaque, respiratoire, rénale), des troubles du développement neurologique incluant des déficiences intellectuelles, des maladies auto-immunes et des maladies psychiatriques, telles que la schizophrénie et les troubles du spectre autistique (Almal et Padh 2012) (Malhotra et Sebat 2012) (Golzio et Katsanis 2013).

Ainsi, la variabilité du nombre de copies d'un gène ou d'une région génomique contribue de façon majeure aux déséquilibres génomiques.

B. Le trouble du spectre autistique (TSA)

Le trouble du spectre autistique est un trouble neurodéveloppemental, d'étiologie complexe, multifactorielle et hétérogène (Casey et al. 2012). Il est caractérisé par des déficits de communication, d'interactions sociales et avec la présence d'intérêts restreints, de comportements répétitifs (réticence au changement) et des réactions sensorielles particulières (Hodges, Fealko, et Soares 2020).

Les TSAs sont très hétérogènes sur le plan clinique et ont donc des sévérités variables. Plusieurs comorbidités ont été associées aux TSAs. C'est notamment le cas de la déficience intellectuelle, des malformations cranio-faciales, des problèmes gastro-intestinaux, des malformations cardiaques et de plusieurs caractéristiques anthropométriques, incluant la circonférence de la tête (micro- et macrocéphalie) (Brusco et Ferrero 2019).

Il est à noter que ces comorbidités ne sont pas systématiques. Par exemple, la déficience intellectuelle ne touche qu'environ 33% des personnes atteintes de TSAs et peuvent avoir une gravité variable. En France, ces troubles sont reconnus comme un handicap depuis 1996 (<https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/autisme>, dernière consultation le 10/09/2020) (Fombonne et al. 2019).

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la prévalence mondiale des TSA est de plus de 0.6% chez les enfants. Cependant de nombreuses études révèlent des chiffres beaucoup plus importants, comme celle de Hodges et al., 2020 où une prévalence de 1.7% est trouvée

sur une population d'enfants américains. Les derniers chiffres du Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) des États-Unis font même état d'une prévalence plus élevée de 1,85% chez les enfants américains.

Cette prévalence dépend également du moyen de diagnostic. La méthode la plus actuelle se base sur l'utilisation d'une classification internationale DSM-5 (manuel de l'*American Psychiatric Association*) et CIM-11 (manuel de l'OMS). Cette classification récente fait appel à de nouveaux critères de diagnostic de l'autisme, permettant ainsi des diagnostics plus précoces (Keller, Bari, et Castaldo 2019). Le diagnostic se fait dans la grande majorité dès la petite enfance (3 ans en moyenne). Il est toutefois plus tardif dans certains cas, notamment chez les femmes. Actuellement, les TSA touchent 3 hommes pour 1 femme, mais il est probable que ce ratio soit erroné du fait d'un diagnostic plus complexe chez les femmes.

Les TSA sont influencés par des facteurs génétiques et environnementaux, la part génétique pouvant varier de 50 à 95 % en fonction des études (Leppa et al. 2016). On estime aujourd'hui qu'au moins 1000 à 1500 gènes sont impliqués dans les TSAs et cette liste est grandissante. De plus, environ 5 à 15 % des cas de TSA sont liés à des CNVs. Les CNVs récurrents les plus fréquents sont situés, entre autres, aux loci 1q21.1, 7q11.23, 15q11–13, 16p11.2, 16p13.11, et 22q11.2. (Brusco et Ferrero 2019) (Leppa et al. 2016).

Ainsi, le dépistage des CNVs pathogènes par puces à ADN est aujourd'hui considéré comme une approche de premier niveau dans le diagnostic moléculaire des TSA. De plus, les analyses d'exome permettent de détecter les mutations *de novo* souvent présentes dans les cas graves de TSA. (Brusco et Ferrero 2019) (R. Barone et al. 2020).

C. La région chromosomique 1q21.1

1. Composition

La région chromosomique 1q21.1 est localisée sur le bras long (q) du chromosome 1 à la position 21.1 (locus par rapport au centromère), comme le montre la Figure 66-A. Cette région a une taille d'environ 6 Mb, allant de 142 Mb à 148 Mb, et se divise en deux zones : la première, la zone proximale ou zone TAR de 144.1 Mb à 144.5 Mb, et la seconde, la zone distale de 144.7 Mb à 145.9 Mb, comme représentée dans la Figure 66-B, panel du haut.

Cette région est sujette à de nombreuses duplications et délétions (CNVs), illustrées sur la Figure 66-B, panel du bas. Les duplications et délétions touchent principalement la zone distale, mais peuvent également affecter la zone TAR (Brunetti-Pierri et al. 2008). Ces CNVs

peuvent alors entraîner plusieurs déséquilibres génomiques, qui sont associés à différents phénotypes.

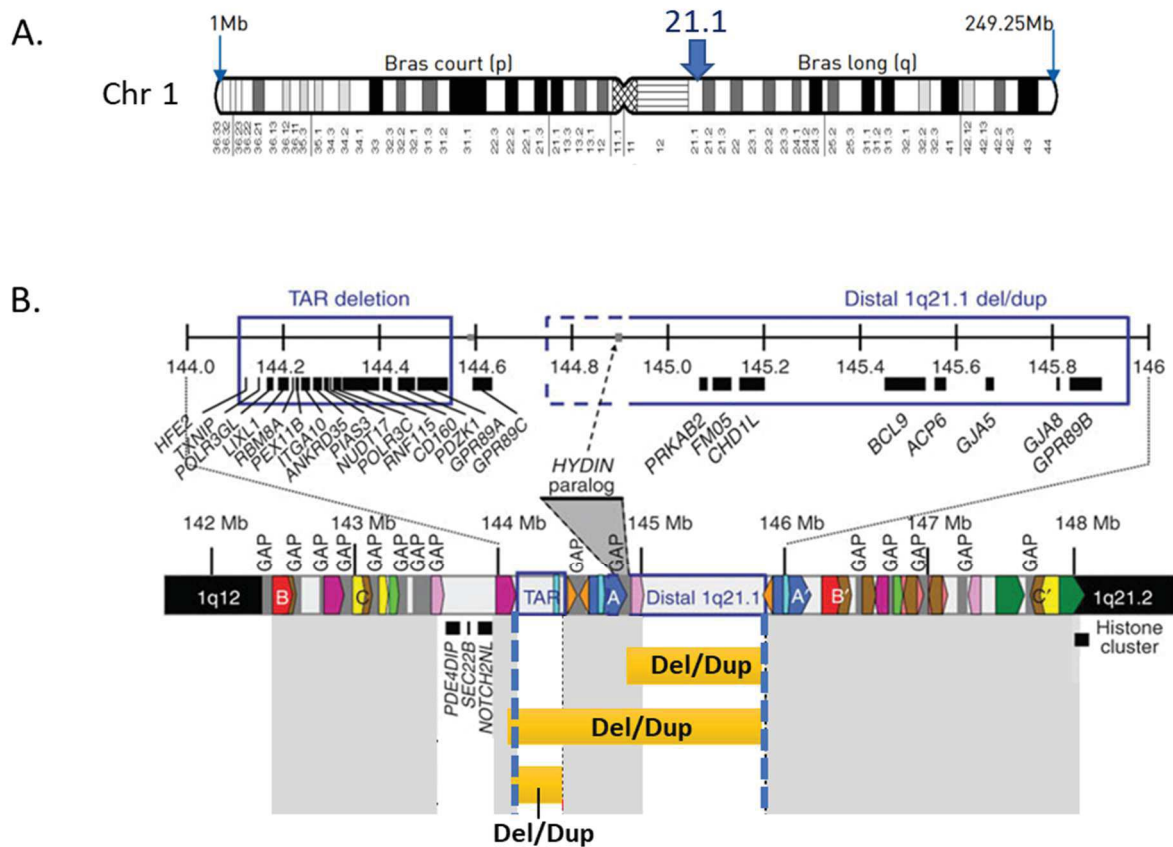


Figure 66 : Composition et réarrangements de la région 1q21.1

A. Organisation générale du chromosome 1

B. Organisation spécifique de la région chromosomique 1q21.1, qui se divise en deux parties : la région TAR et la région distale. Les gènes présents dans cette région sont également représentés.

Del/Dup : représentation schématique des régions sujettes aux délétions et duplications, correspondant aux CNVs.

GAP = région répétée non annotée

2. Phénotypes associés aux CNVs

a. Zone TAR

La microdélétion de la zone TAR a été associée au syndrome TAR, c'est-à-dire à une Thrombocytopénie avec Absence de Radius (*thrombocytopenia absent radius*), qui correspond à une anomalie congénitale caractérisée par des avant-bras anormaux provoqués par l'absence de l'os du radius. Cependant, la présence de la microdélétion ne semble pas être la seule responsable de la maladie et d'autres facteurs additionnels seraient impliqués (Klopocki et al. 2007).

La microduplication de cette région, et notamment la surexpression du gène *PDZK1*, a été associée à un risque accru de TSA et de maladies psychiatriques (Casey et al. 2012) (Goodbourn et al. 2014). Le gène *PEX11B* de cette région semble également jouer un rôle dans la différenciation, ainsi que dans la migration neuronale et pourrait avoir un rôle sur la taille de l'encéphale en condition pathologique (Busè et al. 2017).

b. Zone 1q21.1 distale

Durant cette étude nous nous sommes particulièrement intéressés aux délétions et duplications (CNVs) de la région 1q21.1 distale, qui sont les plus fréquentes. Des suppressions et duplications réciproques récurrentes de la région 1q21.1 distale ont été associées à des phénotypes variables qui comprennent du dysmorphisme crânio-facial, de l'hypertélorisme, des anomalies de la circonférence et de la taille de l'encéphale (micro- et macrocéphalie), des anomalies congénitales, dont des cardiopathies congénitales, des retards de développement, des déficiences intellectuelles, de la schizophrénie et des troubles du spectre autistique (Busè et al. 2017) (Brunetti-Pierri et al. 2008) (Mefford et al. 2009).

Pour un même CNV, on retrouve une pénétrance incomplète et une expressivité variable. Certains individus porteurs de CNVs dans cette région sont également asymptomatiques (Brunetti-Pierri et al. 2008).

L'étude « 1q21.1 recurrent Microdeletion » de Haldeman-Englert et de Jewett présente des statistiques portant sur un panel de 55 personnes présentant une microdélétion récurrente de la région 1q21.1 :

- plus de 75% ont des caractéristiques de dysmorphisme crânio-faciale,
- 50 à 75% ont des retards développementaux (parole et retard moteur),

- 25 à 50% ont des anomalies oculaires, des retards intellectuels et présentent une microcéphalie et une taille inférieure à la moyenne,
- 10% à 25% ont des troubles de l'attention (hyperactivité), des anomalies cardiaques, ou encore de l'hypotonie,
- moins de 10% ont des traits autistiques, des malformations du cerveau ou encore des anomalies génito-urinaires.

En corrélant cette étude à celle de Bernier et al, qui inclut également des patient atteints de duplication de la région 1q21.1 distale, nous remarquons qu'environ 10% des personnes atteintes de cette délétion présentent de troubles du spectre autistique, contre environ 40% pour des personnes ayant la duplication réciproque (Bernier et al. 2016). La TSA est donc bien un symptôme associé aux CNVs de cette région.

Nous remarquons également qu'environ 25% des personnes avec une délétion présentent une microcéphalie et 25% des personnes ayant une duplication présentent une macrocéphalie, suggérant un phénotype miroir réciproque au niveau du volume crânien.

3. Un phénotype miroir de la région 1q21.1 distale

Les CNVs de la région 1q21.1 distale peuvent entraîner des corrélations génotype-phénotype opposées. En effet, la délétion de cette région est associée à la microcéphalie, tandis que la duplication réciproque est associée à la macrocéphalie (Brunetti-Pierri et al. 2008) (Golzio et Katsanis 2013). Ainsi, les CNVs de cette région distale sont connus pour avoir un phénotype miroir sur la circonférence de la tête et pour être une cause potentielle de TSA et de schizophrénie (Haldeman-Englert et Jewett 2011) (Marshall et al. 2017).

Un phénotype miroir est également visible pour la taille, même si la taille n'est pas toujours explicitement mentionnée dans les études. Comme vu précédemment, 25 à 50 % des porteurs de délétion ont une taille inférieure à la moyenne. En revanche, les porteurs de duplication ont tendance à se situer dans les percentiles supérieurs de la taille, mais avec un effet moins évident (Macé et al. 2017).

Les analyses phénotypiques de patients présentant de tels CNVs réciproques ont révélé que les phénotypes miroirs sont souvent liés à un déséquilibre de dosage d'un gène majeur et la participation éventuelle de gènes modificateurs qui modulent l'expressivité et/ou la pénétrance des phénotypes, comme par exemple dans le cas des CNV 16p11.2 BP2-BP3 et BP4-BP5 (Golzio et Katsanis 2013) (Golzio et al. 2012) (Loviglio et al. 2017).

4. Résultats collaboratifs : Quel(s) gène(s) de la région 1q21.1 distale est(sont) responsable(s) des phénotypes miroirs ?

Ce CNV sur le chromosome 1 est composé de 9 gènes, qui sont des potentiels candidats permettant d'expliquer ces phénotypes réciproques. Il s'agit des gènes *PRKAB2*, *FMO5*, *CHD1L*, *BCL9*, *ACP6*, *GJA5*, *GJA8*, *GPR89B*, ainsi que *HYDIN2*.

Nos collaborateurs ont modélisé ce CNV dans le poisson zèbre et ont identifié *CHD1L* comme le gène majeur contrôlant la circonférence de la tête et la taille des larves de poisson zèbre. La surexpression de *CHD1L* entraîne une augmentation de la taille de la tête des larves de poisson zèbre, alors que sa suppression provoque une réduction de la taille de l'encéphale. Il en est de même pour la taille du corps, suggérant un phénotype miroir : plus *CHD1L* est exprimé, plus la taille de l'encéphale et du corps est augmentée et inversement lorsque *CHD1L* est réprimé.

De plus, il est possible par des expériences de complémentation *in vivo* chez le poisson zèbre de sauver le phénotype en utilisant les deux isoformes de *CHD1L* : la forme entière et un isoforme plus court pour laquelle le premier lobe du domaine ATPase est absent.

De plus, nos collaborateurs ont confirmé la pathogénicité d'un variant homozygote retrouvé chez un individu avec des traits autistiques et microcéphalie par des expériences de complémentation fonctionnelle.

L'ensemble des résultats générés par nos collaboratrices suggère ainsi que le gène *CHD1L* est un contributeur majeur aux phénotypes neuro-anatomiques associés au CNV en position 1q21.1 incluant des atteintes au niveau du volume crânien et de la stature. De plus, l'étude de la pathogénicité d'un variant homozygote dans *CHD1L*, nous indique qu'une perte de fonction de ce gène serait également responsable des troubles du spectre autistique identifié chez l'individu porteur de ce variant.

D. Le facteur de remodelage de la chromatine CHD1L

1. CHD1L vs CHD1

CHD1L (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1-Like), aussi appelé ALC1 (Amplified in Liver Cancer 1), est un remodeleur unique de la famille SNF2 et de la sous-famille CHD. Comme son nom l'indique, CHD1L est proche de CHD1, qui a été décrit précédemment dans la partie « CHD » de l'introduction générale, avec 36% d'identité entre hCHD1 et hCHD1L.

Comme nous l'avons vu précédemment, la famille des CHDs se caractérise par la présence d'un double chromodomaine en partie amino-terminale. Ces chromodomains sont capables de lier spécifiquement les méthylations de l'histone H3 (Flanagan et al. 2005) et permettent également de maintenir le remodeleur dans une conformation inactive en absence de substrat nucléosomal (Hauk et al. 2010).

De manière surprenante, CHD1L ne contient pas de chromodomaine dans sa partie N-terminale, mais possède un macrodomaine dans sa partie carboxy-terminale, comme le montre l'alignement de séquence entre hCHD1 et hCHD1L présenté dans la Figure 67. Ce macrodomaine est unique parmi les remodeleurs de la famille SNF2 et n'est donc pas retrouvé chez CHD1.

Ainsi, hCHD1 et hCHD1L divergent dans la composition de leurs parties amino- et carboxy-terminales, mais possèdent tous deux une forte conservation au niveau de la tête ATPase (Lobe 1 + Lobe2) avec environ 45% d'identité.

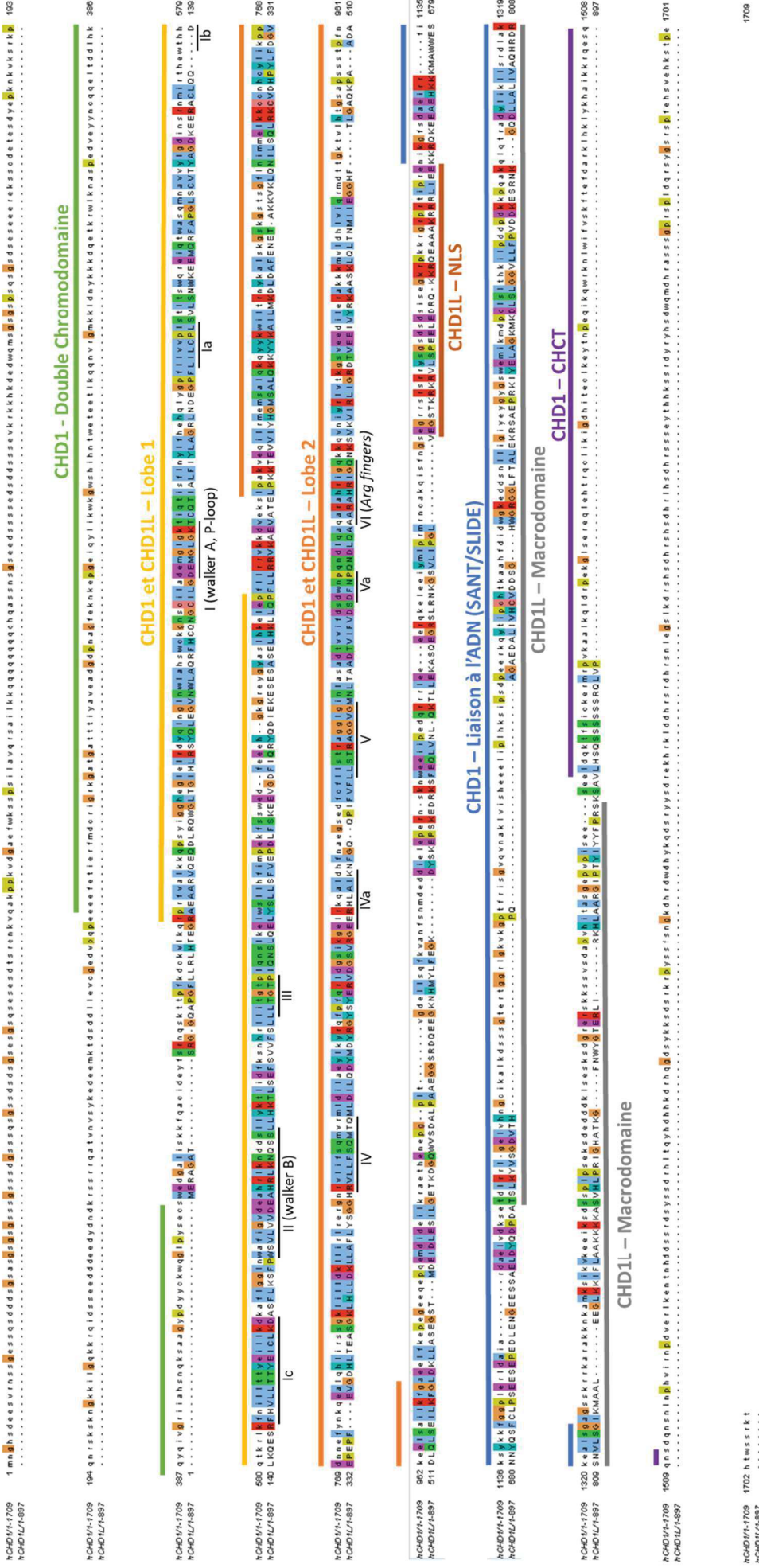


Figure 67 : Alignement de séquences entre hCHD1 (en minuscule) et hCHD1L (en majuscule)
 L'alignement a été effectué en utilisant Clustal oméga puis Jalview avec la coloration clustal
 Les différents domaines de CHD1 sont annotés au-dessus ou pour CHD1L en dessous, excepté pour la tête ATPase.
 Les motifs des têtes ATPases ont été placés sur la base d'alignement de séquences avec scCHD1, car il n'y a pas
 d'information structurale disponible pour hCHD1 ou hCHD1L.

2. Composition et isoformes de CHD1L

CHD1L est composé dans sa partie N-terminale d'une tête ATPase de type SNF2, elle-même formée de deux lobes (1 et 2, aussi appelés DExx and HELICc respectivement), suivie d'un signal de localisation nucléaire et dans sa partie C-terminale d'un macrodomaine, comme le montre la Figure 68.

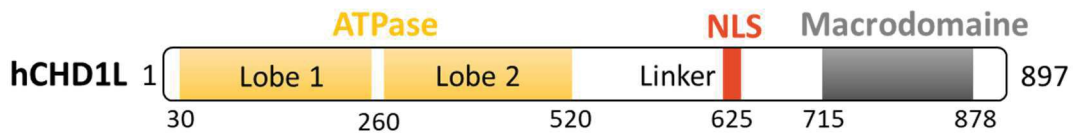


Figure 68 : Organisation schématique de la protéine humaine de CHD1L

NLS = signal de localisation nucléaire

CHD1L est localisé comme nous l'avons vu sur la région chromosomique 1q21.1 distale. Il est composé de 23 exons permettant ainsi la formation d'isoformes par épissage alternatif (Cheng, Su, et Xu 2013).

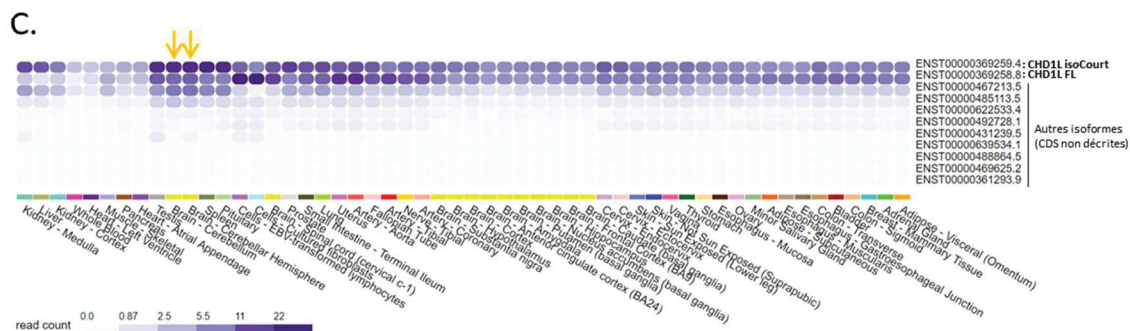
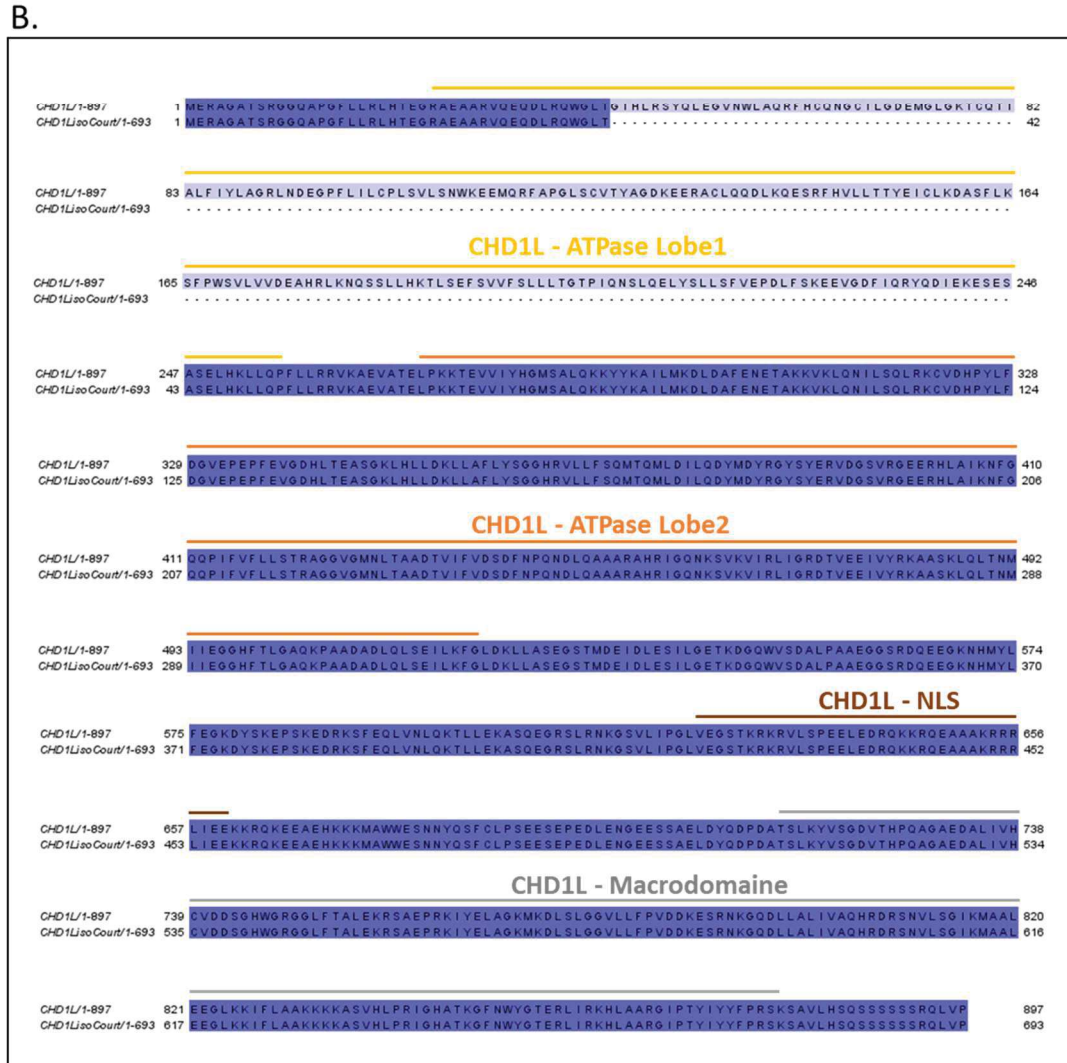
Grace à la base de données Ensembl (<https://uswest.ensembl.org/index.html>), nous voyons que CHD1L possède plus de 7 isoformes chez l'homme. Cependant seuls deux de ces isoformes sont répertoriés comme ayant une séquence codante (CDS) dans Ensembl. Il s'agit de l'isoforme long, correspondant à la protéine entière, et de l'isoforme court, qui ne possède pas de lobe 1 de la tête ATPase. Ces deux isoformes sont présentés dans la Figure 69 A et B, sous forme d'un tableau et d'un alignement de séquences.

De plus, grâce à la base de données GTEX (<https://gtexportal.org/home/>) nous voyons que ces deux isoformes long et court sont les plus exprimés chez l'homme (Figure 69 C). Leurs expressions varient en fonction des tissus. L'expression de l'isoforme court de CHD1L semble plus prononcée que celle de l'isoforme long au niveau du cerveau et notamment du cervelet. C'est notamment pour cela que nos collaboratrices se sont intéressées à cet isoforme court.

Il est également important de noter que l'isoforme court ne contenant pas de lobe 1 de la tête ATPase, ne devrait donc pas lier l'ATP (absence de la moitié des motifs signatures représentés dans la Figure 67 et dans la partie « Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants (remodeleurs) » de l'introduction). La fonction première de cet isoforme n'est donc probablement pas liée au remodelage de la chromatine ou bien selon un mécanisme différent de celui communément admis pour les remodeleurs. Par contre, le macrodomaine C-terminal est lui parfaitement conservé, suggérant son importance fonctionnelle pour les deux isoformes.

A.

CHD1L	Numéro Ensembl	Nombre d'acide aminé	Caractéristique par rapport à la protéine entière
Isoforme long	ENST00000369258.8	897	FL, protéine entière
Isoforme court	ENST00000369259.4	693	Δ43-246



Légende sur la page suivante

Figure 69 : Les isoformes de CHD1L

A. Caractéristiques des isoformes de CHD1L. L'isoforme court de CHD1L ne possède pas les acides aminés 43 à 246 par rapport à la forme longue. L'isoforme court est donc délété de la quasi-totalité du lobe 1 de la tête ATPase.

B. Alignement des différents isoformes de CHD1L - L'alignement a été réalisé avec clustal oméga puis édité et coloré sur Jalview en utilisant la coloration par pourcentage d'identité.

C. Expression tissu-spécifique des transcrits des différents isoformes selon la base de données GTEx (Genotype-Tissue Expression) (<https://gtexportal.org/home/>). Les flèches orange mettent en avant l'expression au niveau du cerveau et du cervelet.

3. Mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L

Comme nous l'avons vu, les chromodomaines maintiennent les remodeleurs de la famille CHD1 dans une conformation inactive, cette inhibition conformationnelle étant supprimée par la reconnaissance au nucléosome (Hauk et al. 2010). Ce mécanisme d'auto-inhibition se retrouve également dans la sous-famille de remodeleur ISWI, où le domaine AutoN, vient bloquer la sous-unité ATPasique en conformation inactive, en absence de liaison au nucléosome.

En 2017, il a été mis en évidence que ce macrodomaine joue un rôle auto-inhibiteur pour CHD1L, en interagissant avec la partie N-terminale (tête ATPase), comme le montre la Figure 70 (Lehmann et al. 2017) (Hari R. Singh et al. 2017).

Des études ont identifié le tri-ADPribose comme ligand minimal agissant comme un puissant effecteur allostérique et étant capable de perturber l'interaction entre le domaine ATPase et le macrodomaine. Cela entraîne alors un changement conformationnel et l'activation du remodeleur CHD1L (Figure 70) (Hari R. Singh et al. 2017).

Ainsi, seule la liaison au macrodomaine de tri-ADPribose ou d'un substrat avec une tri- ou poly-ADP-ribosylation, tel que PARP1-PARYlé (*PARylated-PARP1*) permet de lever cette inhibition (Gottschalk et al. 2012) (Hari R. Singh et al. 2017). Les bases structurales de cette inhibition restent, à ce jour, inconnues.

CHD1L possède donc une activité de remodelage de la chromatine poly(ADP-ribose) ou (PAR)-dépendante, qui semble faciliter les réactions de réparation de l'ADN. Le remodelage du nucléosome par CHD1L dépendrait ainsi de la formation d'un complexe intermédiaire entre le macrodomaine de CHD1L, la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP1) modifiée par une poly-ADP ribosylation et le nucléosome (Lehmann et al. 2017).

Ainsi, la reconnaissance du PAR conduit à la fois à la formation d'un complexe PARP1-poly(ADP-ribosylé)/CHD1L/nucléosome et à une augmentation de l'activité de remodelage de la chromatine par CHD1L (Ahel et al. 2009) (Gottschalk et al. 2012).

En accord, CHD1L dépourvu du macrodomaine décompacte la chromatine sans nécessiter l'activation de PARP1-PARylé (Hari R. Singh et al. 2017).

Tout comme pour CHD1, qui a été décrit dans la partie introductive, il a été montré que CHD1L a besoin de la queue de l'histone H4 pour son activité. Cette interaction sert certainement à son amarrage au nucléosome, une caractéristique importante pour son activité de translocation et de remodelage de la chromatine (Humphrey, Downs, et Chambers 2016).

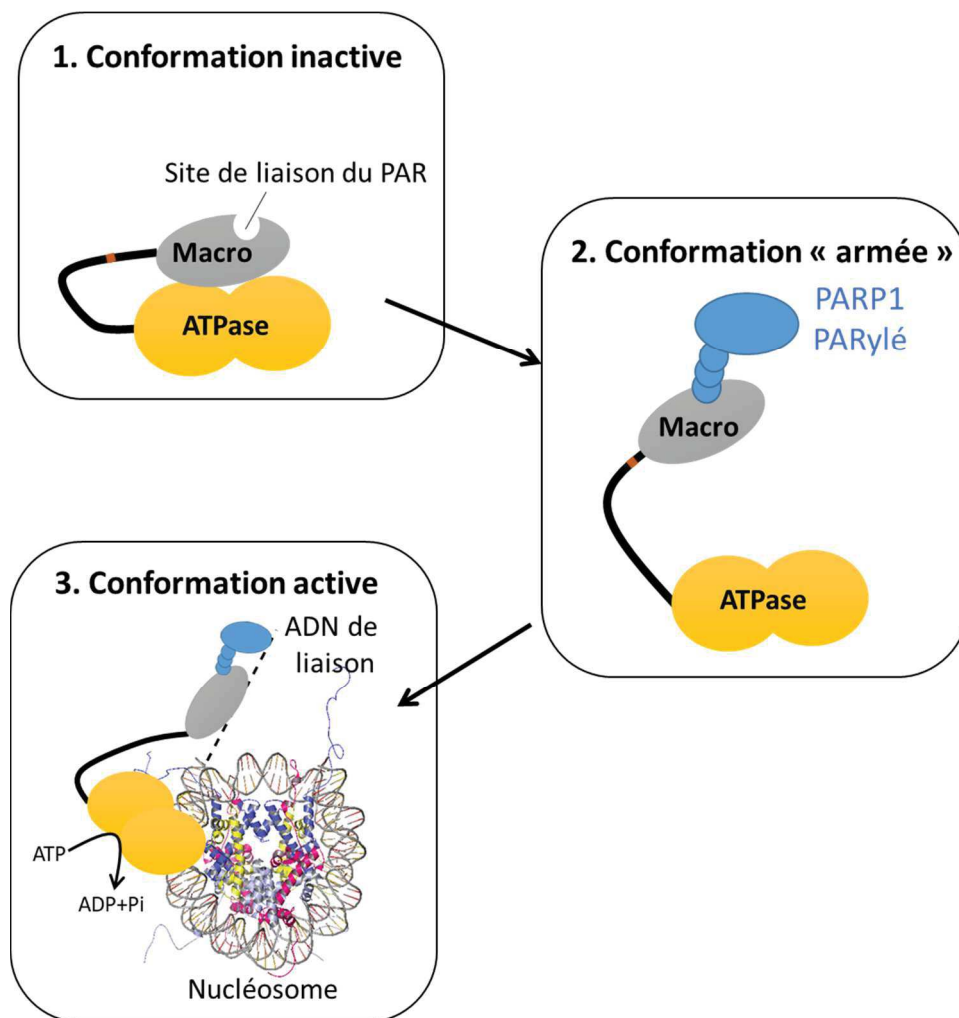


Figure 70 : Modèle d'activation de CHD1L

a. Macrodomaine

Les macrodomaines sont des modules de liaison à l'ADP-ribose, noté ADPr. Certains macrodomaines reconnaissent préférentiellement le poly-ADP-ribose (PAR), comme ligand (Karras et al. 2005).

Les macrodomaines sont présents des procaryotes aux eucaryotes et le nombre de protéines contenant des macrodomaines augmente en fonction de la complexité de l'organisme. Ainsi chez l'Homme, il existe au moins 12 protéines différentes contenant des macrodomaines et qui ont été classifiées en 4 groupes : MacroD-type, MacroH2A-like, ALC1(*CHD1L*)-like et PARG-like (D. Chen et al. 2011) (Rack, Perina, et Ahel 2016).

Bien qu'il n'existe pas à ce jour de données structurales sur le macrodomaine de CHD1L (ni sur CHD1L en général), il existe des données sur différentes familles de macrodomaines. Les macrodomaines ont une structure conservée formant un domaine globulaire en sandwich $\alpha/\beta/\alpha$, composé de 6 feuillets bêta centraux mélangés, flanqués par 5 hélices alpha, comme présenté sur la Figure 71-A.

La liaison de l'ADPr ou du PAR se fait grâce à une poche de liaison sur le sommet du domaine. L'interaction entre le ligand et le macrodomaine est stabilisée par plusieurs interactions conservées dans la poche de liaison des différentes familles (Figure 71 - B, C, D et E) :

- L'adénosine permet une interaction π - π avec un résidu aromatique conservé et est également coordonnée par un résidu aspartate.
- Le centre de la poche stabilise la liaison de l'ADPr par plusieurs contacts chaîne latérale/chaîne principale avec le pyrophosphate de l'ADPr, qui induisent une conformation fermée du macrodomaine.
- L'ADPr est logé entre deux boucles (notés L1 et L2). Bien que les deux boucles contribuent à la spécificité du substrat, la boucle 1 abrite les résidus catalytiques de la plupart des macrodomaines présentant une activité d'hydrolase (c'est pourquoi elle a également été appelée boucle catalytique). La boucle 2 assure une coordination supplémentaire du pyrophosphate, appelée boucle de liaison du diphosphate (Rack, Perina, et Ahel 2016).

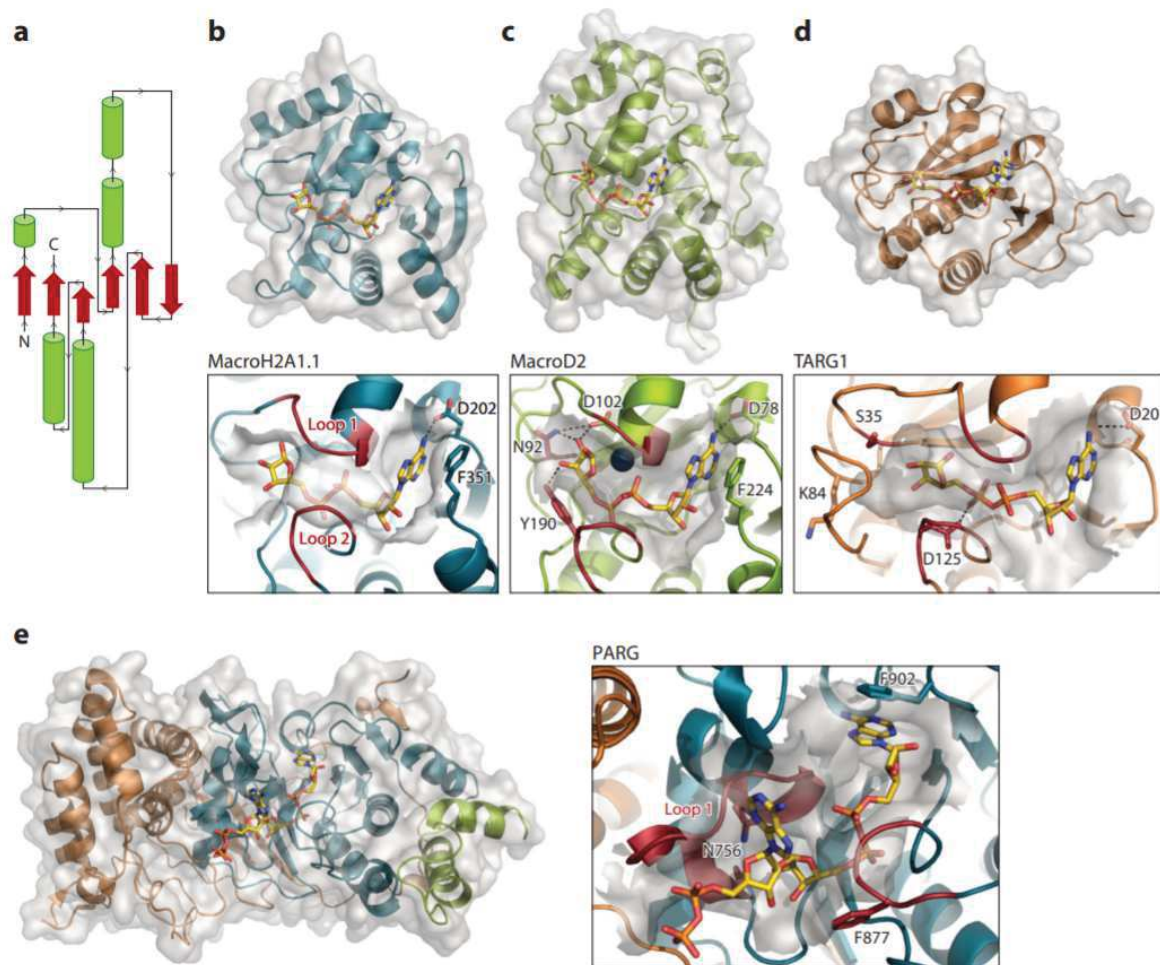


Figure 71 : Architecture et structures de macrodomaines

A. Représentation schématique des macrodomaines

B. Macrodomaine de macroH2A lié à l'ADPr

C. Macrodomaine de MacroD2 lié à l'ADPr

D. Macrodomaine de TARG lié à l'intermédiaire lysyl-ADPr

E. Structure de PARG, le macrodomaine est coloré en bleu, lié au di-ADPr

Source : (Rack, Perina, et Ahel 2016).

Les classes PARG-like et MacroD-like, sont des hydrolases catalysant la dégradation et l'enlèvement de l'ADPr.

Ainsi, les macrodomaines sont des modules de liaison de l'ADPr ou du PAR de haute affinité, qui peuvent en fonction des classes avoir une fonction d'hydrolyse. CHD1L peut lier le PAR mais n'est pas impliqué dans son hydrolyse.

Une différence majeure du macrodomaine de CHD1L avec d'autres macrodomaines est cependant que CHD1L lie préférentiellement le tri-(ADP-ribose), son affinité étant de 10 nM. En revanche, l'affinité de CHD1L pour le di-ADP-ribose est beaucoup plus faible de l'ordre de

3.7 μM (Hari R. Singh et al. 2017). Les bases moléculaires du mode d'interaction entre le macrodomaine de CHD1L et l'ADPr restent à ce jour inconnues.

L'activité de remodelage de CHD1L dépend donc du macrodomaine, qui permet un mécanisme d'activation allostérique unique, régulé par une PTM (la poly ADPrbosylation).

b. PARP-1

CHD1L nécessite pour son activité de remodelage l'activité de l'enzyme PARP1, qui est dépendante du NAD^+ pour catalyser l'ADPr et le PAR (Gottschalk et al. 2012). PARP1 avec PARP2 sont les seules enzymes à pouvoir catalyser le PAR (D'Amours et al. 1999).

PARP-1 est une enzyme multi-domaine qui catalyse la plupart des PARylations des protéines dans les cellules. PARP-1 est constituée d'une région N-terminale qui comprend trois domaines en doigt de zinc (Zn1, Zn2 et Zn3), d'un domaine C-terminal de BRCA1 (BRCT), d'un domaine riche en tryptophane, glycine et arginine (WGR) et d'un domaine catalytique C-terminal (CAT), qui est responsable de la PARylation des protéines (Barkauskaite, Jankevicius, et Ahel 2015).

De nombreuses études ont montré que la liaison d'ADN ou d'ADN nucléosomal par les domaines de la région N-terminale de PARP-1 active allostériquement le CAT pour la synthèse de PAR (Ooi et al. 2020).

Le domaine PARP1 CAT, essentiel pour la synthèse de PAR, est également nécessaire pour le remodelage des nucléosomes par CHD1L. Cependant, ce domaine ne serait pas suffisant et ce remodelage impliquerait également les domaines Zn1, Zn3 et WGR de PAR1 (Ooi et al. 2020).

4. Rôles de CHD1L

CHD1L a de nombreux rôles et est notamment impliqué dans la réparation des dommages causés à l'ADN, la régulation des gènes, la prolifération cellulaire, le développement embryonnaire et dans l'apoptose (Ahel et al. 2009) (L. Chen et al. 2009) (L. Chen et al. 2010) (Ji et al. 2013) (Snider et al. 2013).

a. Réparation de l'ADN

Il a été montré que la délétion ou la surexpression de CHD1L entraîne une sensibilité aux agents endommageants l'ADN, proposant un rôle pour CHD1L dans la régulation de la réparation de l'ADN (Ahel et al. 2009).

La relaxation de la chromatine est l'une des premières réponses cellulaires aux dommages causés à l'ADN. Par des techniques d'imagerie cellulaire, et en générant des lésions par micro-irradiation laser, il a été montré que la relaxation locale de la chromatine aux sites de dommages de l'ADN est régulée par l'activité enzymatique PARP1. De plus, CHD1L a été identifié comme un acteur important dans la cinétique rapide de la relaxation de la chromatine dépendante de PARP1, du NAD⁺ et de l'ATP après une lésion de l'ADN *in vivo* (Sellou et al. 2016).

Il existe plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN. Ainsi, pour une cassure simple brin, la réparation peut se faire par excision de base (BER) ou par excision de nucléotides (NER). Pour une cassure double brin, la réparation peut également se faire par deux mécanismes, la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) ou par recombinaison homologue (HR). Il n'est donc pas surprenant que CHD1L semble jouer un rôle dans la majorité des mécanismes de réparation de l'ADN. Ainsi, CHD1L est impliqué dans la NER, via PARP1 et la stabilisation de la protéine DDB2 (Pines et al. 2012). De plus, l'immunoprécipitation de CHD1L a révélé des interactions avec les protéines Ku70/80 et DNA-PK et d'autres facteurs nécessaires au NHEJ, suggérant sa fonction dans le NHEJ (Humphrey, Downs, et Chambers 2016). Plus récemment encore, CHD1L a été montré comme étant impliqué dans le processus de réparation BER (Tsuda et al. 2017).

Ainsi, CHD1L possède grâce à son architecture modulaire, une activité de remodelage de la chromatine dépendant du PAR et de PARP1, qui facilite les réactions de réparation de l'ADN dans un contexte chromatinien.

b. Cancer

CHD1L/ALC1 a tout d'abord été identifié comme un oncogène comme son nom « Amplified in Liver Cancer » l'indique. Ainsi, le remodeleur CHD1L est une protéine d'intérêt clinique qui est amplifiée dans plus de 50 % des carcinomes hépatocellulaires (HCC) (Cheng, Su, et Xu 2013) (L. Chen et al. 2010) (J. Wang et al. 2015).

Il a été montré qu'une expression accrue de CHD1L dans les HCC favorise la migration des cellules tumorales et la formation de métastases en augmentant la motilité cellulaire et en induisant une transition épithélio-mésenchymateuse (L. Chen et al. 2010).

De plus, la surexpression de CHD1L dans les HCC pourrait soutenir la survie des cellules tumorales en empêchant l'apoptose médiée par Nur77 (L. Chen et al. 2009).

La surexpression de CHD1L a ensuite été caractérisée dans de nombreux autres cancers comme les adénocarcinomes pulmonaires (L.-R. He et al. 2015), les carcinomes ovariens (W.-P. He et al. 2012), les carcinomes nasopharyngés (Su et al. 2014) et les carcinomes colorectaux (Ji et al. 2013). CHD1L favorise également l'invasion et la métastase des cellules dans le cadre du cancer du sein (Mu et al. 2015).

Pour finir, des mutations de CHD1L ont été observées dans des gliomes (tumeurs cérébrales). Ces mutations faux-sens affectent des résidus du macrodomaine, et semblent réduire l'interaction entre le macrodomaine et la tête ATPase et ainsi activer le remodelage de la chromatine (Hari R. Singh et al. 2017).

5. Développement

CHD1L a aussi été montré comme important dans le développement. En effet, CHD1L est essentiel dans le renouvellement et le développement des cellules souches (B.-H. Jiang et al. 2015) (S.-S. Liu et al. 2016) (Snider et al. 2013).

Des mutations de CHD1L, impactant notamment le macrodomaine, ont été identifiées chez des personnes présentant des anomalies congénitales des reins et des voies urinaires (Hwang et al. 2014) (Brockschmidt et al. 2012) (Haldeman-Englert et Jewett 2011) (C.-P. Chen et al. 2019).

E. Objectifs de thèse

L'ensemble des résultats générés par nos collaboratrices suggèrent que le gène *CHD1L* est un contributeur majeur aux phénotypes neuro-anatomiques associés au CNV en position 1q21.1 incluant des atteintes au niveau du volume crânien et de la stature.

De plus, l'étude de la pathogénicité d'un variant homozygote dans *CHD1L*, nous indique qu'une perte de fonction partielle de ce gène serait également responsable des troubles du spectre autistique identifiés chez l'individu porteur de ce variant.

Les expériences de complémentations *in vivo* chez le poisson zèbre menées par nos collaboratrices, ont permis de montrer l'implication de la forme entière de *CHD1L* mais également d'un isoforme plus court pour lequel le premier lobe du domaine ATPase est absent, dans les troubles neuro-anatomiques.

Cet isoforme court de *CHD1L* est très probablement incapable de fixer l'ATP et d'effectuer une fonction de remodelage canonique. De ce fait, il est possible que *CHD1L* puisse avoir une fonction différente de celle de remodeleur dans ce processus.

Nous avons donc voulu déterminer comment *CHD1L* et son isoforme court qui théoriquement est un remodeleur non actif peuvent conduire à des phénotypes identiques.

Mon objectif de thèse a donc été de comprendre comment *CHD1L* et son isoforme court contribuent à ces phénotypes neuro-anatomiques, au niveau moléculaire, en réalisant des études biochimiques, biophysiques et structurales des deux isoformes.

Cette étude est de première importance car il n'existe à ce jour aucune donnée structurale sur le remodeleur *CHD1L*.

Pour ce faire, j'ai étudié :

(i) les isoformes long et court de *CHD1L* dans le but d'obtenir des informations structurales par une approche cristallographique. L'étude des protéines entières étant complexe, j'ai également étudié les domaines séparés (tête ATPase et macrodomaine).

(ii) le mécanisme d'auto-inhibition de la protéine *CHD1L* et de son implication sur la liaison au nucléosome. Je me suis également intéressée à la présence potentielle de ce mécanisme dans l'isoforme court.

(iii) l'impact d'une mutation clinique R392H sur les isoformes long et court, ainsi que son effet potentiel sur le mécanisme d'auto-inhibition.

II. Résultats

A. Objectifs 1 : Obtention d'information structurale

1. Alignement de séquences et découpage

Sur la base d'alignements de séquence et de la littérature, dont notamment des expériences de protéolyse ménagée (Hari R. Singh et al. 2017), CHD1L a été découpé en plusieurs fragments décrits dans la Figure 72.

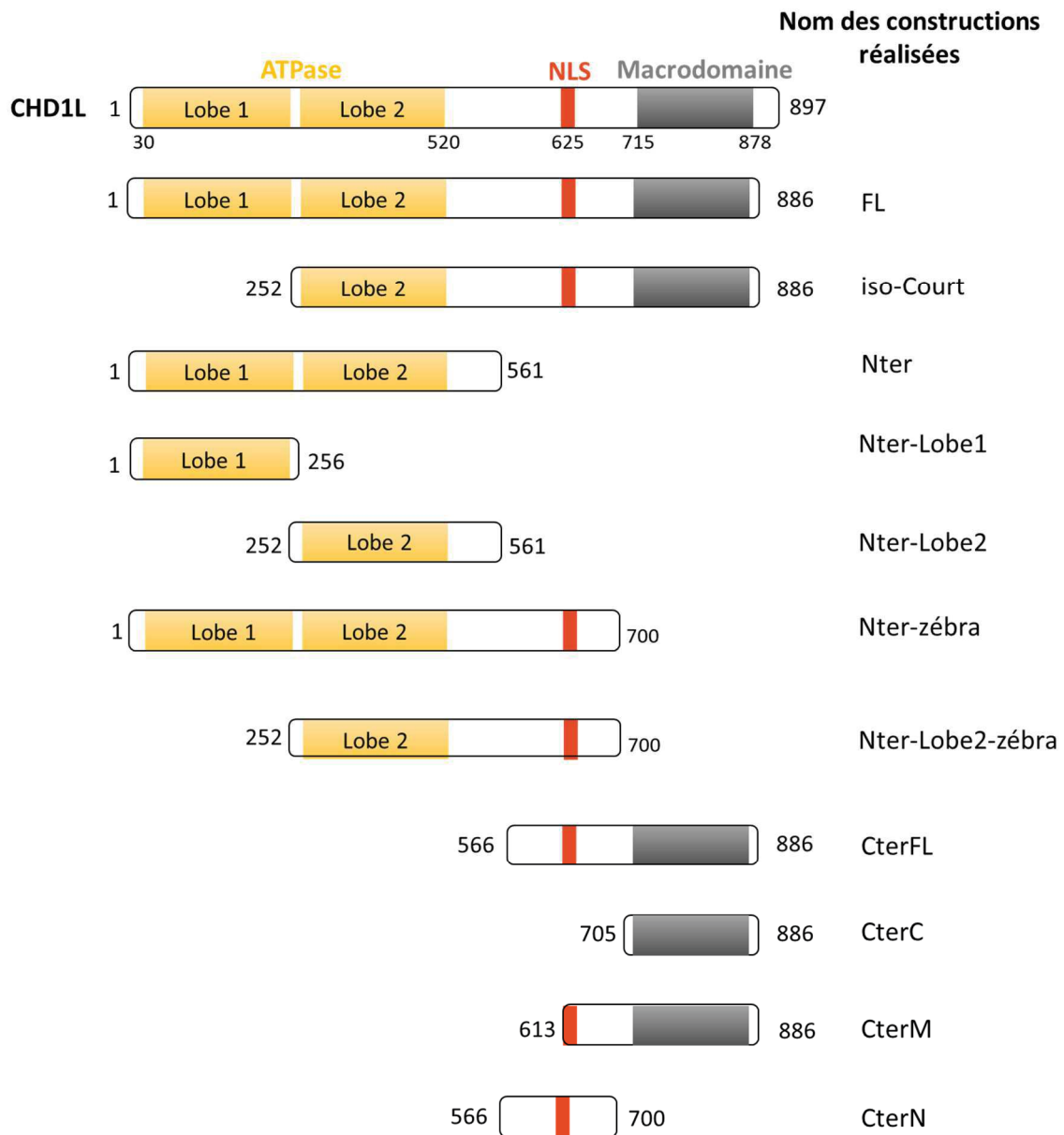


Figure 72 : Les différentes constructions de CHD1L réalisées pour cette étude
Zébra : *zébrafish*, ces constructions ont uniquement été utilisées pas nos collaboratrices.

Ce découpage en domaines et sous-domaines a été réalisé afin de faciliter les études structurales, car des sous-domaines sont souvent moins complexes à étudier que des protéines entières et l'absence de boucles flexibles permet de favoriser la cristallisation.

Il est important de noter que plusieurs fragments ont été réalisés dans un second temps, suite aux premiers résultats obtenus, ce qui explique que plusieurs de ces constructions ne sont pas exploitées au début de cette section de résultats.

Ces différentes constructions ont ensuite été clonées dans divers vecteurs d'expression, incluant les vecteurs pNEA-His6, His10-TRX, His10-SUMO, GST et natif, ainsi que pNCS natif. Les constructions encodées ont été caractérisées par minitests d'expression et de purification.

2. Minitests des différentes constructions

Pour les minitests, plusieurs conditions ont été testées (criblage de milieu, températures, temps d'expression, tampons avec différents pH et salinités,..). Les gels SDS-PAGEs présentés correspondent aux meilleurs résultats obtenus. Pour les différents domaines, les résultats seront présentés de la même façon, incluant un tableau final résumant le potentiel de chaque construction à pouvoir être utilisée pour une purification à plus grande échelle.

a. Constructions longues de CHD1L (équivalent des isoformes long et court)

Les constructions longues de CHD1L correspondent aux constructions CHD1L-FL (1-889) et CHD1L-isoCourt (252-886), qui sont les équivalents des isoformes long et court respectivement. La construction « FL » correspond quasiment à la protéine entière, seule une petite région C-terminale, probablement désorganisée, a été retirée. La construction « isoCourt » représente l'équivalent de l'isoforme court de CHD1L. Cette construction ne contient donc pas le 1^{er} lobe de la tête ATPase. Il est cependant à noter que cette construction ne tient pas compte des 44 premiers acides aminés qui sont conservés dans l'isoforme court de CHD1L (Figure 69).

Ces expériences ont été réalisées selon les conditions décrites dans la Figure 73-1. Des expériences de minitests avaient également été réalisées avec une température de 25°C, mais donnaient des résultats moins satisfaisants comparés à ceux réalisés à 18°C.

Minitests des constructions les plus longues de CHD1L

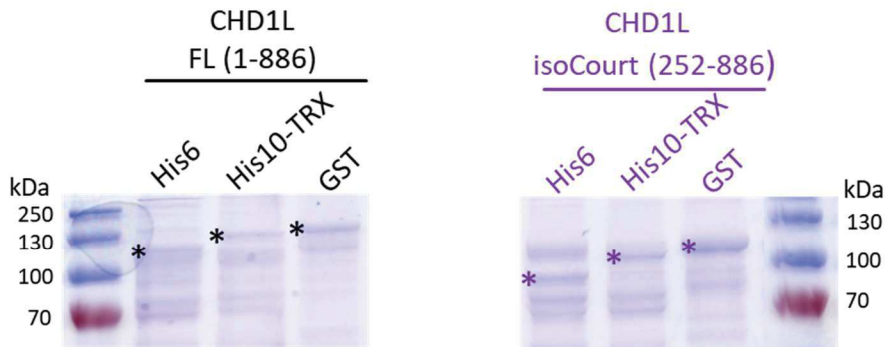
1 Conditions expérimentales retenues

Expression : Cellules BL21(DE3) - Milieu A1.TB - 4h à 37°C puis 14h à 16°C

Tampon : 10 mM Tris HCl pH 8 + 500 mM NaCl

Elution : Analyse directe de la résine d'affinité

2 Gel SDS-PAGE des minitests – échantillons finaux purifiés



3 Tailles théoriques et analyse de potentiel des différentes constructions

Etiquette en Nter / Construction	His6	His10-TRX	GST
CHD1L FL	102 kDa	115 kDa	127 kDa
CHD1L isoCourt	74 kDa	86 kDa	98 kDa

Légende du niveau d'expression final	Excellent à bon	large scale 1L à 6L
	Moyen à faible	large scale 1L envisageable
	Absent à très faible	large scale inenvisageable

Figure 73 : Résultats des minitests pour les constructions longues de CHD1L

1. Conditions expérimentales retenues pour l'expression et la purification à petite échelle

2. Gels dénaturants SDS-PAGE 12% des échantillons finaux purifiés après minitests

Un astérisque est présent lorsqu'une bande protéique est visible à la taille attendue

3. Tableau représentant les tailles théoriques des différentes constructions et analysant/résumant leurs potentiels à pouvoir être utilisées à plus grande échelle

Pour ces deux constructions, CHD1-FL (1-889) et CHD1L-isoCourt (252-886), des résultats similaires ont été obtenus pour toutes les étiquettes testées (Figure 73 - 2 et 3). L'expression et la solubilité finale des différentes constructions purifiées sont très faibles. En effet, les

bandes correspondant aux protéines d'intérêts, signalées d'un astérisque, sont peu visibles sur les gels SDS-PAGE. Nous remarquons également que la taille de ces deux constructions, est légèrement sur-estimée sur les gels SDS-PAGE.

La construction GST-CHD1L_isoCourt donne un résultat légèrement meilleur, mais semble tout de même trop faible pour envisager de passer à plus grande échelle.

Ainsi, les constructions équivalentes aux isoformes long et court de CHD1L n'ont pas pu être utilisées pour une purification à plus grande échelle.

b. Construction N-terminale de CHD1L (tête ATPase entière)

La construction utilisée dans cette partie est la construction N-terminale de CHD1L (1-561), qui contient les deux lobes de la tête ATPase. Les résultats et les conditions expérimentales dans lesquelles ont été réalisées les minitests sont présentés dans la Figure 74.

Plusieurs étiquettes en position amino-terminale ont été testées pour CHD1L Nter (1-561) ; His6, His10-TRX, His10-SUMO, GST et une construction native sans étiquette servant de contrôle pour la liaison aspécifique à la résine.

Pour tous ces essais, des résultats similaires ont été obtenus. En effet, ici encore l'expression et la solubilité finale des différentes constructions purifiées sont très faibles, avec des bandes correspondant aux protéines d'intérêts qui sont très peu visibles sur le gel SDS-PAGE.

Ainsi, le fragment CHD1L Nter n'a pas pu être utilisé pour une purification à plus grande échelle.

Minitests des constructions N-terminale (tête ATPases) de CHD1L

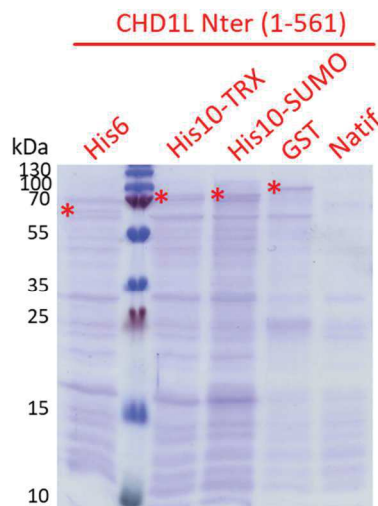
1 Conditions expérimentales retenues

Expression : Cellules BL21(DE3) - Milieu AI.TB - 6h à 37°C puis 14h à 25°C

Tampon : 10 mM Tris HCl pH 7,5 + 500 mM NaCl

Elution : Analyse directe de la résine d'affinité

2 Gel SDS-PAGE des minitests – échantillons finaux purifiés



3 Tailles théoriques et analyse de potentiel des différentes constructions

Etiquette en Constructions	Nter				
	His6	His10- TRX	His10- SUMO	GST	Natif
CHD1L Nter	66 kDa	78 kDa	76 kDa	90 kDa	63 kDa

Légende du niveau
d'expression final

Excellent à bon	large scale 1L à 6L
Moyen à faible	large scale 1L envisageable
Absent à très faible	large scale inenvisageable

Figure 74 : Résultats des minitests pour la partie N-terminale de CHD1L

1. Conditions expérimentales retenues pour l'expression et la purification à petite échelle

2. Gels dénaturants SDS-PAGE 12% des échantillons finaux purifiés après minitests

Un astérisque est présent lorsqu'une bande protéique est visible à la taille attendue

3. Tableau représentant les tailles théoriques des différentes constructions et

analysant/résumant leurs potentiels à pouvoir être utilisées à plus grande échelle

c. Constructions de la partie C-terminale de CHD1L

Dans cette partie, trois constructions de la partie carboxy-terminale de CHD1L ont été utilisées :

- CHD1L CterFL (566-886), étant la construction la plus longue incluant une grande zone de la région charnière, ainsi que le macrodomaine,
- CHD1L CterN (566-700), correspondant à la zone charnière seule contenant le signal de localisation nucléaire,
- CHD1L CterC (705-886), correspondant uniquement au macrodomaine.

Pour ces trois domaines, différentes constructions avec différentes étiquettes (His6, His10-TRX, His10-SUMO, GTS et un contrôle natif) ont été réalisées. Les résultats des minitestes et leurs conditions expérimentales sont présentés dans la Figure 75.

Pour la construction CHD1L CterFL, nous voyons que trois des quatre étiquettes testées donnent des résultats similaires. Il s'agit des constructions His10-TRX-CHD1L CterFL, His10-SUMO-CHD1L CterFL, et GST-CHD1L CterFL, où des bandes de faible intensité mais bien définies, correspondant aux protéines d'intérêts, sont visibles sur gel SDS-PAGE. Pour la construction avec l'étiquette His6, aucune bande n'est visible, montrant ainsi que cette construction n'est pas exprimée ou soluble.

Au vu de ces résultats, il a été envisagé d'effectuer une mise à l'échelle d'un litre pour les constructions His10-TRX-CHD1L CterFL, His10-SUMO-CHD1L CterFL et GST-CHD1L.

Concernant le domaine CHD1L CterN, deux constructions His-TRX et GST ont une bonne expression et solubilité, formant ainsi une bande intense sur les gels SDS-PAGE. La purification de la construction His10-SUMO-CHD1L CterN permet l'obtention d'une bande d'intensité moyenne, indiquant alors une expression et une solubilité moyenne. Concernant la construction de His6-CHD1L CterN, sa purification permet l'obtention d'une bande de faible intensité, signifiant une expression et une solubilité faible.

Minitests des constructions C-terminale de CHD1L

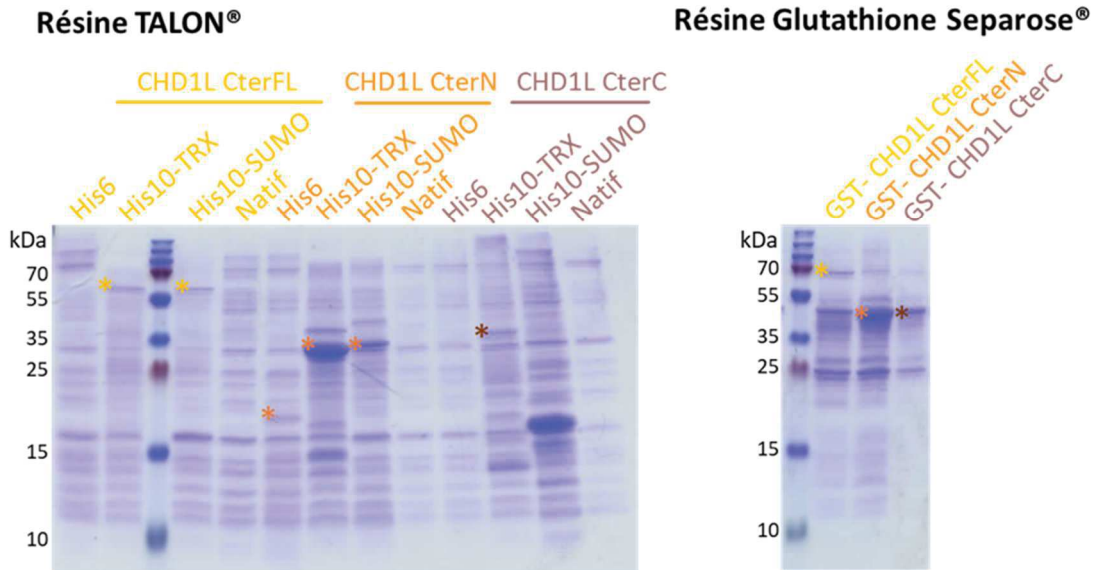
1 Conditions expérimentales retenues

Expression : Cellules BL21(DE3) - Milieu AI.TB - 4h à 37°C puis 14h à 25°C

Tampon : 10 mM Tris HCl pH 7,5 + 500 mM NaCl

Elution : Analyse directe de la résine d'affinité

2 Gel SDS-PAGE des minitests – échantillons finaux purifiés



3 Tailles théoriques et analyse de potentiel des différentes constructions

Constructions \ Etiquette en Nter	His6	His10-TRX	His10-SUMO	GST	Natif
	CHD1L Cter-FL	39 kDa	52 kDa	49 kDa	64 kDa
CHD1L Cter-N	19 kDa	31 kDa	28 kDa	43 kDa	16 kDa
CHD1L Cter-C	23 kDa	35 kDa	33 kDa	48 kDa	20 kDa

Légende du niveau d'expression final	Excellent à bon	large scale 1L à 6L
	Moyen à faible	large scale 1L envisageable
	Absent à très faible	large scale inenvisageable

Figure 75 : Résultats des minitests pour les parties C-terminale de CHD1L

1. Conditions expérimentales retenues pour l'expression et la purification à petite échelle

2. Gels dénaturants SDS-PAGE 12% des échantillons finaux purifiés après minitests

Un astérisque est présent lorsqu'une bande protéique est visible à la taille attendue

3. Tableau représentant les tailles théoriques des différentes constructions et analysant/résumant leurs potentiels à pouvoir être utilisées à plus grande échelle

Ainsi les quatre constructions de CHD1L CterN ont été testées à grande échelle en commençant par un volume de culture de 1L, partie décrite ultérieurement. En fonction de ces résultats, une mise à l'échelle de 6L a été envisagée notamment pour les constructions les plus prometteuses, His10-TRX et GST.

Pour le domaine CHD1L CterC, aucune bande n'est visible sur gel SDS PAGE pour les constructions His6-CHD1L CterC et His10-SUMO-CHD1L CterC, qui ne sont donc pas exprimées ou solubles. Les constructions His10-TRX et GST, ont quant à elles une faible et moyenne expression et solubilité finales respectives formant des bandes peu et moyennement intenses sur les gels SDS-PAGE.

Ainsi, pour CHD1L CterC, seules les constructions His-TRX et GST, ont été exploitées pour la suite.

En conclusion de ces minitests, seules des constructions de la partie C-terminale de CHD1L se sont avérées adaptées à la purification à plus grande échelle et ainsi aux potentielles études structurales. Ces expériences préliminaires ont cependant permis de mieux comprendre l'organisation de CHD1L et de mieux caractériser le comportement biochimique de ses différents domaines, ce qui a par la suite facilité nos analyses biochimiques et biophysiques de ce remodeleur. Le récapitulatif des constructions sélectionnées pour la poursuite de mon étude sont données dans le prochain paragraphe.

3. Purification pilote - 1 L

Suite à nos minitests, nous avons purifié les constructions suivantes :

- Pour CHD1L CterFL (566-886) : His10-TRX-CHD1L Cter FL, His10-SUMO-CHD1L Cter FL et GST-CHD1L Cter FL
- Pour CHD1L CterN (566-700) : His6-CHD1L Cter N, His10-TRX-CHD1L Cter N, His10-SUMO-CHD1L Cter N et GST-CHD1L Cter N
- Pour CHD1L CterC (705-886) : His10-TRX-CHD1L Cter C et GST-CHD1L Cter C

Des conditions d'expressions identiques à celles des minitests ont été utilisées : cellules BL21(DE3), 1L de milieu AI.TB avec 4h de culture à 37°C puis une induction sur la nuit à 25°C.

Concernant la purification, deux tampons avec des conditions ioniques différentes ont été utilisés soit 300 mM NaCl ou 500 mM NaCl en suivant le code couleur qui a été reporté sur les

différentes constructions. Ces tampons ont été sélectionnés en fonction des résultats de minitests qui n'ont pas tous été présentés dans la section précédente.

La purification a été faite en deux étapes : tout d'abord une purification d'affinité puis une étape de gel filtration sur colonne analytique S200 10/300 GL. Les étiquettes n'ont pas été clivées car l'objectif de ces purifications, à partir de 1L de culture, était de voir si les résultats obtenus en minitests étaient reproductibles à plus grande échelle. Cela nous a permis de voir quelles constructions étaient exploitables pour une mise à l'échelle de 6L et permettaient l'obtention d'une quantité suffisante de protéine pour des essais de cristallisation.

L'intégralité des tampons utilisés pour ces purifications est présentée dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Tampons de purification

Étiquettes	Résine	Tampon de lyse	Tampon de lavage	Tampon d'élution	Tampon de gel filtration
His	TALON®	10 mM Tris pH7.5 + 300 ou 500 mM NaCl	Tampon de lyse + 10 mM Imidazole	Tampon de lyse + 250 mM Imidazole	Tampon de lyse + 0.5 mM TCEP
GST	Glutathione Separose®	10 mM Tris pH7.5 + 500 mM NaCl	Tampon de lyse	Tampon de lyse + 15 mM Glutathion réduit	Tampon de lyse + 0.5 mM TCEP

a. CHD1L CterC (705-886)

A l'échelle d'expression de 1L, les deux constructions testées, His10-TRX-CHD1L CterC et GST-CHD1L CterC, sont exprimées mais sont majoritairement insolubles, comme le montre la Figure 76. En effet, les protéines d'intérêts sont visibles dans l'extrait total, ainsi que dans la fraction non soluble, mais sont très peu visibles dans la partie soluble. Le peu de protéine soluble semble largement dégradée, comme illustré dans les étapes d'élution et de gel filtration.

His10-TRX-CHD1L CterC et GST-CHD1L CterC sont donc majoritairement insolubles dans les conditions testées. Je n'ai donc pas poursuivi mes travaux sur ces constructions.

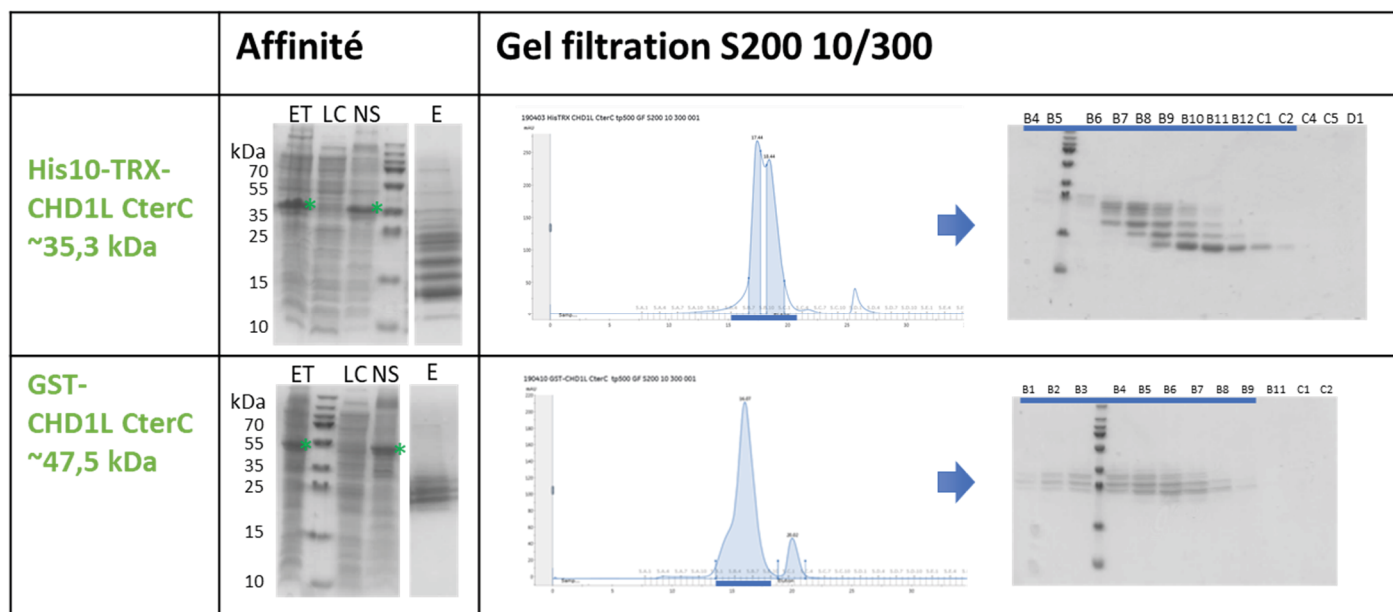


Figure 76 : Résultats des purifications (1L) pour les constructions sélectionnées du domaine CterC de CHD1L

Gels SDS PAGE 15% et chromatogrammes de purification

ET : extrait total, LC : lysat clarifiée (fraction soluble), NS : fraction non soluble, E : élution

b. CHD1L CterFL (566-886)

Les résultats des purifications pilote d'un litre pour les différentes constructions de CHD1L CterFL sont présentés dans la Figure 77.

Les deux constructions His10-TRX-CHD1L CterFL et His10-SUMO-CHD1L CterFL semblent d'une part peu exprimées et d'autre part fortement dégradées lors des étapes de purification.

Les bandes correspondant à ces protéines entières sont à peine visibles après l'étape d'élution. Lors de la gel filtration, seules des bandes correspondant à la dégradation des protéines, et non aux protéines entières, sont visibles.

Ces deux constructions ne sont donc pas assez exprimées et stables pour entreprendre une expression et purification à plus grande échelle ainsi que des études structurales.

Par contre, la construction GST-CHD1L CterFL fournit de loin les meilleurs résultats pour ce domaine. La protéine est bien visible après l'étape d'élution, on remarque cependant qu'elle semble se dégrader. L'étape de filtration sur gel confirme cette dégradation, qui n'est pas séparable de la protéine entière. La quantité de protéine présente après ces deux étapes de

purification paraît néanmoins correcte, avec un rendement de 1.2 mg/L. Ce rendement est toutefois surestimé car il a été réalisé en utilisant l'outil d'intégration de pic sur l'ÄKTA, pic qui contient également de la protéine dégradée.

La construction GST-CHD1L CterFL est la seule construction contenant le macrodomaine qui semble exprimée, soluble et purifiable. L'obtention d'informations structurales sur le macrodomaine étant de première importance, cette construction a donc été utilisée pour une mise à l'échelle de 6L, malgré la dégradation visible.

Nous voyons également grâce à ces purifications que toutes ces constructions de CHD1L-CterFL, même celles qui sont peu exprimées, semblent capables de lier des acides nucléiques, qui sont dissociés lors de la gel filtration. En effet, nous observons sur la fin de tous les chromatogrammes deux pics, mis en évidence par un trait orange (Figure 77) dans lesquels il n'y a pas de protéine visible (également signalé d'un trait orange sur les gels SDS-PAGE). Après vérification au nanodrop, ces fractions semblent bien contenir des acides nucléiques absorbant à 260 nm. Au vu de la fonction de CHD1L, ces acides nucléiques sont très probablement des ADNs. Cette information est en accord avec la littérature, où une construction identique à ma construction CterM (613-886), qui est un peu plus courte que la construction CterFL (566-886) utilisée ici, a été montrée comme étant capable de fixer l'ADN libre et nucléosomal (Lehmann et al. 2017).

Toutefois, du fait de la séparation entre l'ADN et les protéines lors de la gel filtration, cette interaction semble faible. Cela est également confirmé par le fait que cette fixation d'ADN est moins visible en utilisant le tampon à haute concentration ionique (500 mM NaCl). Cette forte concentration saline a tendance à neutraliser les charges de l'ADN empêchant ainsi son interaction avec le partenaire protéique.

CHD1L Cter FL est donc capable de lier faiblement de l'ADN, interaction qui se dissocie lors de la gel filtration, permettant ainsi de séparer la protéine des ADNs.

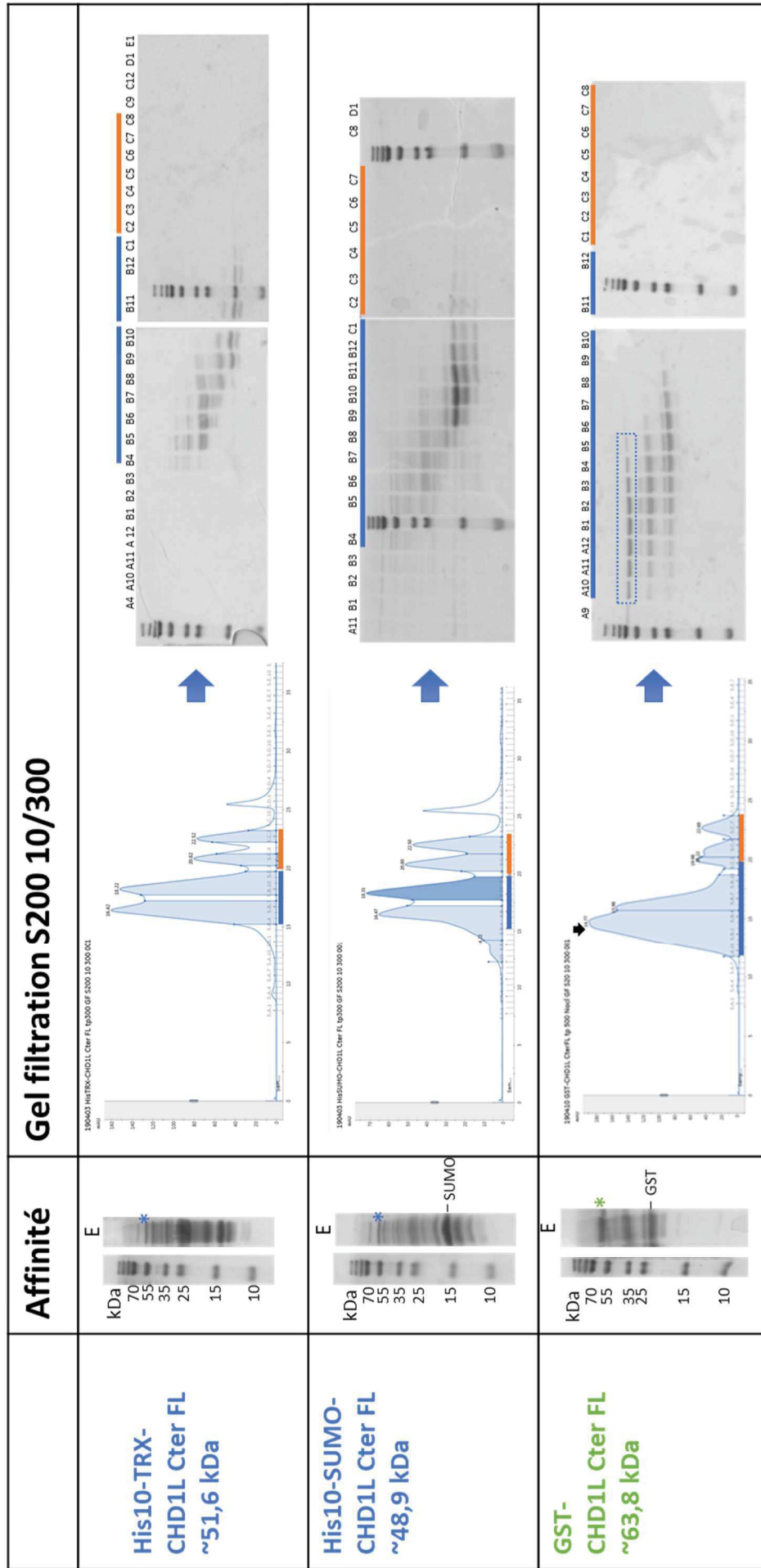


Figure 77 : Résultats des purifications (1L) pour les constructions sélectionnées du domaine CterFL de CHD1L
Gels SDS PAGE 15% et chromatogrammes de purification, E : élution

c. CHD1L CterN (566-700)

La Figure 78 nous montre que toutes les constructions de CHD1L CterN semblent être exprimées et solubles. Néanmoins, une construction sort du lot. En effet, la construction GST-CHD1L CterN semble être la plus adaptée aux études structurales, avec une bonne expression et un rendement final après gel filtration de 3 mg/L. Une légère dégradation est cependant visible.

La construction His10-TRX donne les seconds meilleurs résultats, mais présente une plus forte dégradation sur gel filtration, elle a donc été envisagée pour une mise à l'échelle dans un second temps.

Nous voyons également grâce à ces purifications que toutes les constructions de CHD1L-CterN, même celles qui sont moins exprimées (His6-CHD1L CterN et His10-SUMO-CHD1L CterN, semblent capables de lier de l'ADN, qui se dissocie lors de la gel filtration.

Comme précédemment, ces acides nucléiques ont été mis en évidence par un trait orange sur les chromatogrammes et les gels SDS-PAGE.

Il est alors possible que ce soit la région charnière CterN qui soit responsable de la liaison à l'ADN et non le macrodomaine.

En conclusion de ces purifications pilotes d'un litre, seules deux constructions ont été utilisées pour une mise à l'échelle de 6 litres. Il s'agit des constructions GST-CHD1L-CterFL et GST-CHD1L-CterN.

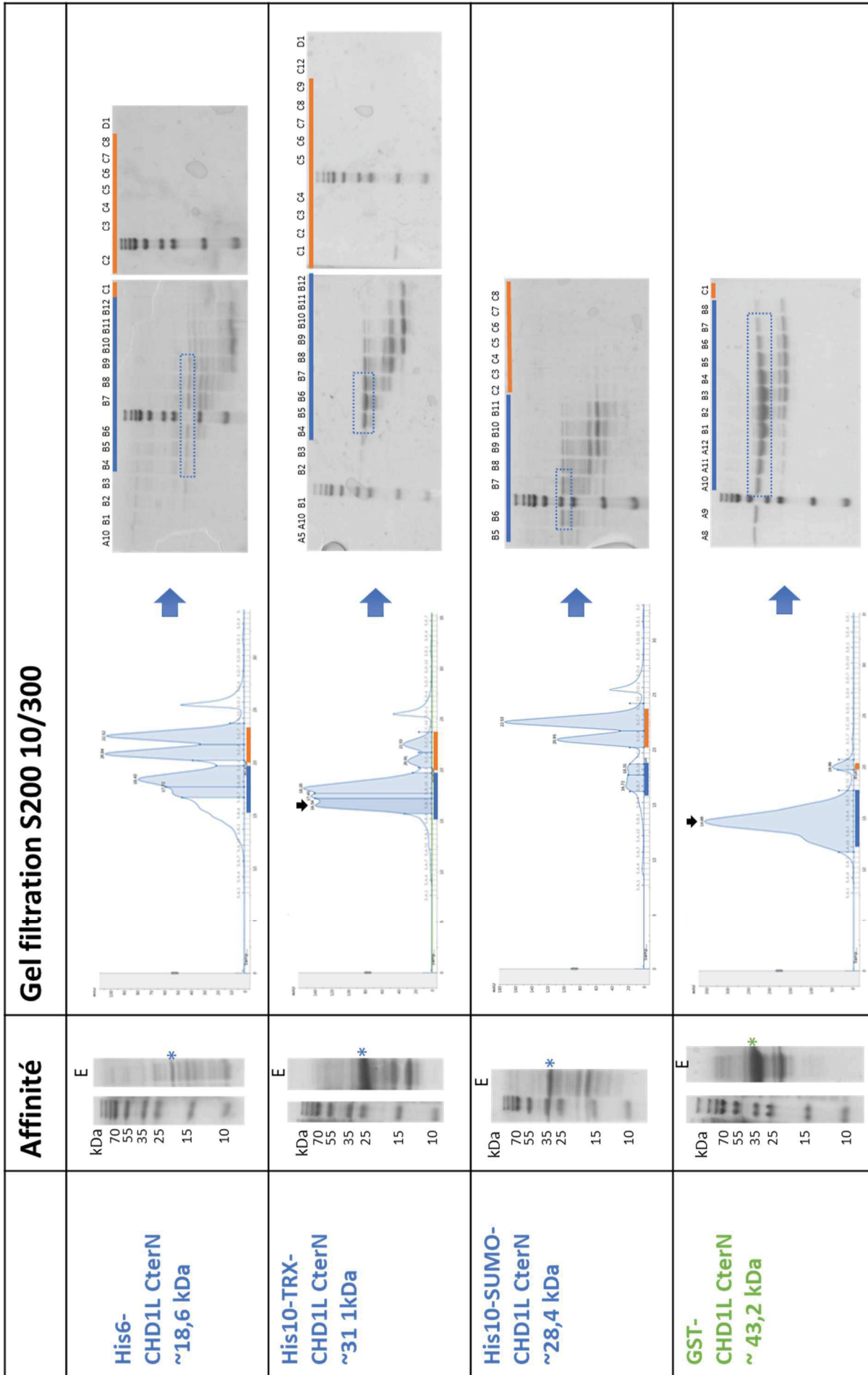


Figure 78 : Résultats des purifications (1L) pour les constructions sélectionnées du domaine CterN de CHD1L
Gels SDS PAGE 15% et chromatogrammes de purification, E : élution

4. Purification à grande échelle – 6L

a. GST-CHD1L CterN

La construction CterN n'est pas d'un intérêt premier d'un point de vue structural, vu qu'elle ne contient pas le macrodomaine. J'ai tout de même purifié cette construction à grand échelle en adaptant les conditions de purifications définies lors de la purification pilote à un plus grand volume (résultats non présentés). J'ai ainsi pu obtenir environ 300 µL d'une protéine à 10 mg/mL, soit un rendement de purification d'environ 0.5 mg/L, avec une bonne polydispersité obtenue par DLS d'environ 12%. Cette protéine paraît être stable et à un T_m de 55,8°C.

Après validation de la concentration par un rapide test de pré-cristallisation (mis à disposition sur la plateforme de génomique structurale de l'IGBMC), j'ai décidé d'effectuer plusieurs criblages commerciaux : PEGs (Anatrace), TOP96 (Anatrace) et Wizard (Rigaku Reagents), en utilisant comme mise en place 100 nL de protéine avec 100 nL de réservoir.

Cette tentative s'est avérée infructueuse, ne permettant pas l'obtention de cristaux malgré la présence de précipités encourageants. D'autres essais ont été réalisés en utilisant d'autres criblages commerciaux, dont Berkeley (MiTeGen), Classics (Jena Bioscience) et PACT (Jena Bioscience), ainsi qu'une concentration de protéine additionnelle, mais n'ont rien donné de concluant.

b. CHD1L CterFL

Je me suis ensuite concentrée sur la purification de la construction GST-CHD1L CterFL. Pour ce faire, j'ai produit 6 L de milieu AI.TB avec des conditions d'expressions identiques à celles faites précédemment. J'ai ensuite adapté et légèrement modifié les conditions de purifications définies lors de la purification pilote à un plus grand volume.

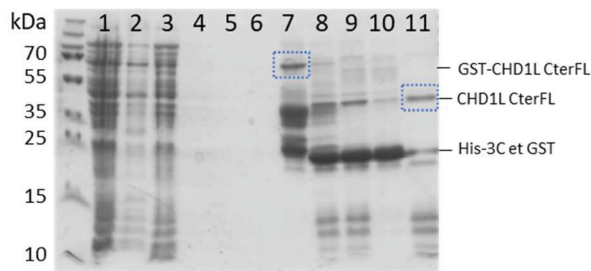
Cette purification a été réalisée en plusieurs étapes. J'ai tout d'abord ajouté à l'étape de lyse un cocktail d'inhibiteur de protéase (sigma aldrich) dans le but d'empêcher la dégradation de la protéine observée précédemment. J'ai ensuite effectué une étape d'affinité, mais sans élution au glutathion réduit. L'élution a été réalisée par l'ajout d'une protéase, la His-3C, permettant de cliver l'étiquette de la protéine, entraînant ainsi l'élution de la protéine clivée. Puis, une dernière étape de purification sur gel filtration a été réalisée. Cette étape permet d'une part de séparer la protéine clivée CHD1L CterFL, de la protéase His-3C et d'autre part d'éliminer les éventuels contaminants et dégradations. Lors de cette dernière étape, la concentration saline a été baissée afin d'avoir une concentration en sel plus favorable à la mise en place d'essais de cristallisation. Les différents tampons utilisés sont résumés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Tampons de purification pour le large scale de GST-CHD1L CterFL

	Résine	Tampon de lyse	Tampon de lavage	Clivage de l'étiquette (élution)	Tampon de gel filtration
GST-CHD1L CterFL	Glutathione Separose®	10 mM Tris pH7.5 + 500 mM NaCl +PIC	Tampon de lyse	Tampon de lyse + Protéase His-3C	10 mM Tris pH7.5 + 200 mM NaCl + 0.5 mM TCEP

Purification 6L GST-CHD1L CterFL

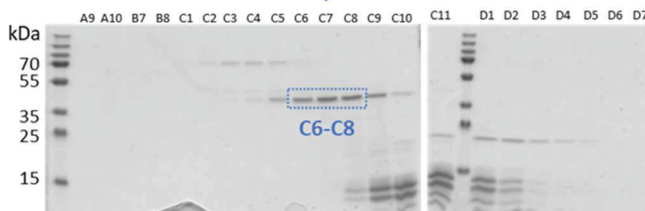
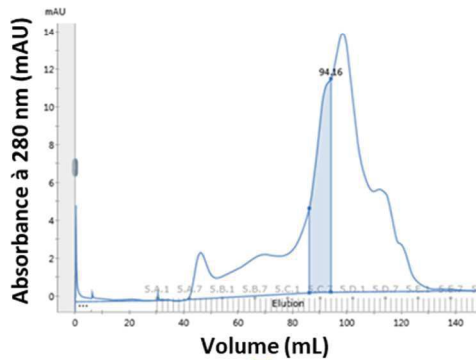
1 Affinité TALON



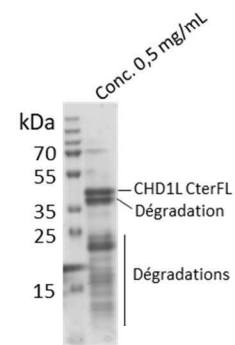
Légende:

1. Extraits totaux
2. Fraction non soluble
3. Fraction non retenue
4. Lavage 1
5. Lavage 2
6. Lavage 3
7. Résine GS après l'affinité (sans élution)
8. Résine GS + Protéase His-3C
9. Résine GS après coupure His-3C (O/N)
10. Reste sur résine
11. Surnageant contenant la protéine d'intérêt clivée et injectée sur GF

2 Gel filtration S200 16 600



3 Concentration et caractérisation



Rendement : 0,01 mg/L

- DLS : concentration insuffisante
- Nano DSF: Instable ($T_m \sim 41^\circ\text{C}$)
- Test de pré-cristallisation : absence de précipité

Figure 79 : Résultats de la purification (6L) de GST-CHD1L CterFL
Gel SDS-PAGEs et chromatogrammes

Les résultats de cette purification sont présentés dans la Figure 79. Comme vu dans la première section de cette figure, la protéine GST-CHD1L CterFL est bien obtenue après l'étape d'affinité sans élution (Figure 79-1, ligne 7). Cependant, nous observons toujours une forte dégradation de la protéine, et cela dès l'étape d'affinité.

Après clivage de l'étiquette GST par la protéase 3C, nous constatons que l'étiquette GST clivée a bien été retenue sur la résine d'affinité (Figure 79-1, ligne 10). De plus, nous voyons apparaître une bande correspondant à la protéine CHD1L CterFL sans étiquette, d'une taille de 37,3 kDa (Figure 79-1, ligne 11). Les contaminants restants sont à présent dans les bas poids moléculaires (10-15 kDa), correspondant aux dégradations de la protéine clivée, l'étiquette GST n'étant plus présente.

Sur le chromatogramme de la gel filtration, nous voyons ainsi un pic majoritaire avec un épaulement à son commencement. Ce pic correspond tout d'abord à la protéine CHD1L CterFL (épaulement), puis à la protéine CHD1L CterFL avec ses dégradations.

J'ai donc rassemblé les fractions correspondantes à CHD1L CterFL sans dégradation, à savoir les fractions C6 à C8, j'ai ensuite concentré la protéine à une concentration finale de 0.5 mg/mL avec un volume final de 150 μ L, soit un rendement final de 0.125 mg/L.

Ce rendement est inférieur à celui de la purification pilote. Cela peut être lié à plusieurs facteurs. Tout d'abord l'expression et la purification en *large scale* fournissent rarement des rendements équivalents aux purifications pilotes. De plus, j'ai ajouté une étape de clivage de l'étiquette GST qui peut également entraîner une perte protéique. Il est aussi très probable que la fusion GST joue un rôle solubilisateur sur la construction CHD1L CterFL, comme suggéré par le fait que d'autres fusions utilisées n'ont pas donné des résultats aussi probants qu'avec la GST. Pour finir, il se peut également que la concentration saline utilisée lors de la dernière étape de gel filtration ne soit pas optimale pour cette construction (à noter tout de même que cette concentration de sel semblait donner des résultats équivalents en minitest (données non fournies)).

Ainsi après l'étape de gel filtration, j'obtiens un profil intéressant pour CterFL sur gel SDS PAGE. Cependant, la dégradation semble très rapide lors de la concentration comme le montre le gel SDS PAGE 15% de l'échantillon concentré (Figure 79-3).

La polydispersité de cette protéine CHD1L CterFL n'a pas pu être estimée par DLS du fait de sa faible concentration. Néanmoins au vu du profil SDS-PAGE, il est envisageable de penser qu'elle est multimodale. Le profil nanoDSF montre que cette protéine ne paraît pas très stable. Il y a plusieurs points d'inflexions dans la courbe de la première dérivée et ainsi plusieurs T_m (un T_m de 41°C est observé dans le meilleur des cas). De plus, la concentration trop faible de

la protéine n'a pas permis de valider le test de pré-cristallisation. Pour toutes ces raisons, cette construction n'a donc pas pu être utilisée pour des essais de cristallisation.

Au vu de ces données, il a paru essentiel de stabiliser le fragment CterFL de CHD1L. Pour ce faire, je me suis intéressée au mécanisme d'auto-inhibition, en étudiant l'interaction entre le domaine CterFL avec le domaine ATPase décrit précédemment.

Cela m'a également permis de réévaluer la solubilité du domaine ATPase en présence du domaine CterFL de CHD1L, même si mes premiers résultats sur la protéine entière n'étaient pas véritablement satisfaisants.

B. Objectif 2 : Etude de l'interaction impliquée dans le mécanisme d'auto-inhibition entre la tête ATPase et le macrodomaine

1. Validation de l'interaction CHD1L CterFL + Nter par Minitests

Ces minitests ont eu pour objectif de vérifier l'obtention d'une interaction stable entre la partie CterFL (566-886) contenant le macrodomaine et la partie Nter (1-561) contenant la tête ATPase de CHD1L. Cette interaction a aussi eu pour but d'imiter le mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L, afin de pouvoir l'étudier. Nous espérons aussi que cette interaction permette de stabiliser le macrodomaine.

Pour ce faire, un seul des deux domaines (CterFL ou Nter) a été étiqueté. Si le second domaine interagit avec celui qui porte l'étiquette, il y aura alors co-purification et les bandes correspondants aux deux protéines seront visibles après les minitests sur le gel SDS-PAGE.

Dans la Figure 80 A, c'est tout d'abord la partie CterFL de CHD1L qui a été fusionnée à la GST en partie amino-terminale (construction utilisée précédemment). J'ai co-exprimé cette construction, pnEA-GST-CHD1L CterFL, avec la partie N-terminale native de CHD1L (pnCS-CHD1L Nter) dans différentes cellules BL21(DE3) ou BL21(DE3) pRARE2, comme montré dans les conditions d'expression (Figure 80 – 1.A.), puis j'ai réalisé les minitests.

Pour les deux souches testées, une interaction est bien visible entre la partie CterFL et la partie Nter. L'intensité des bandes sur gel SDS-PAGE 15% semble légèrement supérieure en utilisant les cellules BL21(DE3) pRARE2. Nous remarquons cependant que les bandes correspondant aux protéines d'intérêt GST-CHD1L CterFL et CHD1L Nter co-migrent à des poids moléculaires quasiment identiques, rendant leur identification difficile.

J'ai alors entrepris de tester l'interaction dans le sens inverse (Figure 80-B). J'ai utilisé une fusion GST sur la partie Nter (GST-CHD1L Nter) et co-exprimé avec la construction CHD1L CterFL native. J'ai également optimisé les conditions d'expression en utilisant notamment les cellules BL21(DE3) pRARE2 et une induction sur la nuit à 18°C.

Nous observons ainsi, sur gel SDS-PAGE, une interaction entre GST-CHD1L Nter et CHD1L CterFL natif. En effet, les bandes correspondant aux protéines d'intérêts, signalées par des astérisques, sont intenses et bien définies. Nous remarquons néanmoins une bande correspondant à de la GST libre provenant du clivage résiduel de l'étiquette GST par des protéases bactériennes.

Nous avons ensuite voulu déterminer quelle(s) région(s) de la partie C-terminale détermine(nt) cette interaction. Pour ce faire, j'ai co-exprimé la construction GST-CHD1L Nter avec soit la partie CterN (linker), soit la partie CterC (macrodomaine) (Figure 80 - 2.B.).

Nous voyons que le domaine CHD1L-Nter ne semble pas interagir, ni avec le domaine CterN seul, ni avec le domaine CterC seul. Ces deux régions C-terminales (charnière et macrodomaine) semblent toutes deux essentielles à cette interaction.

Cependant, nous avons vu précédemment que le domaine CterC semble insoluble lorsqu'il est exprimé seul, tandis que le domaine CterN est soluble exprimé seul. Nos nouveaux résultats démontrent donc, puisque le domaine CterN n'interagit pas avec le domaine Nter de CHD1L, de l'importance de la partie CterC (macrodomaine) pour l'interaction avec la partie N-terminale de CHD1L.

Minitests des constructions N-terminale (tête ATPase) + C-terminale (macrodomaine) de CHD1L

1 Conditions expérimentales retenues

A. Expression : Cellules BL21(DE3) ou pRARE2 –
Milieu A1.TB - 6h à 37°C puis 14h à 25°C
Tampon : 10 mM Tris HCl pH 7,5 + 500 mM NaCl
Elution : Analyse directe de la résine d'affinité

B. Expression : Cellules BL21(DE3) pRARE2 –
Milieu A1.TB - 6h à 37°C puis 14h à 18°C
Tampon : 10 mM Tris HCl pH 7,5 + 500 mM NaCl
Elution : Analyse directe de la résine d'affinité

2 Gel SDS-PAGE 15% des échantillons finaux purifiés

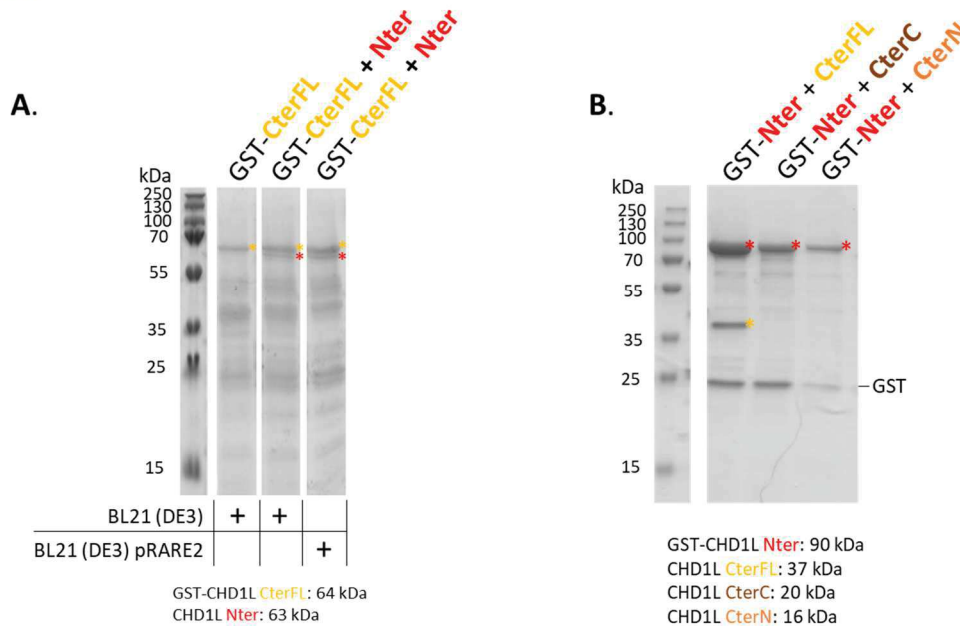


Figure 80 : Résultats des minitests pour l'interaction entre la N-terminale de CHD1L et les différentes constructions de la partie C-terminale

1. Conditions expérimentales retenues pour l'expression et la purification à petite échelle

2. Gels dénaturants SDS-PAGE 15% des échantillons finaux purifiés après minitests

Un astérisque est présent lorsqu'une bande protéique est visible à la taille attendue.

Les tailles théoriques sont indiquées sous les gels.

L'interaction entre les parties CterFL et Nter de CHD1L a donc bien été validée, mettant notamment en avant l'importance du macrodomaine à défaut de pouvoir conclure sur la région charnière. Nous sommes donc passés à la purification à plus grande échelle dans le but de tenter de déchiffrer les bases moléculaires de cette interaction par cristallographie.

Pour ce faire, j'ai utilisé la construction GST-CHD1L Nter + CterFL qui présente les résultats les plus probants en minitests.

2. Large scale et optimisations pour GST-CHD1L Nter + CterFL

Les conditions d'expression n'ont pas été modifiées par rapport aux minitests (Figure 80 - 1.B), excepté le volume de culture qui est de 6L.

J'ai tout d'abord optimisé la purification de GST-CHD1L Nter + Cter FL, en testant différents protocoles de purification.

J'ai d'abord essayé une purification en deux étapes, avec une étape d'affinité glutathion sépharose (GS) puis une gel filtration. Cependant, après ces deux étapes, la fraction protéique présentait toujours une contamination par des acides nucléiques.

J'ai donc rajouté une étape de purification supplémentaire entre l'étape d'affinité et de gel filtration. J'ai tout d'abord tenté d'ajouter une étape d'affinité héparine, adaptée à la séparation de protéine liant l'ADN. Cependant l'ajout de cette étape a entraîné la dissociation du complexe Nter + CterFL. J'ai alors essayé une colonne échangeuse d'anions, Hitrap Q, adaptée au pl de mon complexe, qui s'est avérée probante. Du fait de l'ajout de cette étape, la concentration saline du tampon de lyse a aussi dû être optimisée. En effet, pour l'échangeuse d'anions, la concentration saline doit être idéalement de 50 mM NaCl. Ainsi, d'éviter une dilution d'un facteur 10 (tampon initial : 10 mM Tris pH7.5 + 500 mM NaCl), j'ai utilisé un tampon de lyse contenant 250 mM NaCl.

Pour finir, j'ai également optimisé l'étape d'élution de la 1^{ère} étape d'affinité GS, en effectuant soit une élution au glutathion réduit, soit par l'ajout de protéase 3C.

Le protocole de purification retenu est le suivant : une affinité GS suivie d'une élution par l'ajout de protéase 3C, une Hitrap Q et une gel filtration S200 16/600. Les tampons utilisés pour cette purification optimisée sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Tampons de purification pour GST-CHD1L Nter + CterFL

Tampon de lyse	Affinité GS	Hitrap Q	Gel filtration
10 mM Tris pH 7.5 + 250 mM NaCl	Lavage : tampon de lyse Elution : tampon de lyse + protéase His-3C	Injection : 10 mM Tris pH 7.5 + 50 mM NaCl Elution : 10 mM Tris pH7.5 + 50 à 1000 mM NaCl	10 mM Tris pH7.5 + 250 mM NaCl + 0.5 mM TCEP

Pour pousser cette optimisation et tenter de mieux stabiliser cette interaction imitant le mécanisme d'auto-inhibition, j'ai également testé la co-expression et la co-purification de GST-CHD1L Nter avec une construction plus courte du Cter, CterM (613-886). Une construction quasiment identique a été utilisée dans l'étude de (Lehmann et al. 2017) et

permet l'obtention d'un complexe stable. Pour ce faire j'ai utilisé la même procédure que pour CHD1L Nter + CterFL.

La Figure 81 présente les résultats de la purification optimisée de GST-CHD1L Nter (1-561) + CterFL (566-886), ainsi que celle de GST-CHD1L Nter (1-561) + CterM (613-886).

Des disparités entre ces deux constructions sont visibles dès la première étape d'affinité. Pour CHD1L Nter + CterFL nous voyons deux bandes d'intensité égale, après l'étape d'éluion par coupure à la protéase. Le complexe semble équimolaire et stable, avec très peu de dégradation visible.

En revanche, pour le complexe CHD1L Nter + CterM, la bande correspondant à CterM est très faible. Ce complexe semble très instable, nous observons après coupure sur la nuit par la protéase 3C un précipité visible à l'œil nu.

Les deux complexes ont alors été dilués au 1/5 afin d'obtenir une concentration saline de 50 mM NaCl, puis injectés sur l'Hitrap Q. Un monitoring de l'UV à 260 nm a été réalisé en plus de celui à 280 nm afin de détecter facilement la présence d'ADN sur l'AKTA.

Les deux complexes se comportent de manière similaire lors de l'éluion de l'HitrapQ. En effet, bien que l'intensité de pic est ~ 2.5 à 3 fois plus faible pour le complexe CHD1L Nter + CterM, comparée à celle du pic CHD1L Nter + CterFL, les deux complexes sont élués à une concentration en NaCl égale (d'environ 280 mM). Les fractions contenant les complexes d'intérêts ont alors été réunies et injectées sur une gel filtration préparative S200 16/600.

Ici encore, les complexes se comportent de manière similaire. Comme précédemment l'intensité de pic pour CHD1L Nter+CterM est ~ 2.5 fois plus faible que celle de CHD1L Nter+CterFL. Dans les deux cas, les fractions d'intérêts (C2-C8) sont réunies pour être concentrées.

Lors de la concentration les deux complexes se distinguent fortement. En effet, le complexe CHD1L Nter+CterM forme des précipités visibles à l'œil nu. Ce précipité a été déposé sur gel SDS-PAGE (Figure 81-4, ligne 5). Le complexe CHD1L Nter+CterFL, quant à lui, se concentre sans former de précipité. J'ai ainsi pu obtenir :

- Pour CHD1L Nter+CterM, 100 μ L de complexe à une concentration de 0.4 mg/L correspondant à un rendement final de purification, de 0.007mg/L soit 7 μ g/L.
- Pour CHD1L Nter+CterFL, 50 μ L de complexe à une concentration de 7 mg/mL, soit un rendement de 0.6 mg/L.

Ces échantillons ont été déposés sur gel SDS-PAGE (Figure 81 – 4). Nous voyons une dégradation pour les deux complexes. Cette dégradation apparaît plus particulièrement prononcée pour le complexe CHD1L Nter+CterFL, où la partie N-terminale semble se dégrader en une deuxième bande d'environ 55 kDa d'intensité égale à la première. Cependant la plus

grande concentration de ce complexe peut donner une impression trompeuse d'une dégradation plus intense, une dégradation étant aussi observée pour le complexe CHD1L Nter+CterM. CHD1L Nter+CterFL a également été analysé en DLS, qui a révélé une polydispersité multimodale.

Un essai de cristallisation a tout de même été tenté sur ce complexe. Ce dernier a été fait en utilisant le ciblage « Top96 », avec une mise en place protéine et réservoir de 200 nL + 100 nL et de 100 nL + 100 nL. Ce screen rassemble 96 des conditions les plus retrouvées dans les dépôts de la PDB et il a également donné les meilleurs précipités pour les essais de la construction CterN seule. Cet essai de cristallisation s'est également avéré infructueux.

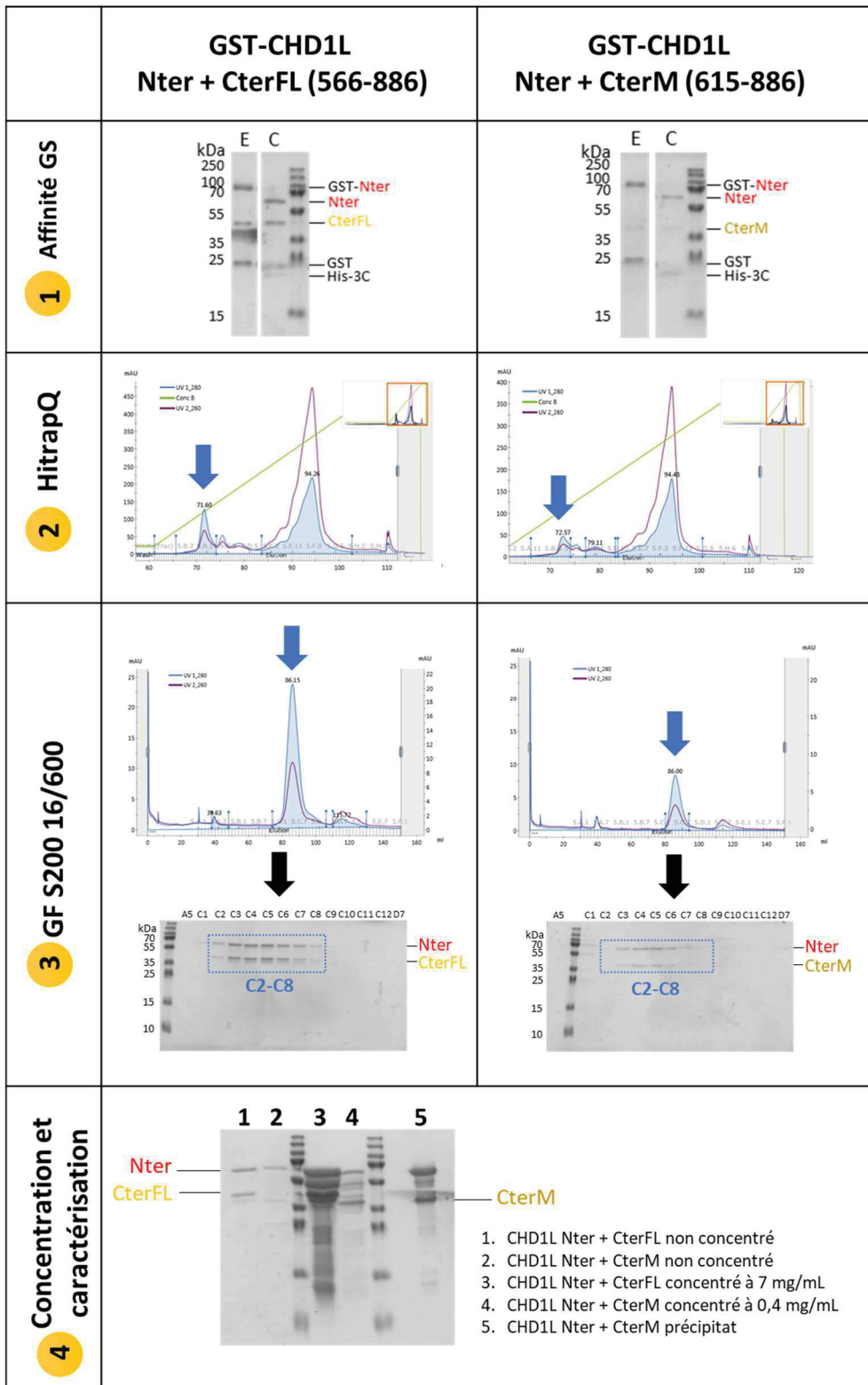


Figure 81 : Résultats des purifications 6L pour les constructions GST-CHD1L Nter+CterFL et GST-CHD1L Nter+CterM

Gels SDS-PAGE et chromatogrammes des différentes étapes de purification
 E : résine GS après affinité (sans coupure), C : surnageant après coupure 3C

Ainsi, la construction CterM, contrairement à l'hypothèse initiale, semble être moins à même de stabiliser le complexe. De fait, ce résultat montre que la région charnière de CHD1L joue aussi un rôle potentiel dans l'interaction avec CHD1L Nter et donc dans le mécanisme d'auto-inhibition.

3. Analyse des parties du Nter de CHD1L impliquées dans l'interaction avec le domaine Cter

Nous avons ensuite voulu identifier les domaines dans la région N-terminale qui déterminent cette interaction décrivant le mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L. Pour ce faire, j'ai réalisé deux constructions de la partie N-terminale :

- CHD1L Nter_Lobe1 (1-256) : contenant uniquement le lobe 1 de la tête ATPase
- CHD1L Nter_Lobe2 (252-561) : contenant uniquement le lobe2 de la tête ATPase

J'ai ensuite réalisé les tests d'interaction entre GST-CHD1L Nter_Lobe1 et la partie CterFL native, ainsi qu'entre GST-CHD1L Nter_Lobe2 et la partie CterFL native, en suivant la même démarche que dans la partie « Validation de l'interaction CHD1L CterFL + Nter par Minitests » de ce chapitre. L'interaction validée précédemment entre GST-CHD1L Nter et CterFL a servi de contrôle à l'expérience.

La Figure 82 montre les conditions de réalisation et les résultats des minitests. Nous voyons tout d'abord que notre contrôle positif est validé et que l'interaction entre GST- CHD1L Nter et CterFL est bien visible.

Concernant l'interaction entre GST-CHD1L Nter_Lobe1 et CterFL, une bande correspondant à la protéine GST-CHD1L Nter_Lobe1 est bien visible mais aucune bande n'est présente pour CterFL. En revanche, la bande de CHD1L Cter reste visible en présence de GST-CHD1L Nter_Lobe2. Ainsi le lobe 1 de la tête ATPase de CHD1L ne semble pas interagir avec la partie CterFL. Il est également possible que cette interaction soit très faible et non visible dans cette expérience.

En revanche, une interaction est bien visible entre GST-CHD1L Nter_Lobe2 et CterFL, signifiant que l'interaction d'auto-inhibition semble principalement portée par le Lobe2.

Minitests des différentes constructions N-terminale (Lobe 1 et 2 de la tête ATPase) + CterFL de CHD1L

1 Conditions expérimentales retenues

Expression : Cellules BL21(DE3) pRARE2 – Milieu A1.TB - 5h à 37°C puis 14h à 18°C
Tampon : 10 mM Tris HCl pH 7,5 + 250 mM NaCl
Elution : Analyse directe de la résine d'affinité

2 Gel SDS-PAGE 15% des échantillons finaux purifiés

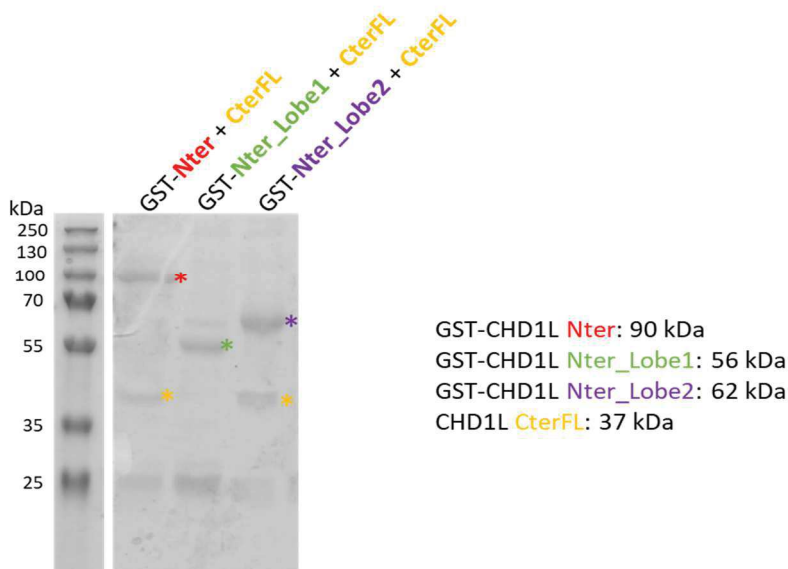


Figure 82 : Résultats des minitests pour la région N-terminale de CHD1L

1. Conditions expérimentales retenues pour l'expression et la purification à petite échelle

2. Gels dénaturants SDS-PAGE 12% des échantillons finaux purifiés après minitests

Un astérisque est présent lorsqu'une bande protéique est visible à la taille attendue

4. Vérification de l'interaction entre le lobe 2 de la partie Nter et la partie CterFL en *large scale*

Afin de vérifier les conclusions obtenues en minitests, des mises à l'échelle de 3 L ont été réalisées en utilisant les trois constructions testées précédemment :

- GST- CHD1L Nter + CterFL : contrôle positif de l'interaction
- GST-CHD1L Nter_Lobe1 + CterFL
- GST-CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL

Pour ce faire, j'ai utilisé les mêmes conditions d'expression que celles des minitests (cellules BL21 pRARE2, milieu A1.TB avec 5h de culture à 37°C, puis une induction sur la nuit à 18°C en augmentant le volume à 3 L. J'ai ensuite exploité le même protocole de purification, qui a été précédemment optimisé pour la construction GST-CHD1L-Nter + CterFL, et qui est détaillé dans la section « *Large scale* et optimisations pour GST-CHD1L Nter + CterFL ».

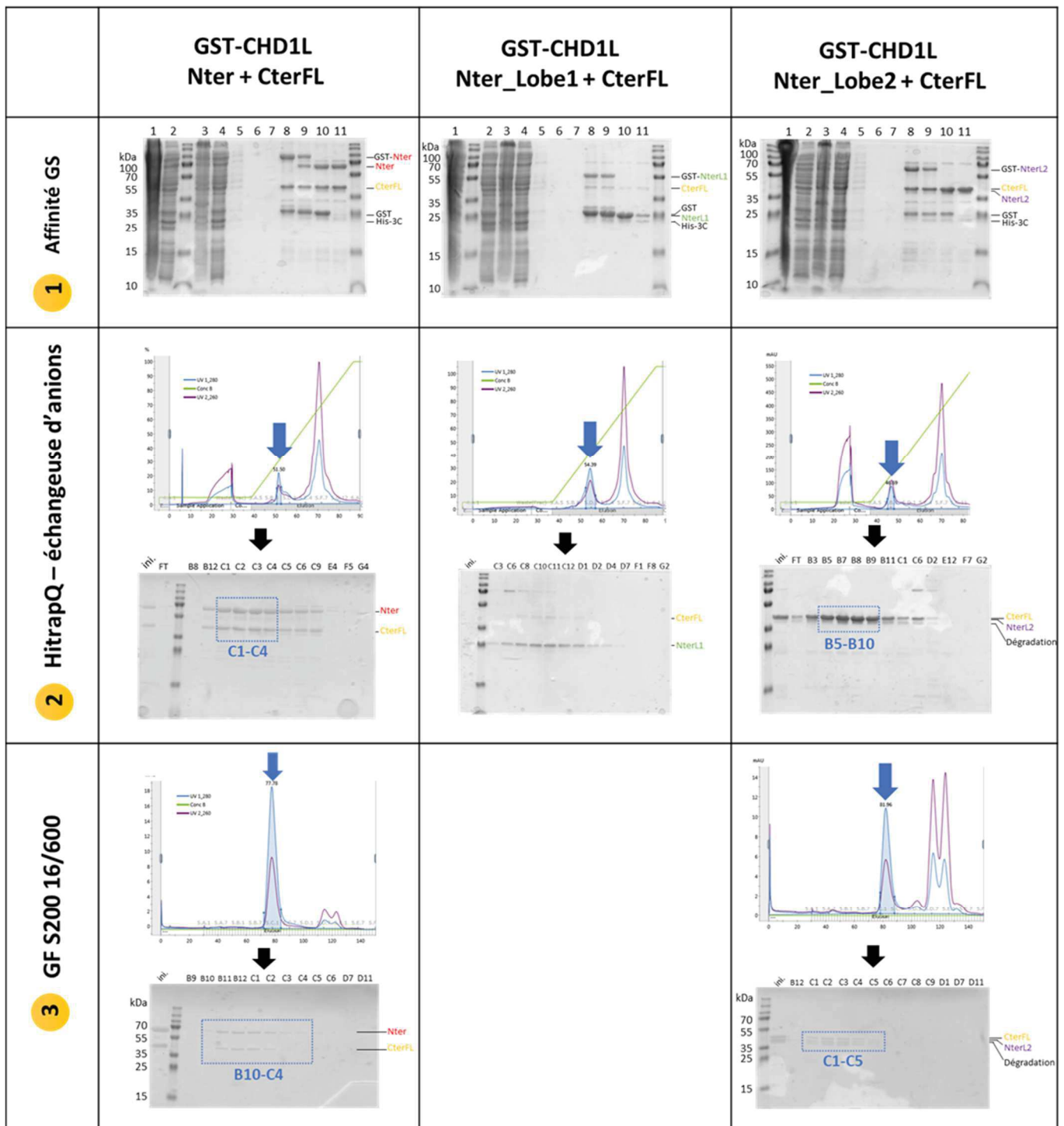


Figure 83 : Résultats des purifications à grande échelle (3L) pour les tests d'interactions entre les différentes parties N-terminale et la partie C-terminale de CHD1L.

Gel SDS PAGE 15% et chromatogrammes des différentes étapes de purification.

Légende : (1) Extrait total, (2) lysat clarifié, (3) fraction non soluble, (4) fraction non retenue, (5) Lavage 1, (6) Lavage 2, (7) Résine d'affinité avant coupure, (8) Résine d'affinité au début de la coupure avec la protéase 3C, (9) Résine d'affinité après coupure, (10) Surnageant injecté en HiTrapQ.

Les résultats de ces trois purifications sont disponibles dans la Figure 83. Nous voyons que, dès la première étape d'affinité GS, les résultats en *large scale* confirment ceux obtenus en Minitests.

En effet, pour les complexes GST-CHD1L Nter + CterFL et GST-CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL, nous voyons qu'à la fin de l'étape d'affinité (Figure 83 – 1, ligne 8), deux bandes d'intensités identiques correspondant aux complexes sont bien visibles. Cependant pour GST-CHD1L Nter_Lobe1 + CterFL, une bande est visible pour la protéine GST-CHD1L Nter_Lobe1, mais reste très faible pour la bande correspondant à CterFL. De plus après l'étape d'échangeuse d'ions, cette bande devient quasiment invisible. Il est donc probable que la partie CHD1L Nter_Lobe1 n'interagit que très faiblement avec le CterFL, **mais cette interaction semble être médiée par le Lobe2.**

J'ai ensuite comparé les rendements de purification entre les constructions CHD1L Nter + CterFL et CHD1L NterLobe2 + CterFL. Pour CHD1L Nter + CFL, le rendement est d'environ 0.6 mg/L, comme nous l'avons vu précédemment. En revanche pour le complexe CHD1L NterLobe2 + CterFL, son rendement chute à environ 0.1 mg/L. Ainsi, le rendement de cette purification n'était pas très favorable à la mise en place d'essais de cristallisation.

5. Stabilité des complexes

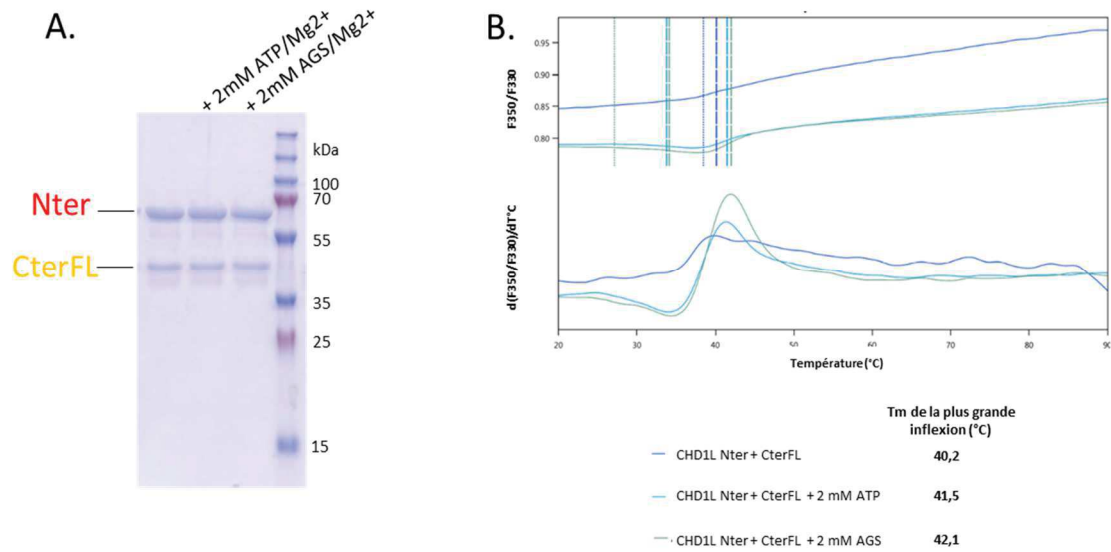
J'ai ensuite voulu tester la stabilité de ces deux complexes GST-CHD1L Nter + CterFL et GST-CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL, par nanoDSF.

Précédemment nous avons vu que le profil nanoDSF de CHD1L CterFL seul montrait son instabilité, avec notamment plusieurs points d'inflexions dans la première dérivée et un T_m sur le meilleur point d'inflexion d'environ 41°C. Nous espérons ainsi avoir un T_m plus stable avec ces deux complexes.

Afin de stabiliser davantage ces complexes, j'ai ajouté de l'ATP et l'ATP-γ-S (AGS) (un analogue non hydrolysable de l'ATP) aux différents complexes. Notre hypothèse était que cet ajout nous permette de stabiliser la partie N-terminale de CHD1L, contenant la tête ATPase. Pour le lobe 2 seul, qui ne fixe théoriquement pas l'ATP ou ses analogues, cet ajout nous a permis d'être dans des conditions reproductibles et comparables pour les deux complexes.

Les deux complexes (GST-CHD1L Nter + CterFL et GST-CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL) ont ensuite été concentrés en absence ou en présence d'ATP ou d'AGS afin d'obtenir une concentration finale d'environ 0.5 mg/mL pour chaque condition. Chaque échantillon a été déposé sur gel SDS-PAGE 15% (Figure 84-A) et a été testé en nanoDSF (Figure 84-B).

1 CHD1L Nter + Cter FL



2 CHD1L NterLobe2 + Cter FL

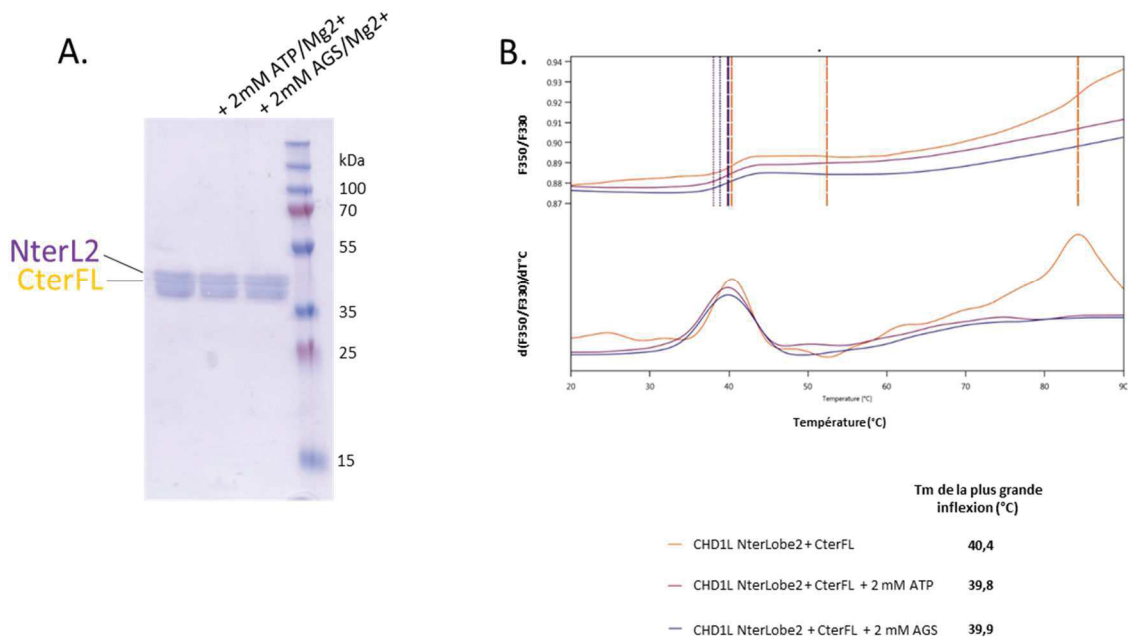


Figure 84 : Gel SDS PAGE et stabilité thermique des différents complexes

A. Gel SDS PAGE 15%

B. Profil nanoDSF ou fluorimétrie par balayage différentiel. Rapport de fluorescence (350 nm (aromatique en milieu aqueux) et 330 nm (aromatique en milieu hydrophobe) et dérivées premières de ces courbes. Les Tm présentés correspondent aux points de plus forte inflexion de la courbe.

Pour le complexe CHD1L Nter+ CterFL, nous n'observons pas de différence notable entre les trois conditions, sur le gel SDS PAGE.

Cependant des différences sont visibles en nanoDSF. Nous remarquons que le complexe semble moins stable en absence d'ATP ou d'AGS. En effet, cette condition (Figure 84 -1.B, courbe bleu foncée) présente le T_m le plus bas (40,2°C), en comparaison les T_m du complexe en présence d'ATP et d'AGS sont respectivement de 41,5°C et 42,1°C (Figure 84 -1.B, courbe bleu clair et bleu turquoise).

Nous remarquons également que la courbe est en général de meilleure qualité que celle de la construction CHD1L CterFL seule, signifiant que son interaction avec le Nter semble améliorer sa stabilité.

L'AGS apporte une meilleure stabilité au complexe CHD1L Nter + CterFL avec un gain de 2°C dans sa thermo-stabilité. C'est donc cette condition qui a été retenue pour la suite des expériences.

Pour le complexe CHD1L NterLobe2 + CterFL, il n'y a pas de différence visible sur le gel SDS-PAGE entre les trois conditions. De même, il ne semble pas y avoir de différence entre les 3 profils nanoDSF (Figure 84 -2.B). En effet, les courbes ont la même amplitude et la même transition dans la première dérivée. Le T_m est également très similaire et semble même un peu plus élevé pour la forme apo.

Ainsi, le complexe CHD1L NterLobe2 + Cter FL n'est pas stabilisé par la présence d'ATP ou d'AGS, ce qui conforte l'idée que la partie du lobe2 seule de la tête ATPase n'est pas capable de fixer de manière stable l'ATP.

Plusieurs essais de cristallisations ont également été réalisés pour CHD1L Nter_Lobe2 + Cter FL et se sont avérés, tout comme les tentatives précédentes, infructueux.

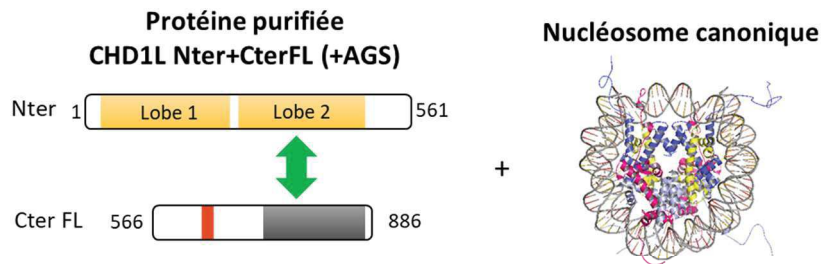
6. Test de l'interaction entre la construction CHD1L Nter + Cter et le nucléosome

J'ai ensuite voulu tester la fixation de ce remodeleur, et plus précisément, la fixation du complexe impliqué dans le mécanisme d'auto-inhibition, au nucléosome. Pour ce faire, j'ai utilisé la construction la plus stable trouvée précédemment : CHD1L Nter + CterFL en présence de 2 mM AGS.

J'ai ensuite mélangé ce complexe avec deux différents ratios au nucléosome canonique de *Xénopus*, comme montré dans la Figure 85.

Ce nucléosome a été reconstitué comme décrit dans le chapitre 3, en utilisant les histones de *Xénopus* et l'ADN de positionnement 601 de 147 pb. Ce nucléosome ne possède donc pas d'ADN de liaison supplémentaire. Il est également important de préciser que cette expérience a été réalisée sans PAR ou PARP1-PARYlé, et qu'ainsi le mécanisme d'auto-inhibition n'est a priori pas aboli.

1 Set up expérimental



2 Expérience de retardation sur gel

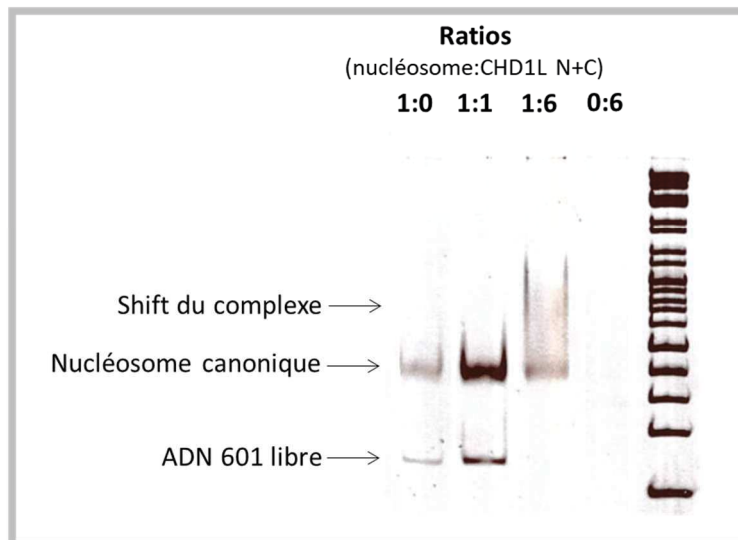


Figure 85 : Expérience de retardation sur gel testant la liaison de CHD1L Nter+CterFL au nucléosome canonique de *xénopus*

Gel polyacrylamide 6% coloré au bromure d'éthidium

La quantité de nucléosome utilisée pour chaque test est de 3 pmol, excepté pour le contrôle négatif où elle est de 1.5 pmol.

Nous voyons ainsi sur le gel de retardation que le complexe d'auto-inhibition CHD1L Nter + CterFL semble lier le nucléosome, mais également l'ADN 601 libre. Cela signifie que le mécanisme d'auto-inhibition ne semble pas empêcher la fixation au nucléosome. Il aurait été intéressant d'effectuer cette expérience avec le complexe d'auto-inhibition CHD1L Nter-Lobe2 + CterFL, qui n'a pas été faite faute de temps.

C. Objectif 3 : Etude d'une mutation provenant d'un cas clinique

Nos collaboratrices, les Dr. Christelle Golzio, et Dr. Maria Nicla Loviglio, ont collaboré avec le Dr Andre Reis, un clinicien, de l'Hôpital Universitaire-Institut de Génétique Humaine de Erlangen en Allemagne.

Le Dr Reis a effectué une recherche d'anomalies génétiques par la génération de données de séquençage à haut débit de type exome au sujet d'une patiente présentant des anomalies de développement. Cette patiente de 14 ans souffre de microcéphalie et d'une taille inférieure à la moyenne (10^{ème} pourcentile), correspondant aux phénotypes observés par nos collaboratrices chez le poisson zèbre. Cette patiente souffre également d'une lente neurodégénérescence, d'une déficience intellectuelle, d'une tétraparésie spastique, de trouble du mouvement et d'épilepsie sévère.

Dans les données de séquençage, plusieurs gènes présentent des variations non rapportées qui ségrégent avec la maladie, ce sont donc des gènes candidats. Parmi ces variations, le Dr Reis rapporte une mutation ponctuelle à l'état homozygote dans le gène de CHD1L qui est inconnue des bases de données d'individus sains. Cette mutation (R392H) est située dans le lobe 2 de la tête ATPase.

J'ai ainsi étudié cette mutation, en utilisant une approche biochimique et notamment par expression et purification à petit échelle. Je me suis tout d'abord demandée quel est l'impact de la mutation sur les isoformes long et court de CHD1L. Je me suis ensuite intéressée au rôle potentiel de cette mutation dans le mécanisme d'auto-inhibition, et plus particulièrement sur ce mécanisme avec uniquement le lobe 2 (isoforme court).

1. Minitests sur les constructions longues de CHD1L

J'ai comparé par minitests les constructions CHD1L-FL (1-889) et CHD1L-isoCourt (252-886), en présence et en absence de la mutation R392H.

Ces expériences ont été réalisées selon les conditions décrites dans la Figure 86 -1.

Pour les deux constructions CHD1-FL et CHD1-isoCourt, des résultats similaires ont été obtenus pour les mutants R392H (Figure 86-2).

Comme nous l'avons vu précédemment (section « Constructions longues de CHD1L (équivalent des isoformes long et court) »), ces constructions protéiques natives, donc sans mutation, sont faiblement visibles sur gel SDS-PAGE et cela, quelle que soit l'étiquette testée. Nous remarquons également que dans la globalité les bandes correspondants aux protéines R392H mutantes sont encore moins visibles que les bandes des protéines non mutées.

Minitests des constructions les plus longues de CHD1L pour la mutation R392H

1 Conditions expérimentales retenues

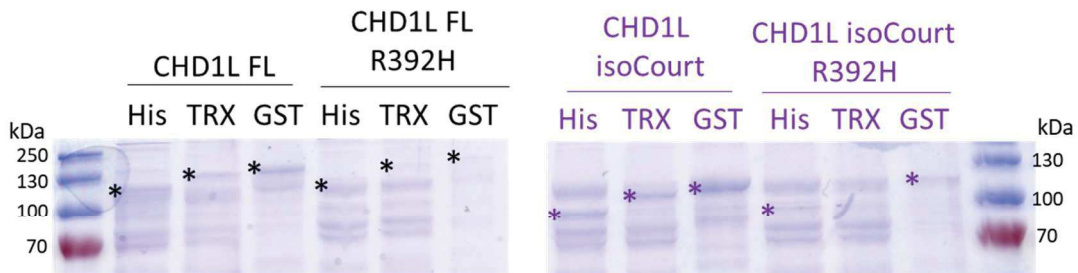
Expression : Cellules BL21(DE3) - Milieu A1.TB - 4h à 37°C puis 14h à 16°C

Tampon : 10 mM Tris HCl pH 8 + 500 mM NaCl

Elution : Analyse directe de la résine d'affinité

2 Gel SDS-PAGE 12%

A. Minitests



B. Fractions insolubles



Etiquette en Construction	Nter			Etiquette en Construction	Nter		
	His6	His10- TRX	GST		His6	His10- TRX	GST
CHD1L FL	102 kDa	115 kDa	127 kDa	CHD1L isoCourt	74 kDa	86 kDa	98 kDa
CHD1L FL R392H	102 kDa	115 kDa	127 kDa	CHD1L isoCourt R392H	74 kDa	86 kDa	98 kDa

Intensité des bandes
sur gel des Minitests

Faible
Très faible
Inexistant ou quasi

Légende sur la page suivante

Figure 86 : Résultats des minitests pour les constructions longues de CHD1L +/- R392H

1. Conditions expérimentales retenues pour l'expression et la purification à petite échelle
2. A. Gels dénaturants SDS-PAGE 12% des échantillons finaux purifiés après minitests
2. B. Gels dénaturants SDS-PAGE 12% des échantillons insolubles

Un astérisque est présent lorsqu'une bande protéique est visible à la taille attendue

His = étiquette His6 et TRX = étiquette His10-TRX

Les tableaux représentent les tailles théoriques des différentes constructions et résume l'intensité des bandes observées sur gel.

De plus, la solubilité de ces constructions sauvages et mutées a été testée (Figure 86–2.B). Nous n'observons pas de bandes correspondantes aux constructions utilisées dans les fractions insolubles, que ce soit pour les protéines sauvages ou mutées. Il est possible que les protéines soient faiblement exprimées, ce qui rend difficilement visible leur potentiel insolubilité dans les culots (accentué par un bruit de fond élevé). De ce fait, nous ne pouvons pas conclure sur un potentiel impact de la mutation sur la solubilité des protéines.

A la lumière de ces résultats, le mutant R392H pourrait être moins exprimé et/ou moins soluble et/ou moins stable.

L'idée de ce test n'était pas de passer à grande échelle, mais d'effectuer une comparaison entre les protéines mutantes et sauvages par un test biochimique.

Ainsi, la mutation R932H de CHD1L semble avoir un impact sur la protéine entière et sur l'équivalent de l'isoforme court.

2. Minitests sur le complexe imitant le mécanisme d'auto-inhibition avec la mutation R392H

Dans cette partie, j'ai utilisé une approche similaire à ce qui a été fait précédemment dans la partie « Validation de l'interaction CHD1L CterFL + Nter par Minitests ».

J'ai co-exprimé les différents complexes : CHD1L Nter + CterFL comme contrôle et CHD1L Nter_Lobe2+/-R392H + CterFL. Je les ai ensuite co-purifiés par minitests. Dans ce cadre, un seul des deux domaines (CterFL ou Nter_Lobe2 +/- R392H) a été étiqueté. Si le second domaine interagit avec celui qui porte l'étiquette, il y aura alors co-purification. Les bandes correspondant aux deux protéines seront alors visibles après les minitests sur le gel SDS-PAGE.

La Figure 87 résume les conditions et les résultats de ces minitests.

Minitests du complexe d'auto-inhibition Nter_Lobe 2 (+/- R392H) + CterFL de CHD1L

1 Conditions expérimentales retenues

Expression : Cellules BL21(DE3) pRARE2 – Milieu A1.TB - 6h à 37°C puis 14h à 18°C

Tampon : 10 mM Tris HCl pH 7,5 + 250 mM NaCl

Elution : Analyse directe de la résine d'affinité

2 Gel SDS-PAGE 15% des échantillons finaux purifiés

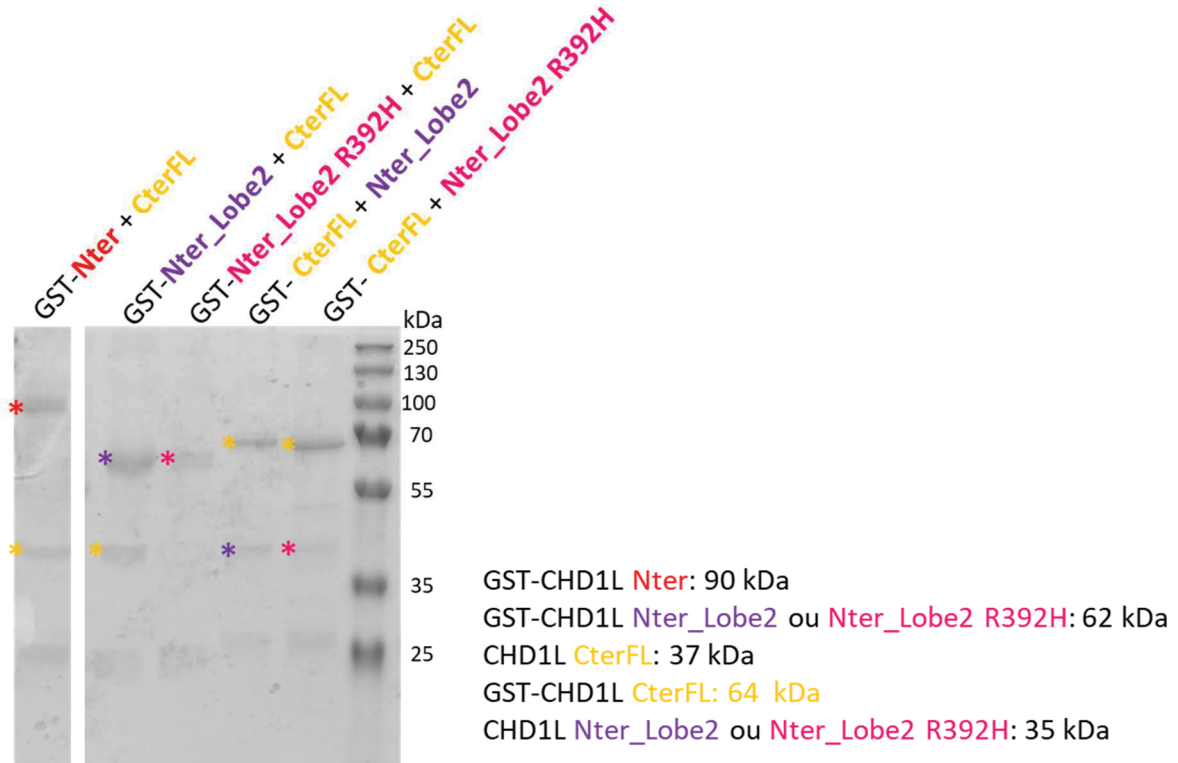


Figure 87 : Résultats des minitests pour le complexe d'auto-inhibition avec uniquement le lobe 2 de la tête ATPase, en présence ou absence de la mutation R392H

1. Conditions d'expression

2. Gel SDS-PAGE des fractions purifiés des minitests

Pour le contrôle positif, GST-CHD1L-Nter + CterFL, nous observons bien deux bandes correspondant aux deux protéines GST-CHD1L-Nter et CHD1L-CterFL.

Pour GST-CHD1L-Nter_Lobe2 + CterFL, la même observation est effectuée et les protéines GST-CHD1L-Nter_Lobe2 et CHD1L-CterFL sont bien présentes.

En revanche pour GST-CHD1L-Nter_Lobe2 R392H + CterFL, seule la bande correspondant à GST-CHD1L-Nter_Lobe2 R392H est visible. Nous voyons également que l'intensité de cette bande est plus faible que celle de la protéine équivalente non mutée. Concernant le seconde protéine CterFL, elle ne semble pas visible sur gel.

Deux hypothèses non mutuellement exclusives peuvent expliquer cela :

- Il est possible que la mutation R392H du lobe 2 décroisse ou abolisse l'interaction avec la partie C-terminale de CHD1L, qui n'est alors pas co-purifiée.
- la protéine GST-Nter_Lobe2 R392H étant potentiellement moins exprimée et/ou soluble, la bande correspondant à CterFL est d'autant plus diminuée (et donc moins visible sur gel).

Pour mieux comprendre l'effet de la mutation, j'ai alors entrepris de tester l'interaction dans le sens inverse, en plaçant le tag GST sur CHD1L Cter FL et en co-exprimant avec le Lobe 2 muté ou non muté (Figure 87 – 2).

Pour le complexe GST-CHD1L CterFL + Nter_Lobe2, nous observons sur gel SDS-PAGE deux bandes correspondant au complexe.

Pour le complexe GST-CHD1L CterFL + Nter_Lobe2 R392H, deux bandes sont également visibles sur gel SDS-PAGE, signifiant que le lobe 2 muté semble être co-purifié. Cependant la bande correspondant au lobe 2 R392H est de plus faible intensité et plus diffuse, par rapport à celle de la protéine sauvage. **Ce résultat tendrait à prouver une diminution de l'interaction entre ces deux domaines du fait de la mutation R392H.**

III. Résultats de mes collaborateurs

A. En parallèle des objectifs 1 et 2

Avant le début de notre collaboration, nos associées avaient uniquement travaillé sur l'isoforme court de CHD1L, car ce dernier est le plus exprimé au niveau de l'encéphale, en lien avec les phénotypes neurodéveloppementaux étudiés.

À la suite de nos analyses bioinformatiques et biochimiques préliminaires, notamment d'alignement des séquences, nous avons remarqué que cet isoforme ne possède pas le 1^{er} lobe de la tête ATPase. De ce fait, l'isoforme court n'a potentiellement pas une fonction de remodelage de la chromatine classique.

Sur nos conseils, nos collaboratrices ont donc testé la construction de CHD1L entière (aussi appelée isoforme long) dans un essai de complémentation *in vivo* chez le poisson zèbre. Elles ont ainsi vu que CHD1L entier était également capable de sauver le phénotype CHD1L^{-/-}.

Le fait que l'isoforme court de CHD1L puisse sauver les phénotypes, au même titre que la protéine CHD1L entière fonctionnelle, reste énigmatique mais suggère que la fonction ATPase n'est pas essentielle à ce mécanisme.

Nous avons alors émis l'hypothèse que cet effet de sauvetage des poissons CHD1L^{-/-}, ne serait peut-être lié qu'à un seul des domaines de CHD1L, et plus particulièrement au macrodomaine, qui est unique parmi les remodeleur.

Nos collaborateurs ont ainsi effectué des expériences de complémentation *in vivo* chez le poisson zèbre. Elles ont utilisé soit le domaine Nter (1-561) contenant la tête ATPase, soit le domaine CterFL (566-886) contenant le linker et le macrodomaine de CHD1L. Ces constructions correspondent aux constructions que j'ai précédemment utilisées dans mes travaux.

Les résultats de ces essais de complémentation montrent qu'aucun des deux domaines, CterFL et Nter, ne semblent sauver individuellement le phénotype CHD1L^{-/-}, les poissons présentant toujours une macrocéphalie et une taille réduite.

Il est cependant possible d'envisager que pour l'expérience effectuée avec la partie Nter, la protéine n'ai pas bien été bien dirigée vers le noyau, ainsi nos collaborateurs ont refait des constructions plus longues de la partie N-terminale contenant le NLS. Ces constructions sont au nombre de deux, la première étant la partie N-terminale entière jusqu'au NLS, et la seconde commençant du lobe 2 jusqu'au NLS :

-CHD1L Nter-zébra (1-700),

-Nter_Lobe2-zébra (252-700).

Ces constructions sont également présentées dans la Figure 72 initiale des constructions au début de la session « Résultats » de ce chapitre.

Ces deux constructions ont alors été testées par expérience de complémentation *in vivo* en *zébrafish*. Cependant, cette fois-ci encore, elles n'ont pas permis le sauvetage du phénotype, les poissons ayant toujours un encéphale et une taille réduite.

Ces expériences signifient donc que le lobe 2 de la tête ATPase et le macrodomaine (avec la région charnière) doivent tous deux être présents pour sauver le phénotype.

Ainsi ces résultats sont en faveur d'une implication de l'interaction d'auto-inhibition, que j'ai démontré précédemment entre le lobe 2 de la tête ATPase et le CterFL (macrodomaine avec la région charnière), dans le sauvetage du phénotype, sans cependant faire utilisation d'une activité ATPase.

B. En parallèle de l'objectif 3 - cas clinique

Nos collaboratrices se sont aussi intéressées à l'effet de la mutation R392H de CHD1L sur le phénotype des poissons. Elles ont effectué des essais de complémentation *in vivo* chez les poissons zèbre, en y surexprimant CHD1L FL R392H.

Leurs résultats montrent que CHD1L FL R392H rétablit partiellement le phénotype. Les poissons ont donc un phénotype intermédiaire entre les poissons WT et CHD1L^{-/-}. **Cette mutation semble donc être hypomorphe.**

Une expérience utilisant l'isoforme court R392H de CHD1L est en cours d'investigation.

IV. Discussion et perspectives

Le projet CHD1L est un projet récent, débuté durant ma 3^{ème} année de thèse. De ce fait, j'ai manqué de temps pour effectuer certaines expériences qui seront discutées dans cette section.

A. Objectif 1 : obtenir des informations structurales sur CHD1L

Les résultats obtenus au cours de cette étude n'auront pas permis l'obtention d'information structurale sur CHD1L, notamment sur le macrodomaine qui est unique parmi les remodeleurs. Dans l'ensemble, la protéine CHD1L et ses domaines restent difficilement purifiables avec des rendements de purification faibles, n'excédant pas 0.6 mg/L. Cependant, mon étude a permis de faire progresser la compréhension biochimique de ce remodeleur. Ci-dessous, je discuterai des différentes constructions utilisées lors de mes études.

1. CHD1L long et isoforme court

Comme nous l'avons vu précédemment, ces constructions semblent très faiblement exprimées en minitests, il est donc impossible d'utiliser notre approche habituelle en *E.coli* pour ces constructions. Il serait très intéressant de changer de système d'expression. Je pense notamment au système d'expression baculovirus/cellule d'insecte. En effet, ce système semble plus adapté aux protéines de la famille CHD et a notamment été utilisé pour la résolution des protéines quasiment entières de CHD1 et CHD4, en complexe avec un nucléosome (Farnung et al. 2017) (Farnung, Ochmann, et Cramer 2020).

De plus, ce système permettrait l'ajout de PTMs potentiellement cruciales pour la stabilité d'une protéine. A ce jour, il existe très peu d'informations sur les PTMs de CHD1L. Seules deux phosphorylations putatives ont été trouvées sur les résidus S636 (linker) et S891 (macrodomaine) et leurs fonctions demeurent inconnues (Cheng, Su, et Xu 2013).

Il a donc été essentiel pour nous de découper la protéine CHD1L en domaines plus stables qui permettent son étude par une approche *E.coli*. Ce découpage a été réalisé sur la base d'alignements de séquences mais également sur la littérature disponible (Hari R. Singh et al. 2017) (Lehmann et al. 2017), qui a, entre autres, utilisé *E.coli* comme approche.

2. CHD1L Nter (tête ATPase)

Je n'ai malheureusement pas eu le temps d'exploiter tout le potentiel de cette construction. Les résultats des minitests effectués nous montrent que la protéine est très peu exprimée (ou soluble, cette dernière n'ayant pas été vérifiée).

Il aurait été intéressant d'optimiser les minitests et de les effectuer par exemple avec une température d'induction plus basse (comme 18°C), ce qui aurait potentiellement permis l'obtention de résultats exploitables pour du *large scale*.

En effet, cette construction est celle qui contient l'homologie de séquence la plus élevée avec CHD1 et qui lui vaut d'ailleurs son nom de CHD1-like. Il y a ainsi entre CHD1 et CHD1L humain, 59% d'identité pour le domaine HELICc correspondant au lobe 2 et 45% d'identité sur l'ensemble de la tête ATPase. De plus, en 2010, Hauk et ses collaborateurs ont réussi à déterminer la structure de CHD1 ATPase + chromodomaine, en utilisant une expression en *E.coli* et notamment une induction à basse température, 18°C (Hauk et al. 2010).

3. CHD1L Cter

La partie C-terminale (CterFL) correspondant au domaine carboxy-terminal entier, a encore été divisée en plusieurs constructions CterN (région linker) et CterC (macrodomaine).

a. CterN

La construction CterN est celle qui a donné dans l'ensemble les meilleurs résultats. En effet, j'ai pu obtenir une protéine avec une bonne polydispersité de 12 %, se comportant bien au niveau de la concentration (maximum testé 10 mg/mL). Je n'ai pas pu concentrer d'avantage du fait du rendement tout de même faible de la purification (0.5 mg/L). Cette protéine est également celle avec la thermostabilité la plus haute (Tm 55,8°C).

J'ai ainsi effectué deux essais de cristallisation sur deux batch de protéines différentes à 5 et 10 mg/mL avec les screens (Berkeley, Classics, Top96, PEG, Wizzard I et II). Cependant, malgré la présence de séparation de phase et de précipités encourageants, notamment dans les screens PEGs et Top96, contenant divers PEGs comme précipitants, ces essais se sont avérés infructueux.

Cette région charnière est prédite comme étant intrinsèquement désordonnée (Figure 88). Ainsi, du fait de la flexibilité potentielle de cette région, notre échantillon n'est sans doute pas très homogène, ce qui peut expliquer l'absence de cristaux (malgré la polydispersité de 12%).

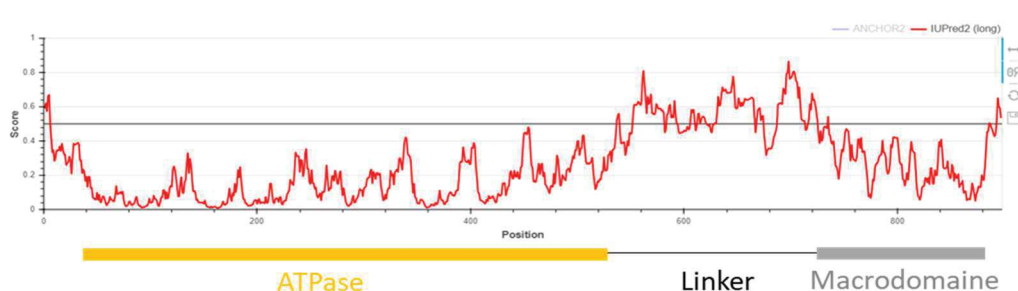


Figure 88 : Prédiction des régions intrinsèquement désordonnées de la protéine CHD1L en utilisant l'interface en ligne d'IUPred (iupred2a.elte.hu)

En ordonnée sur le graphique, un score prédisant le désordre. Au-dessus de la ligne, on considère la région comme intrinsèquement désordonnée, en dessous comme ordonnée.

J'ai cependant observé une caractéristique intéressante de cette région. En effet, cette région semble lier les acides nucléiques, même si cette liaison est assez faible. De plus, cette région est composée de nombreux résidus R et K chargés positivement, notamment au niveau du NLS.

Cette caractéristique de liaison à l'ADN est retrouvée chez CHD1, qui est capable de lier l'ADN via son domaine auxiliaire SANT-SLIDE. De manière surprenante, CHD1L ne possède pas ce domaine de liaison à l'ADN. J'ai donc aligné la région de charnière de CHD1L au domaine SANT-SLIDE de CHD1 (Figure 89).

Ces deux régions partagent 22 % d'identité, ce qui est un seuil bas d'homologie. Il est donc possible que CHD1L ait un domaine de fixation de l'ADN dans cette région, même s'il est peu probable que ce soit un domaine SANT-SLIDE.

```

hCHD1_SANT-SLIDE_1121-1320      enikgfsda---eirnfiksykkfvg-----plerldaiardaelvdk---setdlr      46
CHD1L_CterN-Linker_560-700    -aeggsrdqeegknhmylfegkdyskepskedrksfeqlvnl--qktllekasqegrslr      57
      * *   : : : : . * : :   : * : :   : : * : *   . . **

hCHD1_SANT-SLIDE_1121-1320      rlgelvhngcikalkdsssgtertggrlgkvkqptfrisgvqvnaklvishheeliplhk      106
CHD1L_CterN-Linker_560-700    nkgsvlipglv-----egstkr-----krvlspe-eledrqk      88
      . * : : * :   : : : :   : * * *   * : * * * *   : *

hCHD1_SANT-SLIDE_1121-1320      sipsdpeerkqytip---chtkaahfdidwgkeddsnlligiyeygygswemikmdpdl      162
CHD1L_CterN-Linker_560-700    krqeaakrrrriieekkrqkeeahkkkmawesnn-----yqsfclpse-----      133
      . .   * : :   .   : : * : : :   * * : :   .

hCHD1_SANT-SLIDE_1121-1320      slthkilpddpdkkqakqlqtradylikllsrdlakk      200
CHD1L_CterN-Linker_560-700    ---esepedl-----      140
      : * :

```

Figure 89 : Alignement de séquences entre le CterN (région charnière) de hCHD1L et le domaine SANT/SLIDE de hCHD1

Alignement réalisé avec Clustal Oméga

b. Constructions contenant le macrodomaine

Le macrodomaine de CHD1L est unique parmi les remodeleurs. De plus, le fait que CHD1L ait un rôle d'oncogène le rend d'un intérêt particulier. Aucune structure à haute résolution n'est disponible pour ce domaine.

- CterC

Concernant la construction CHD1L-CterC contenant uniquement le macrodomaine, les résultats de solubilité et de stabilité obtenus par minitests étaient encourageants, mais cette construction s'est avérée totalement insoluble, lors du passage à une plus grande échelle (1L).

Il aurait été possible d'optimiser la purification en *large scale* et notamment d'abaisser la température d'induction, afin de favoriser le bon repliement et la solubilité de la protéine.

L'index GRAVY de cette construction native est de -0.363 , ce qui signifie qu'elle n'est pas particulièrement hydrophobe, sinon il aurait pu être intéressant d'ajouter des détergents lors de la purification.

Cependant, ces optimisations ne pouvaient pas être criblées au préalable par minitests, étant donné que ces derniers ne sont pas reproductibles avec le *large scale*. Il aurait donc fallu plus de temps pour effectuer plusieurs optimisations directement en *large scale*.

Une autre idée aurait été de solubiliser le macrodomaine avec l'aide de son partenaire. C'est, par ailleurs, ce que nous avons testé en ajoutant la tête ATPase, qui n'est pas vraiment un partenaire, car il s'agit d'un autre domaine de la même protéine.

Le macrodomaine interagit également avec le poly(ADP-ribose) ou PAR, et plus précisément avec le tri-ADP-ribose. Il aurait donc été intéressant d'ajouter du PAR lors de la purification. La difficulté de cette manipulation réside dans le fait que le PAR n'est pas disponible de manière commerciale et qu'il doit être synthétisé. La synthèse chimique du trimère étant laborieuse, une production enzymatique serait souhaitable. La production enzymatique de PAR est possible en utilisant la poly(ADP-ribose) polymérase 1 et son cofacteur le NAD⁺, mais peu d'informations ont été rapportées sur la façon de contrôler sa synthèse (Roos 2020).

Ainsi, le macrodomaine de CHD1L paraît particulièrement difficile à manipuler. Une thèse de l'université d'Uppsala en Suède « Strategies for co-crystallizing human macro domains using defined PAR oligomers » (Roos 2020) a d'ailleurs été dédiée entièrement à cette problématique sans parvenir à l'obtention d'une structure cristallographique du macrodomaine de CHD1L. Il est également à noter que ce domaine n'est pas très grand (20 kDa sous forme native) et que de ce fait la cristallographie paraît tout de même être l'approche la plus raisonnable.

- CterFL

Je me suis ensuite intéressée à la construction CterFL contenant le CterC, ainsi que la région charnière, prédite comme intrinsèquement désordonnée.

Les analyses biophysiques de cette protéine ont montrés que cette dernière ne parait pas très stable. De nombreuses dégradations sont visibles sur gel SDS-PAGE après concentration. De plus, le rendement final de cette purification est d'environ 0.1 mg/L, ce qui ne m'a pas permis d'obtenir une protéine concentrée à plus de 0.5 mg/ml, afin d'avoir un volume minimal pour poursuivre mes expériences. Ce faible rendement est aussi lié au fait que cette construction lie l'ADN (ce qui n'est pas surprenant vu qu'elle contient le CterN). Il est donc nécessaire d'ajouter une étape de purification par HiTraQ, permettant de retirer l'ADN et entraînant forcément une perte protéique.

Pour ces différentes raisons, des essais de cristallisation n'ont pas pu être réalisés.

La dégradation visible sur gel SDS-PAGE est possiblement liée au linker désordonné. Ce linker bien que permettant la solubilisation du macrodomaine, pourrait entraîner une hétérogénéité de l'échantillon. C'est également pour cela que la construction CterM (615-886) contenant une partie plus courte de ce linker a été réalisée par la suite. Cette construction n'a pas été testée seule, mais seulement en co-expression avec la partie Nter. Il serait donc valable d'entreprendre cette purification.

Comme discuté précédemment pour le macrodomaine seul, il serait également intéressant de stabiliser cette construction CHD1L-CterFL avec des oligomères de PAR ou du tri-ADP-ribose. Pour la suite de ce projet, il serait possible d'envisager une collaboration avec des spécialistes des PARPs, comme par exemple l'équipe SCHALK/MISLIN travaillant à l'IREBS à Illkirch-Graffenstaden.

Lors de mes travaux, j'ai également tenté de stabiliser cette construction CHD1LCterFL en la co-exprimant avec la partie N-terminale contenant la tête ATPase, formant ainsi le complexe impliqué dans le mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L.

B. Objectif 2 : Etude du mécanisme d'auto-inhibition entre la tête ATPase et le macrodomaine

1. CHD1L Nter + CterFL

J'ai réussi à former le complexe d'auto-inhibition entre la partie N-terminale (1-561) et C-terminale (566-886) de CHD1L. J'ai également montré que cette interaction nécessitait le macrodomaine et certainement une partie du linker. J'ai optimisé cette purification me permettant d'obtenir un rendement de 0.6mg/L, ce qui reste tout de même faible pour une optique structurale par cristallographie. Il est à noter que la taille de ce complexe est de 126 kDa, ce qui se situe dans la limite basse des objets exploitables par cryo-EM, mais cette technique serait envisageable.

Lorsque j'ai commencé ce travail, il existait une structure basse résolution/enveloppe de CHD1L obtenue par SAXS, mais également par une classification 2D de données de cryo-microscopie et de négative stain (Lehmann et al. 2017). Ces données supportées par des données de *crosslinking* proposent que, *in vitro*, le mécanisme d'auto-inhibition soit porté par des interactions électrostatiques entre le domaine C-terminal et le domaine N-terminal. Ils proposent ainsi deux modèles pour l'interaction d'auto-inhibition de CHD1L (Figure 90) :

- Le premier noté MC où le macrodomaine (zone basique) interagit avec le lobe 2 de la tête ATPase (zone acide)
- Le second noté MN où le macrodomaine (zone basique) interagit avec le lobe 1 de la tête ATPase (zone acide)

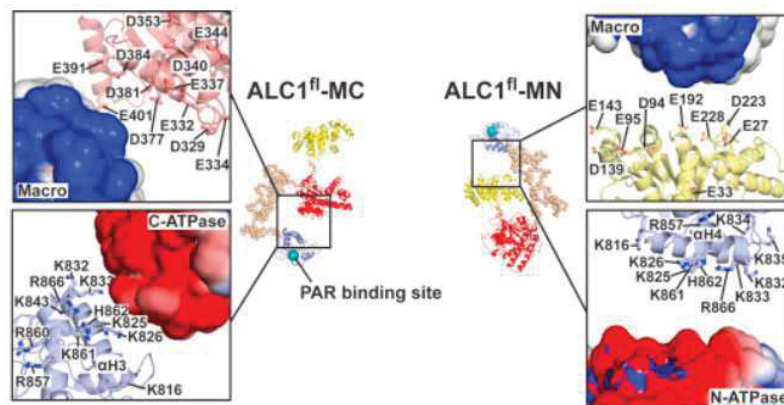


Figure 90 : Modèle initial d'interaction pour le mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L
MC : macrodomaine - ATPase lobe 2
MN : macrodomaine - ATPase lobe 1
Source : (Lehmann et al. 2017)

Il y aurait alors, *in vitro*, une coexistence en solution de ces deux modèles (Lehmann et al. 2017). Leurs données *in vivo*, notamment d'immunoprécipitation, montrent grâce à une approche mutationnelle que ce serait préférentiellement le lobe 2 de la tête qui interagirait avec le macrodomaine (Lehmann et al. 2017). La même hypothèse a été proposée par spectrométrie de masse par échange hydrogène/deutérium (HDX-MS) dans une autre publication (Hari R. Singh et al. 2017).

Ainsi, plusieurs équipes se sont attelées, avant le début de mes travaux, à l'obtention de données structurales pour CHD1L, sans parvenir à obtenir une structure atomique. Cela démontre encore une fois de la complexité de ce remodelleur unique à macrodomaine.

2. CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL

Mes travaux ont donc permis de confirmer l'hypothèse de l'interaction entre le lobe 2 de la tête ATPase et le macrodomaine, en découpant physiquement les deux lobes. Cela n'avait jamais été réalisé. J'ai ainsi prouvé, *in vitro*, que l'interaction de ce mécanisme d'auto-inhibition avec le macrodomaine est bien portée par le lobe 2 de la tête ATPase (correspondant au modèle MC). Ainsi la partie basique du macrodomaine pourrait interagir avec la surface acide du lobe 2, via de nombreuses interactions électrostatiques.

De plus, j'ai également montré que seule la présence du lobe 2 est nécessaire à la mise en place du mécanisme d'auto-inhibition. Mes travaux ont donc permis de mettre en évidence un complexe stable entre la partie C-terminale contenant le macrodomaine et la région charnière (566-886) et la partie N-terminale, le lobe 2 de la tête ATPase (252-561).

Mes résultats soulignent que le lobe 2 est nécessaire et suffisant à la mise en place du mécanisme d'auto-inhibition avec le macrodomaine.

Nous pouvons donc spéculer que l'isoforme court de CHD1L (comprenant le lobe2-linker-macrodomaine) possède éventuellement un mécanisme similaire à celui d'auto-inhibition.

Une question reste en suspens, qu'est ce qui est auto-inhibé ? En effet, ce mécanisme dans la protéine CHD1L entière permet d'inhiber le remodelage de la chromatine. Or, l'isoforme court de CHD1L étant dépourvu du lobe 1 de la tête ATPase, ce dernier n'est probablement pas impliqué dans le remodelage de la chromatine.

De ce fait, le rôle de ce mécanisme pour l'isoforme court reste énigmatique. Nous avons donc mis en évidence un nouveau mécanisme très probablement indépendant de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP.

3. Stabilisation du complexe CHD1L Nter + CterFL

J'ai ensuite travaillé sur la stabilisation du complexe CHD1L Nter + CterFL. Pour ce faire, j'ai comparé la thermostabilité du complexe protéique en l'absence et la présence d'ATP et d'AGS.

La présence d'ATP et d'AGS permettent tous deux de stabiliser le complexe de respectivement 1,3 et 1,9 °C. Cette stabilisation démontre de manière indirecte la liaison de l'ATP et de l'AGS au complexe que j'ai purifié. Bien que cela soit en concordance avec la littérature (Lehmann et al. 2017), cette interaction devra être testée par des techniques directes telles que par ITC ou anisotropie de fluorescence.

Les expériences que j'ai réalisées ne permettent cependant pas d'aboutir à une conclusion quant à l'activité d'hydrolyse du complexe CHD1L Nter + CterFL, qui devra également être testée par des tests enzymatiques.

Dans la littérature, il a été prouvé que le complexe, au même titre que la tête ATPase seule, est capable de fixer et d'hydrolyser l'ATP (Lehmann et al. 2017) (Hari R. Singh et al. 2017). Cela signifie que la fixation de l'ATP permet le déplacement de la tête ATPase en conformation active, mais que le macrodomaine est toujours lié, inactivant l'activité de remodelage.

Il est à noter que la thermostabilité des complexes n'a pas été testée dans les deux publications citées précédemment.

Grâce à mes expériences de nanoDSF, j'ai également pu prouver que l'ATP et l'AGS n'ont pas d'impact sur le complexe CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL. Ce dernier, comme attendu, n'est donc certainement pas capable de fixer l'ATP ou ses analogues.

Ainsi il serait intéressant d'effectuer un test d'activité ATPase avec ces deux complexes CHD1L Nter + CterFL et CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL pour :

- 1) comparer nos résultats du complexes CHD1L Nter + CterFL avec la littérature.
- 2) confirmer que CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL ne fixe et n'hydrolyse pas l'ATP.

De plus, pour le complexe CHD1L-Nter_Lobe2 + CterFL, une bande de dégradation est toujours visible sur gel SDS-PAGE. En effet, nous pouvons voir une bande de dégradation juste en dessous des bandes correspondant au lobe 2 et au CterFL. Il serait ainsi intéressant de déterminer les limites protéiques de cette bande par spectrométrie de masse. De manière plus générale, dans l'optique de stabiliser d'avantage ce complexe, il serait intéressant de réaliser de la protéolyse ménagée, afin de déterminer de nouvelles constructions encore plus stables avec les domaines minimums nécessaires à l'interaction.

Nous pourrions également envisager une approche mutationnelle pour tenter de stabiliser ce complexe. En effet, il a été reporté que la mutation G750E, se situant au niveau du macrodomaine, perturbe la liaison du pyrophosphate de l'ADP-ribose dans les macrodomaines (Hari R. Singh et al. 2017). De ce fait, le complexe est toujours sous forme auto-inhibé, et cela, même en présence de PAR. Il serait donc intéressant de voir si un tel mutant pourrait avoir un impact sur la stabilité thermique du complexe CHD1L-Nter_Lobe2 + CterFL.

4. Remarques sur le lobe 2 de la tête ATPase et sur l'activation de CHD1L

Nous avons vu précédemment que le lobe 2 est nécessaire et suffisant à l'interaction avec le macrodomaine dans le mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L.

Le lobe 2 de la tête ATPase est également impliqué dans le mécanisme d'auto-inhibition des remodeleurs de la famille ISWI. Le lobe 2 interagit avec AutoN (qui a une structure H4-like). Cette interaction d'auto-inhibition est levée par la fixation au nucléosome. Le lobe 2 pourra alors interagir avec la queue de l'histone H4 (servant d'amarrage). Ce mécanisme d'inhibition est également visible pour CHD1 de levure, où les chromodomaines viennent se replier sur la tête ATPase. De même, ce mécanisme d'inhibition est aboli par la liaison au nucléosome et un mécanisme d'amarrage avec H4 est aussi visible.

Cependant pour CHD1L, la présence du nucléosome n'a pas été montré comme suffisante pour casser ce mécanisme d'auto-inhibition et activer le remodeleur. En effet, il semblerait que ce soit la liaison du PARP1+NAD⁺ (créant le PAR) ou du PARP1-PARylé, qui permet un changement conformationnel du remodeleur et son activation (Lehmann et al. 2017) (Hari R. Singh et al. 2017).

Ainsi, dans les deux papiers, les tests montrent que le complexe d'auto-inhibition est capable de fixer et d'hydrolyser l'ATP, mais que le remodelage est uniquement possible en présence de PAR ou PARP1-PARylé. Ils ont également montré que le macrodomaine est essentiel au remodelage de la chromatine.

De plus, la littérature n'a pas fait état d'expériences sur la liaison au nucléosome, mais uniquement sur son remodelage. C'est pour cela que je me suis tout d'abord intéressée à cette étape de fixation au nucléosome par CHD1L.

5. Liaison au nucléosome

a. CHD1L Nter + CterFL

Pour ce test de fixation au nucléosome, j'ai utilisé le complexe impliqué dans le mécanisme d'auto-inhibition, CHD1L Nter + CterFL, stabilisé avec l'AGS. Ce test a été fait en l'absence de PAR.

Nous voyons, sur le gel de retardation, que le complexe CHD1L Nter+CterFL semble bien capable de lier le nucléosome, mais également l'ADN 601 libre. Cette liaison n'est visible qu'avec le second ratio, où il y a environ 6 fois plus de CHD1L Nter+CterFL que de nucléosome. Il serait utile de tester des ratios intermédiaires, afin de voir à quel moment le décalage de la bande est visible. Le fait que ce *shift* ne soit pas visible avec un ratio 1 :1 n'est pas très surprenant et est certainement lié à la difficulté d'estimer avec précision la quantité de nucléosome formé lors de la réaction d'assemblage.

Ainsi, CHD1L Nter+CterFL/AGS est bien capable de lier le nucléosome mais semble également lier l'ADN 601 libre.

Il est également possible que cette fixation soit principalement médiée par le macrodomaine, impliquant un mode de fixation différent des autres remodeleurs. En effet, il a été montré que le macrodomaine seul peut lier le nucléosome avec une affinité de 2 μ M (Lehmann 2017) (ainsi que l'ADN linker, mais mon échantillon de nucléosome n'en contient pas). Cependant il n'existe pas de données, à ma connaissance, sur la fixation du macrodomaine de CHD1L à l'ADN libre. D'autres macrodomaines ont été trouvés comme pouvant lier l'ADN dans un contexte de régulation de la transcription (W. Han, Li, et Fu 2011).

Il est peu probable qu'il y ait eu une dissociation du complexe CHD1L Nter+CterFL, car sur gel SDS page les deux protéines sont toujours bien présentes. Cette hypothèse reste tout de même envisageable car je n'ai pas vérifié le contenu de la bande de gel shift par spectrométrie de masse.

Il est également peu probable que CHD1L soit activé *in vitro* sans la présence de PARP et NAD⁺. En effet, dans les publications de Singh 2017 et de Lehmann 2017, des essais de remodelage (translocation de nucléosome) ont montré que le complexe d'auto-inhibition n'est pas capable de remodeler en absence de PARP1 et de son cofacteur NAD⁺.

Au vu de nos résultats, nous proposons un modèle selon lequel CHD1L Nter+Cter se fixe tout d'abord en conformation inactive au nucléosome. Son activation se fait dans un second temps grâce à la fixation du PAR au macrodomaine. Cette fixation permet de lever son mécanisme d'auto-inhibition et de libérer le macrodomaine entraînant ainsi l'activation de CHD1L. De ce fait, cette activation se ferait potentiellement post-fixation au nucléosome. Le

remodelage peut ensuite être effectué, le macrodomaine servant d'ancrage est nécessaire pour coupler efficacement la translocation de l'ADN induite par l'hydrolyse l'ATPase et ainsi la translocation des nucléosomes.

Mon modèle ne coïncide pas avec ce qui a été proposé précédemment (Lehmann et al. 2017). Dans leur modèle, la PAR permet tout d'abord l'activation du remodeleur, qui se fixe au nucléosome dans un second temps. CHD1L est donc fixé sous sa forme active au nucléosome.

Les deux modèles sont plausibles, il est nécessaire de poursuivre les expériences afin de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans la fixation de CHD1L sur le nucléosome.

Ainsi, CHD1L semble être différent des autres remodeleurs. En effet, comme nous l'avons vu précédemment pour la plupart des remodeleurs la liaison au nucléosome semble induire l'activation du remodeleur, ce qui ne semble pas être le cas pour CHD1L où la liaison de PAR est nécessaire.

L'obtention de la structure de CHD1L Nter+CterFL lié au nucléosome permettrait de déterminer les positions et les conformations de la tête ATPase et du macrodomaine. Au vu des faibles quantités de complexes utilisées (0.4 µg de nucléosome et 2.4 µg de CHD1L), des approches de cryo-microscopie électronique devraient être envisagées.

b. CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL et spéculations

Il serait important d'effectuer cette expérience de retardation sur gel avec le complexe d'auto-inhibition CHD1L Nter-Lobe2 + CterFL. Cependant cette dernière expérience n'a pas été effectuée par manque de substrat nucléosomal et par manque de temps pour en re-préparer.

Pour les futures expériences, il faudrait tester l'activité de remodelage des deux complexes en présence de PARP1+NAD⁺.

Si le complexe CHD1L Nter_Lobe2 + CterFL n'est pas capable de remodelage (ce qui serait justifié car il semblerait surprenant qu'il puisse lier l'ATP), **cela signifierait que le rôle de CHD1L dans le sauvetage du phénotype en poisson zèbre est différent de celui de remodeleur. Par conséquent cette activité ATP-indépendante de CHD1L serait la plus importante pour le développement neuronal, mais aussi de fait pour la fonction générale de CHD1L au sein de l'organisme.**

De plus, si CHD1L Nter-Lobe2 + CterFL est tout de même capable de se fixer au nucléosome, cela signifierait que CHD1L Nter-Lobe2 + CterFL pourrait par exemple servir de plateforme de signalisation pour recruter d'autres effecteurs protéiques. **Cela signifierait que CHD1L pourrait avoir des fonctions encore méconnues à ce jour.**

Il ne s'agit ici que d'une spéculation. Cependant, il a été vu dans la littérature que les macrodomaines peuvent jouer des rôles dans la régulation transcriptionnelle. Ils peuvent ainsi avoir un rôle dans l'activation de la transcription, en fonctionnant comme des co-activateurs de facteurs de transcription spécifiques. De même, la liaison d'un macrodomaine au niveau d'un promoteur, pourrait avoir un rôle dans la répression transcriptionnelle (W. Han, Li, et Fu 2011).

Grâce à la base de données STRING, qui permet d'étudier les interactions protéines/protéines, j'ai vérifié si CHD1L interagissait potentiellement avec des facteurs de transcription. Cependant, les interactions de CHD1L, dans cette base de données, sont uniquement des interactions en lien avec son rôle dans la réparation de l'ADN. Ce qui concorde avec son rôle précoce dans la relaxation de l'ADN après un dommage, mais pas dans ce rôle de régulateur hypothétique.

C. Objectif 3 : Effet de la mutation R392H

1. Mutations de CHD1L disponibles dans la littérature

Dans la littérature, l'effet de plusieurs mutations (SNPs) impliquées dans le cancer et notamment les HCC a été étudié. Il s'agit principalement de mutations du macrodomaine R857E, R857Q, R860W/R842H et d'une mutation du lobe 2, D340Y (COSMIC Database <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) (Hari R. Singh et al. 2017) (Lehmann et al. 2017). Ces mutations ont été montrées comme déstabilisant l'interaction entre la tête ATPase et le macrodomaine, permettant un remodelage de la chromatine constant et ne nécessitant plus l'activation du PAR. De plus, certaines de ces mutations du macrodomaine ont également été montrées comme empêchant le recrutement de CHD1L au niveau du site de cassure de l'ADN.

La mutation que nous avons étudiée est une mutation ponctuelle à l'état homozygote dans le gène de CHD1L qui est inconnue des bases de données d'individus sains. Cette mutation n'est pas impliquée dans les cancers, mais dans des phénotypes neurodéveloppementaux et se distingue donc des mutations déjà étudiées. Il s'agit à notre connaissance de la première mutation de CHD1L impliquée dans des maladies neurodéveloppementales humaines.

2. Rôle de la mutation R392H sur CHD1L et sur le mécanisme d'auto-inhibition

J'ai donc montré que cette mutation R392H entraîne une expression et/ou solubilité et/ou stabilité réduite par rapport à la protéine CHD1L non mutée.

On observe aussi une diminution de l'interaction entre les domaines CterFL et Nter_Lobe2 du fait de la mutation R392H. Ces deux domaines étant impliqués dans le mécanisme d'auto-inhibition, la mutation R392H du lobe 2 peut donc altérer ce mécanisme, bien qu'elle n'abolisse pas entièrement cette interaction.

Cette expérience faite en *singlemate* devra donc être répétée, en y incluant plus de contrôle, notamment GST-CHD1L-Lobe 2 +/- R392H seul.

Afin d'avoir une vision plus complète, il serait également important de muter la partie N-terminale entière, afin d'étudier l'impact de la mutation sur l'interaction entre CHD1L Nter R392H et la partie CterFL.

Nous pourrions alors également entreprendre de nombreuses manipulations : fixation au nucléosome, remodelage de la chromatine par essai de translocation, mais également essayer de déterminer la structure de ce complexe de manière identique à ce qui a été discuté précédemment.

Ce mutant R392H semble donc avoir un effet partiel sur CHD1L qui est toujours exprimé/soluble/stable mais de manière réduite. Il en est de même pour l'interaction impliquée dans le mécanisme d'auto-inhibition, où cette mutation tend à entraîner une diminution de l'interaction.

Ces résultats concordent ainsi avec les résultats de collaboratrices qui *in vivo* chez le poisson zèbre observent une mutation hypomorphe.

3. Localisation de la mutation

Si nous considérons le modèle MC proposé précédemment par (Lehmann et al. 2017) (Figure 90), nous voyons que notre mutation se situe, au niveau de l'interface d'interaction avec le macrodomaine, à côté du résidu E391. Notre résidu muté est ainsi une arginine basique qui est mutée par une histidine également basique dans ce patch acide. Cependant ce modèle structural n'étant pas disponible, il est difficile d'en conclure quoi que ce soit d'autre.

Je me suis donc intéressée à la position de l'arginine équivalent de CHD1L dans la structure de scChd1 avec le nucléosome (Farnung et al. 2017) (PDB : 5O9G). La Figure 91, permet de localiser cette arginine, qui correspond à l'arginine R525 de scChd1. Nous voyons que cette dernière semble coordonner deux acides aspartiques (D510 et D527). De plus, D510 semble être impliqué dans la liaison directe avec la queue de l'histone H4 (R17). Il est à noter que la chaîne latérale de cette R17 de H4 n'est pas représentée. De plus, j'ai tenté de mesurer des distances entre ces différents acides aminés, mais ces données ne sont pas réellement exploitables car la résolution de la structure globale est de 4,8Å, ce qui ne permet pas d'aller à ce niveau de détail.

Ainsi, cette arginine R525 scChd1/R392 hCHD1L semble jouer un rôle important de coordination au sein du lobe 2 et est probablement nécessaire au bon repliement de ce lobe 2.

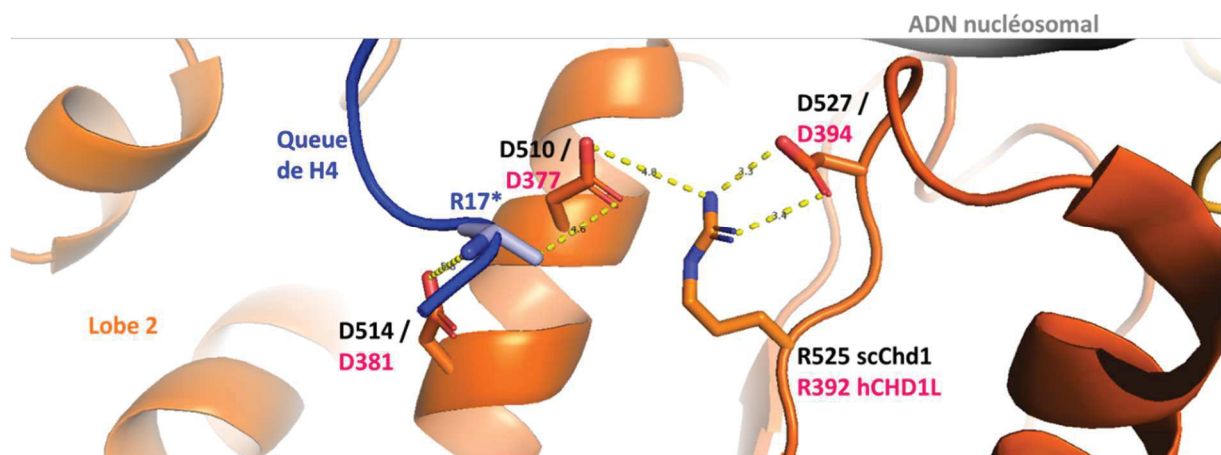


Figure 91 : Structure de scChd1 centrée sur le résidu R525 équivalent du résidu R392 de hCHD1L

R17* pas de chaîne latérale dans la structure car la résolution est trop faible

Réalisé avec Pymol

J'ai ensuite muté ce résidu en histidine dans coot, j'ai également reconstruit le résidu arginine 17 de H4. Il est alors possible que le résidu H525 ne puisse plus coordonner les résidus D510 et D527.

De plus dans certaines conformations, la chaîne latérale de R17 de H4 semble être trop proche de H525, pouvant potentiellement entraîner un clash stérique et une déstabilisation de l'interaction.

D. Ouverture sur la famille CHD

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive de ce chapitre, les maladies neurodéveloppementales, telles que le trouble de spectre autistique, sont des maladies d'étiologie complexe et multifactorielles. Elles peuvent générer plusieurs comorbidités telles que la déficience intellectuelle, des anomalies congénitales, des malformations cranio-faciales, des problèmes gastro-intestinaux, des malformations cardiaques et plusieurs caractéristiques anthropométriques, incluant la circonférence de la tête (micro- et macrocéphalie).

Cette étude a permis de montrer pour la première fois que CHD1L est un acteur impliqué dans les phénotypes neurodéveloppementaux associées à la région 1q21.1., impactant la taille de l'encéphale et la stature. De plus, **CHD1L semble être le seul gène de cette région à avoir un effet sur la taille.**

Par ailleurs, d'autres membres de la famille CHD sont impliqués dans les phénotypes neurodéveloppementaux.

CHD1 a récemment été associé aux troubles neurodéveloppementaux. Ces mutations, *de novo* pour la plupart, ont été trouvées dans un ensemble de patients atteints d'autisme, d'apraxie de la parole, de retard de développement et de dysmorphie faciale (Pilarowski et al. 2018).

Le complexe NuRD (contenant les protéine CHD3 ou CHD4) a également récemment été impliqué dans les troubles neurodéveloppementaux associés à la macrocéphalie (Pierson et al. 2019).

Pour finir, CHD8 a récemment été associé aux troubles du spectre autistique (O'Roak et al. 2012) (Bernier et al. 2014).

Ainsi cette famille semble être un acteur majeur impliqué dans les troubles neuro-développementaux. De ce fait, l'étude des CHD est essentielle afin de mieux comprendre ces pathologies complexes.

Conclusion

Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, j'ai étudié plusieurs effecteurs épigénétiques, qui participent au remodelage de la chromatine, grâce à des mécanismes ATP-dépendants.

Mon premier objectif a porté sur l'étude de l'ensemble des interactions entre le variant d'histone H2A.Z et ses chaperons spécifiques YL1 et ANP32E, qui interagissent physiquement et fonctionnellement avec les remodeleurs p400/TIP60 et SRCAP.

Les précédents travaux collaboratifs de mon équipe ont permis de déterminer la structure d'une petite partie de ces chaperons, leur domaine ZID, complexée à la paire d'histones variante H2A.Z/H2B. La caractérisation biophysique de l'interaction entre YL1 et H2A.Z/H2B, ainsi que celle de plusieurs mutants de H2A ont également été réalisées.

Ces travaux ont mis en lumière la nécessité de continuer la caractérisation de ces chaperons humains, notamment ANP32E, ainsi que l'importance de caractériser le modèle humain dans la biologie de H2A.Z, du fait des différences observées selon les espèces.

J'ai donc effectué la caractérisation biophysique de l'interaction entre ANP32E et H2A.Z/H2B. Mes résultats ont permis de comparer ces deux chaperons-ZID et de caractériser leurs différences de liaison à H2A.Z/H2B. Ainsi, la liaison d'YL1-ZID à H2A.Z/H2B semble dix fois plus forte que celle d'ANP32E1-ZID, avec respectivement des K_D de 2.3 à 4,4 nM et de 18 à 30 nM (selon les étiquettes et les méthodes utilisées). D'un point de vue thermodynamique, le mode d'interaction paraît identique avec une contribution enthalpique majoritaire. Ce résultat est en accord avec les données structurales précédemment obtenues, où YL1 interagit avec un mécanisme similaire mais plus largement avec la paire d'histones H2A.Z/H2B.

De plus, les études mutationnelles que j'ai réalisées suggèrent que l'absence d'un résidu glycine et le résidu T82I de H2A.Z sont essentiels à la reconnaissance et à la spécificité de ces deux chaperons. Cependant, la spécificité d'ANP32E pour H2A.Z par rapport à H2A fait intervenir d'autres déterminants, qui ne sont pas nécessaires pour YL1, et qu'il reste à caractériser. Ainsi, ces résultats nous donnent une première explication sur la façon dont ces deux chaperons peuvent avoir des rôles opposés, malgré leur mécanisme structural quasi similaire pour la liaison avec H2A.Z/H2B.

J'ai également montré que le domaine LRR d'ANP32E pourrait jouer un rôle dans le processus d'éviction d'ANP32E, renforçant ainsi la différence avec YL1.

J'ai résolu la structure d'ANP32E LRR et ai montré que ce domaine, en plus de son rôle d'interaction dans le complexe de remodelage de la chromatine p400/TIP60 et de son

potentiel rôle stabilisateur dans l'interaction entre ANP32E-ZID et H2A.Z/H2B, pourrait également avoir un rôle dans l'interaction et le chaperonnage de H3/H4.

Afin d'avoir une vision d'ensemble de ces chaperons en condition nucléosomique, j'ai mis au point la production, la purification et la reconstitution des nucléosomes canoniques et H2A.Z variant. Ce développement du nucléosome servira à plusieurs autres projets de l'équipe.

J'ai ainsi pu voir qu'ANP32E-ZID ne peut pas se lier directement au nucléosome H2A.Z. Ce résultat montre l'importance de l'implication au préalable du complexe de remodelage p400/Tip60. Des expériences sont encore nécessaires pour compléter ces résultats, notamment avec le domaine LRR d'ANP32E et YL1.

Mes travaux ont permis de poser les bases d'un modèle d'éviction d'H2A.Z/H2B par ANP32E. Cependant, les connaissances sur l'implication des remodeleurs p400/Tip60 et SRCAP dans les processus de dépôt et d'éviction d'H2A.Z restent encore limitées et nécessiteront de plus amples études.

Mon travail contribue donc à une meilleure compréhension de processus de régulation épigénétiques fondamentaux, permettant d'aborder les aspects mécanistiques et fonctionnels de la biologie d'H2A.Z et à plus long terme pouvant servir à leur modulation pharmacologique.

Mon second objectif a porté sur la caractérisation du facteur de remodelage de la chromatine CHD1L, unique parmi les remodeleurs. Notre attention s'est portée sur ce remodeleur grâce aux travaux préliminaires de nos collaboratrices de l'équipe du Dr. Christelle GOLZIO à l'IGBMC. Leurs travaux ont montré, grâce à des modélisations faites chez le poisson zèbre leur permettant de suivre plusieurs de traits anthropométriques et anomalies congénitales, que le gène *CHD1L* est un contributeur majeur aux phénotypes neuro-anatomiques et neurodéveloppementaux associés au CNV en position 1q21.1 incluant des atteintes au niveau du volume crânien et de la stature.

Ma contribution a permis d'étendre ces travaux et a notamment conduit à la mise en lumière et la discrimination des différents isoformes, long et court, de CHD1L. L'isoforme court de CHD1L ne possédant pas le lobe 1 de la tête ATPase, il n'est probablement pas capable de lier et d'hydrolyser l'ATP et ne peut donc pas être considéré comme un remodeleur *bona fide*.

Toutefois, nos collaboratrices ont montré que l'isoforme court de CHD1L, au même titre que l'isoforme long (CHD1L entier et fonctionnel), permet de sauver le phénotype chez le poisson zèbre. Cette découverte nous interroge sur les fonctions de CHD1L dans ces phénotypes et suggère que la fonction ATPase n'est pas essentielle.

J'ai ensuite tenté de caractériser biochimiquement et structuralement ces deux isoformes de CHD1L afin d'investiguer leurs différences au niveau moléculaire. Malheureusement, les

résultats obtenus au cours de cette étude n'ont pas permis l'obtention d'information structurale sur CHD1L, notamment sur le macrodomaine qui est unique parmi les remodeleurs. Mon étude a tout de même permis de faire progresser la compréhension biochimique de ce remodeleur.

D'autant plus que je me suis également intéressée au mécanisme d'auto-inhibition présent chez CHD1L, entre sa tête ATPase et son macrodomaine, permettant d'inhiber sa fonction de remodelage. Mes résultats soulignent que le lobe 2 de la tête ATPase est nécessaire et suffisant à la mise en place du mécanisme d'auto-inhibition avec le macrodomaine.

Cette découverte nous a permis d'avoir une première idée mécanistique qui permettrait d'expliquer comment les isoformes court et long de CHD1L peuvent avoir une fonction identique. Ainsi, mes résultats sont en faveur d'une implication de l'interaction d'auto-inhibition, dans le sauvetage du phénotype, sans cependant faire utilisation d'une activité ATPase. Cela signifierait que CHD1L pourrait avoir des fonctions encore méconnues à ce jour.

Mes travaux mettent également en avant une fixation potentielle de CHD1L au nucléosome sous sa forme auto-inhibée. CHD1L semble donc se distinguer des autres remodeleurs, pour lesquels les mécanismes d'auto-inhibition sont levés par la reconnaissance au nucléosome. Il est donc possible que CHD1L ait un mode de fixation différent.

Pour finir, l'étude d'une mutation clinique provenant d'un patient avec de sévères troubles neurodéveloppementaux (troubles du spectre autistique) est également en faveur du rôle de CHD1L dans les phénotypes neurodéveloppementaux.

J'ai ainsi étudié l'impact de la mutation sur les isoformes long et court de CHD1L, ainsi que sur le potentiel mécanisme d'auto-inhibition. Mes résultats montrent un effet partiel de cette mutation sur les protéines, avec un complexe impliqué dans le mécanisme d'auto-inhibition dont la formation semble affaiblie. Mes résultats concordent avec ceux de nos collaboratrices, suggérant une mutation hypomorphe.

Nos résultats collaboratifs permettent donc de confirmer que CHD1L est bien un acteur majeur associé aux phénotypes neurodéveloppementaux de la région 1q21.1 distale. De plus, mes résultats soulignent le caractère unique du remodeleur CHD1L tant en composition, qu'en mécanisme d'action. L'obtention d'informations structurales, aspect sur lequel mon équipe continuera à travailler, devrait permettre de révéler les mécanismes moléculaires de CHD1L.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Posters réalisés au cours de la thèse

Le premier poster résume rapidement les expériences réalisées sur mon premier sujet de thèse sur le récepteur nucléaire HNF4 α .

Le deuxième poster présente une partie des résultats sur le variant d'histone H2A.Z et ses chaperons YL1 et ANP32E.

Les deux posters sont visibles sur les pages suivantes.



Biochemical and biophysical characterization of the HNF4 α -TAF4-TAF12 complex



Klein P. and Romier C.

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire – 1 rue Laurent Fries – BP 10142 – 67404 Illkirch CEDEX – FRANCE – kleinp@igbmc.fr



INTRODUCTION

HNF4 α an atypical nuclear receptor ..

HNF4 α (NR2A1) is a member of the nuclear receptor superfamily harboring a classical organization (Fig. 1). However HNF4 α distinguishes itself from other nuclear receptors since its endogenous activity appears to be independent from ligand binding but rather linked with co-activator binding¹⁻²

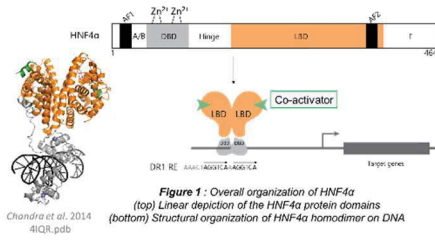


Figure 1 : Overall organization of HNF4 α

Ligand : orphan NR \rightarrow 14-18 C fatty acids
Co-activators: p160 family (eg. TIF2), CBP/p300, ... \rightarrow Ligand insufficient and co-activator needed for transactivation
LxxLL motif

.. Involved in many cellular processes

HNF4 α displays pleiotropic roles and is essential for the development, differentiation and functionality of the liver, the pancreas, the colon, the intestine and several other organs. Therefore, it is not surprising that HNF4 α is linked to several pathologies, including diabetes, cancer and chronic inflammation³. Mutation in HNF4A is responsible for Maturity Onset Diabetes of the Young 1 or MODY1 (Fig. 2).



Figure 2 : MODY1 mutations found in the human HNF4 α 2. X, stop codon; Is, frameshift; del, deletion; ins, insertion.

.. Which was shown to directly interact with TAF4/TAF12 heterodimer

A major question concerning HNF4 α is to understand in molecular terms how this nuclear receptor recruits the general transcription machinery. Preliminary collaborative work with Irwin Davidson's team at the IGBMC suggested a novel, direct interaction between the LBD of HNF4 α and the TAF4/TAF12 heterodimer from the general transcription factor TFIID⁴ (Fig. 3).

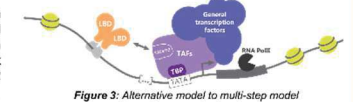


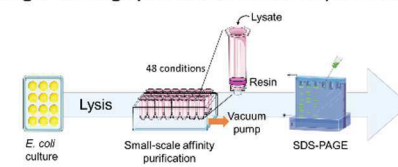
Figure 3: Alternative model to multi-step model for nuclear receptor function

Objectives:

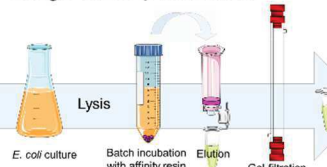
- To reconstitute a stable HNF4 α LBD-TAF4-TAF12 complex \rightarrow Co-expression vs simple expression in *E. coli*
- Biophysical characterization of this complex \rightarrow Use of a co-activator peptide
- Biophysical characterization of this complex \rightarrow Interaction study between either WT or MODY1 mutated HNF4 α LBD and TAF4/TAF12 \rightarrow Need for a robust and accurate method to study protein-protein interactions
- Structure determination of the complex by X-ray diffraction

METHODOLOGICAL PIPELINE

High-throughput small-scale expression test



Large-scale purification



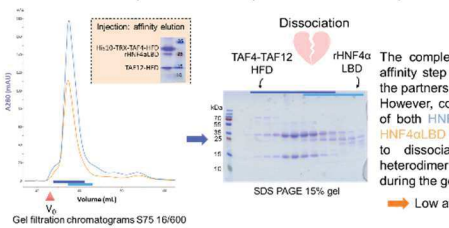
Biophysical characterization



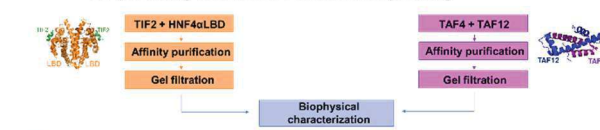
RESULTS

1 Purification strategies:

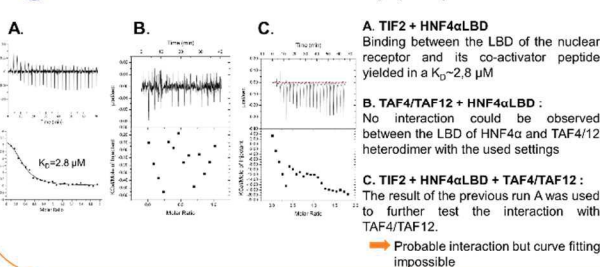
- Co-expression and purification of all partners



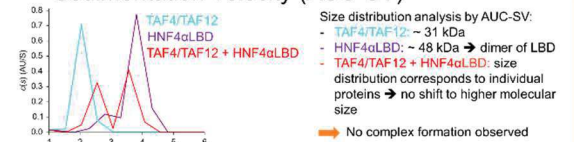
- Sequential purification : interaction probing



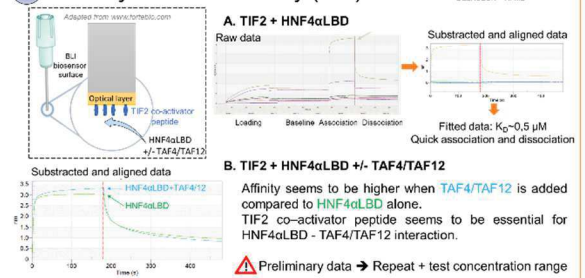
2 Isothermal Titration Calorimetry (ITC)



3 Analytical UltraCentrifugation - Sedimentation Velocity (AUC-SV)



4 Bio-Layer Interferometry (BLI)



Conclusion:

- HNF4 α LBD +/-TIF2 + TAF4/TAF12 complex is rather weak or transient
- TIF2 co-activator peptide seemed to be essential for HNF4 α LBD - TAF4/TAF12 interaction
- BLI plausible robust technique to test WT vs MODY1 mutants HNF4 α LBD.
- BLI has advantages compared to ITC \rightarrow low protein quantity, kon/koff
- My results suggest that the complex is rather weak with quick association and dissociation rates, which is a current obstacle to the analyses of this complex by structural means.

Perspectives and upcoming:

- Validate the BLI experiments as an accurate and robust technique
- Determine specifically the interaction parameters of TAF4/TAF12 \rightarrow sequential associations in BLI
- Testing of MODY1 mutants
- Investigate the plausible role of PTM in the complex formation \rightarrow Insect cells – baculovirus expression system

REFERENCES

- Duda, K., Chi, Y.-I., & Shoelson, S. E. Structural basis for HNF-4 α activation by ligand and coactivator binding. *J. Biol. Chem.* 279, 23311–23316 (2004).
- Dhe-Paganon, S., Duda, K., Iwamoto, M., Chi, Y.-I., & Shoelson, S. E. Crystal structure of the HNF4 α ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J. Biol. Chem.* 277, 37973–37976 (2002).
- Babeu, J.-P., & Boudreau, F. Targeting the Nuclear Receptor HNF4 α as a Potential Therapy for Gut Inflammation and Cancer. In *Therapeutic Targets for Inflammation and Cancer 77–97*, WORLD SCIENTIFIC (2016).
- Alpern, D. et al. TAF4, a subunit of transcription factor II D, directs promoter occupancy of nuclear receptor HNF4A during post-natal hepatocyte differentiation. *eLife* 03613. (2014)
- http://www.sladeklab.ucr.edu
- www.fortebio.com
- Banque d'images PowerPoint SERVIER



Interaction of histone variant H2A.Z with its chaperones YL1 and ANP32E: link to chromatin remodelling and disease

Pernelle KLEIN, Nataliia ALEKSANDROVA, Martin MAREK and Christophe ROMIER
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France
klein@igbmc.fr



Introduction

H2A.Z histone variant

Epigenetic effectors, like histone variants, and chaperones cooperate to regulate chromatin structure and nuclear processes. H2A.Z is a histone variant of canonical H2A, that replaces H2A in nucleosome formation. H2A.Z has unique and important functions as depicted in Figure 1.

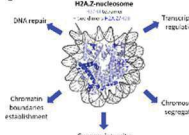


Figure 1: Structure of H2A.Z-containing nucleosome and overview of H2A.Z biology. Adapted from [1] and [2].

H2A.Z in diseases

Several studies have highlighted the implication of H2A.Z in cancer, notably in melanoma, hepatocellular carcinoma, and breast cancer [3,4]. Thus H2A.Z represents a pharmacologically attractive target.

H2A.Z variant has two chaperones : YL1 and ANP32E

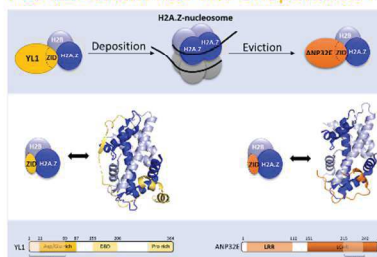


Figure 2 : (Top) Scheme of H2A.Z deposition and eviction by YL1 and ANP32E. (Middle) Structure of YL1-ZID and ANP32E-ZID with H2A.Z/H2B histone pair. (Bottom) Organization of chaperones YL1 and ANP32E. ZID: H2A.Z-interacting domain, LRR: Leucine-Rich Repeat

We identified and analyzed the mode of action of two H2A.Z chaperones: YL1 and ANP32E [5,6]. YL1 deposits the H2A.Z/H2B histone variant pair in the nucleosome, whereas ANP32E removes it from the nucleosome (Figure 2 top).

Our work showed that sub-domains (H2A.Z-Interacting Domains; ZID) of YL1 and ANP32E similarly recognize H2A.Z despite their opposite functional roles (Figure 2 middle).

Therefore, it is essential to understand precisely how the different domains of these chaperones are involved in H2A.Z/H2A.Z exchange. I focused on ANP32E Leucine-Rich Repeat (LRR) (Figure 2 bottom).

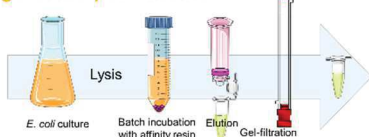
Our goal is to decipher the mode of action of both chaperones to propose an exchange model of H2A by H2A.Z onto the chromatin, to be able to tackle its pharmacological modulation.

Objectives:

1. Characterize the interactions between ANP32E-ZID or YL1-ZID with H2A.Z/H2B histone variant pair.
2. Understand the role of ANP32E LRR in the eviction process.
3. Characterize the interactions of both chaperones with H2A.Z variant nucleosome.

Methods

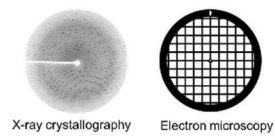
Large-scale purification



Biophysical characterization



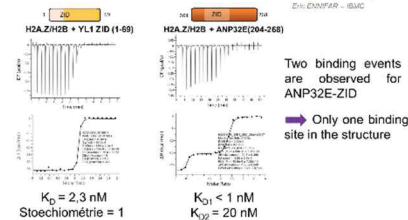
Structure determination



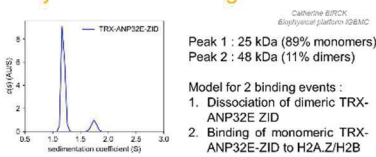
Results

Part 1: Interaction of ZIDs with H2A.Z/H2B pair

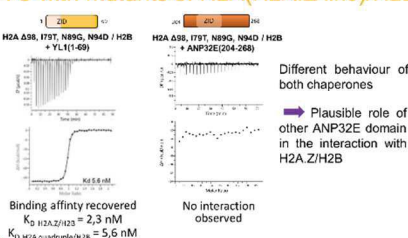
Isothermal Titration Calorimetry (ITC)



Analytical Ultracentrifugation - SV

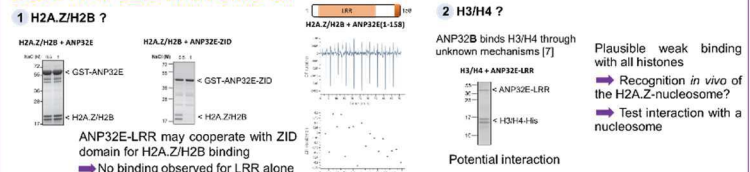


ITC with mutants of H2A(H2A.Z like)/H2B

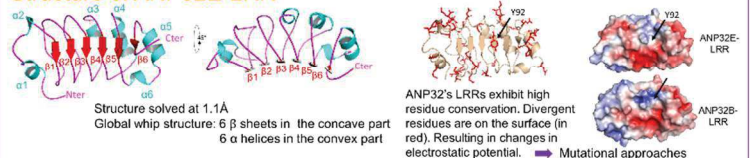


Part 2: What is the role of ANP32E-LRR?

Does ANP32E-LRR bind to:



Structure of ANP32E-LRR



Part 3: Interaction of chaperones with H2A.Z-nucleosome



Conclusion :

- ANP32E-ZID & YL1-ZID have different behavior and different affinities for H2A.Z/H2B dimer
- K_D YL1 = 2 nM vs. K_D ANP32E = 20 nM
- ANP32E-LRR structure was solved and LRR domain may play a recognition role of the octamer for eviction of H2A.Z/H2B
- H2A.Z nucleosome was successfully reconstituted in small scale

Upcoming and Perspectives :

- Purification of large scale nucleosome
- Biochemical, biophysical and structural characterization of chaperon-nucleosome complexes

References

- [1] J. Zlatanova et al. *Trkair*, Structure, vol. 16, no 2, p. 166-173, févr. 2008.
- [2] P. Bilóni et al. *Gene*, BBA - Gene Regulatory Mechanisms, vol. 1816, no 3, p. 290-302, mars 2012.
- [3] C. Vandebasse et al. *Cell Mol Life Sci*, vol. 71, no 3, p. 379-394, févr. 2014.
- [4] D. Comajo et al. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 10, no 3, p. 58, mars 2018.
- [5] A. Ober et al. *Nature*, vol. 525, no 7555, p. 648-653, janv. 2014.
- [6] C. M. Lantieri et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 23, no 4, p. 308-316, avr. 2016.
- [7] N. Tochio et al. *Journal of Molecular Biology*, vol. 401, no 1, p. 97-114, août 2010.



Annexe 2 : Réactifs utilisés en routine au laboratoire

Souches bactériennes

Souche	Utilisation	Genotype
DH5 α	Clonage	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>) <i>phoA supE44</i> <i>thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>
Top10 one shot	Clonage	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU</i> <i>galK rpsL(StrR) endA1</i> <i>nupG</i>
BL21 (DE3)	Expression	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (<i>r⁻m⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)
BL21 (DE3) pRARE2	Expression	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> pRARE2 (Cam ^R)
ArcticExpress	Expression	E. coli B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (<i>r⁻ m⁻</i>) <i>dcm⁺ Tet^r gal endA Hte</i> [cpn10 cpn60 Gent ^r]

Milieux de cultures

- Milieu LB
 - 5g/L NaCl
 - 10g/L tryptone
 - 5g/L extrait de levure
- Milieu LB agar:
 - Milieu LB supplémenté de 15g/L d'agar
- Milieu 2xLB
 - Milieu LB doublement supplémenté
- Milieu TB
 - 12 g/L tryptone 12 g/L
 - 24 g/L extrait de levure
 - 5 g/L glycérol
 - 89 mM tampon phosphate KH₂PO₄/K₂HPO₄

- Milieu Graffinity® (développé par la société Graffinity Pharmaceuticals GmbH) Ce milieu se décompose en deux milieu le premier permettant la croissance cellulaire et le second permettant l'induction

Milieu A :	Milieu B
2xLB 0.5% Glucose + antibiotique adéquat	2xLB 0.6% Lactose 20 mM Hepes pH 7

- Milieu d'auto-induction TB (FORMEDIUM AUTOINDUCTION MEDIA TB BASE INCLUDING TRACE ELEMENTS »)

12g/L Tryptone
 24g/L Extrait de levure
 3,3 g/L Sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄
 6,8g/L Phosphate de monopotassium KH₂PO₄
 7,1 g/L Hydrogénophosphate de sodium Na₂HPO₄
 0,5 g/L Glucose
 2 g/L Lactose
 ? g/L Sulfate de magnésium MgSO₄
 0,003 g/L oligoélément

Annexe 3 : Tableau des données cristallographiques d'ANP32E-LRR

Échantillon	Protéine	ANP32E-LRR
Traitement	Résolution (Å)	25.4 - 1.244 (1.288 - 1.244)
	Groupe d'espace	P 1
	Paramètres de maille	29.678 32.731 40.735 88.948 73.851 66.887
	Réflexions totales	120090 (8885)
	Réflexions uniques	35138 (3102)
	R-merge	0.05168 (0.3119)
	R-meas	0.06129 (0.3852)
	R-pim	0.03257 (0.2217)
	CC_{1/2}	0.997 (0.929)
	CC*	0.999 (0.982)
	Redondance	3.4 (2.9)
	Complétude (%)	92.82 (81.55)
	I/σ₁	13.36 (2.99)
Affinement	Résolution (Å)	
	Réflexions utilisées	35122 (3102)
	Wilson B (Å²)	11.30
	Réflexions utilisées pour R-free	1999 (176)
	R-work (%)	15,26 (22,32)
	R-free (%)	17,67 (25,77)
	CC(work)	0.972 (0.938)
	CC(free)	0.956 (0.831)
	Atomes	
	Macromolécules	1251
	Solvant	210
	Résidus de protéine	153
Validation	RMSD	
	Bonds lengths (Å)	0.009
	Bond angles (°)	1,29
	Ramachandran favored (%)	94.70
	Ramachandran allowed (%)	5.30
	Ramachandran outliers (%)	0.00
	Rotamer outliers (%)	0.00
	Clashscore	1.58
	Average B-factor (Å²)	16.79

Annexe 4 : Procédure d'assemblage NEB du nucléosome à petite échelle

Source : <https://www.nebiolabs.com.au/protocols/2012/06/02/dilution-assembly-protocol-e5350>

Dilution Assembly Protocol (E5350)

Introduction

Reactions can be scaled up or down depending on the final nucleosome requirement. Methods for 50 pmol and 25 pmol are presented. If the scale is adjusted, it is important to also adjust 5 M NaCl addition such that the starting concentration in the reaction is 2 M NaCl. With sequential dilutions and incubation, the salt concentration is lowered to 0.25 M NaCl, allowing the octamer to bind the DNA and form the nucleosome core particle.

Materials Required but not Supplied

5 M NaCl

Dilution Buffer: 10 mM Tris, pH 8.0

6% Polyacrylamide gel with gel apparatus and gel buffer (ex: Invitrogen 6% DNA retardation gel)

100% Glycerol

TriDye™ 100 bp DNA Ladder ([NEB# N3271](#))

1X TBE

Protocol

For 50 pmol

This reaction, as described, can yield a maximum of 50 pmol nucleosome in 160 µl (0.3 pmol/µl; 0.3 µM nucleosome; 33.7 µg/ml protein).

1. Place 200 µl of Dilution buffer (10 mM Tris, pH 8.0) per reaction at room temperature.
2. Prepare the Reaction Assembly Mix on ice in the following order (for user-supplied substrate, suggested ratios have been included):

		For Optimizing User-supplied DNA Substrate		
	Control DNA Only (50 pmol)	0.5 to 1 Octamer to DNA	1 to 1 Octamer to DNA	1.5 to 1 Octamer to DNA
Water	1 µl	0 to 4.5 µl	0 to 7 µl	0 to 1.5 µl
5M NaCl	4 µl	6 µl	4 µl	2 µl
DNA	5 µl (10 µM)	50 pmol	50 pmol	50 pmol
20 µM Dimer	5 µl	2.5 µl	5 µl	7.5 µl
10 µM Tetramer	5 µl	2.5 µl	5 µl	7.5 µl
Total	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

3. *The Dimer and Tetramer are supplied in 2 M NaCl.*
4. Incubate reactions at room temperature for 30 minutes.
5. Add 7 μl room temperature dilution buffer to each reaction. This brings the reactions to 1.48 M NaCl, 27 μl total volume. Incubate at room temperature for 30 minutes.
6. Add 13 μl room temperature Dilution Buffer to each reaction. This brings the reactions to 1.0 M NaCl, 40 μl total volume. Incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Add 27 μl room temperature Dilution Buffer to each reaction. This brings the reactions to 0.6 M NaCl, 67 μl total volume. Incubate at room temperature for 30 minutes.
8. Add 93 μl room temperature Dilution Buffer to each reaction. This brings the reactions to 0.25 M NaCl, 160 μl total volume. Incubate at room temperature for 30 minutes.
9. Store samples at 4°C.
10. Use gel shift assay to analyze samples.

For 25 pmol

This reaction can yield a maximum of 25 pmol nucleosome in 80 μl (0.3 pmol/ μl ; 0.3 μM nucleosome; 33.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protein).

11. Place 100 μl of Dilution Buffer per reaction at room temperature.
12. Prepare the Reaction Assembly Mix on ice in the following order (for user-supplied substrate, suggested ratios have been included):

		For Optimizing User-supplied DNA Substrate		
	Control DNA Only (25 pmol)	0.5 to 1 Octamer to DNA	1 to 1 Octamer to DNA	1.5 to 1 Octamer to DNA
Water	0.5 μl	0 to 4.5 μl	0 to 7 μl	0 to 1.5 μl
5M NaCl	2 μl	3 μl	2 μl	1 μl
DNA	2.5 μl (10 μM)	25 pmol	25 pmol	25 pmol
20 μM Dimer	2.5 μl	1.25 μl	2.5 μl	3.75 μl
10 μM Tetramer	2.5 μl	1.25 μl	2.5 μl	3.75 μl
Total	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl

13. *The Dimer and Tetramer are supplied in 2 M NaCl.*

14. Incubate reactions at room temperature for 30 minutes.
15. Add 3.5 μl room temperature dilution buffer to each reaction. This brings the reactions to 1.48 M NaCl, 13.5 μl total volume. Incubate at room temperature for 30 minutes.
16. Add 6.5 μl room temperature Dilution Buffer to each reaction. This brings the reactions to 1.0 M NaCl, 20 μl total volume. Incubate at room temperature for 30 minutes.
17. Add 13.5 μl room temperature Dilution Buffer to each reaction. This brings the reactions to 0.6 M NaCl, 33.5 μl total volume. Incubate at room temperature for 30 minutes.
18. Add 46.5 μl room temperature Dilution Buffer to each reaction. This brings the reactions to 0.25 M NaCl, 80 μl total volume. Incubate at room temperature for 30 minutes.
19. Store samples at 4°C.
20. Use gel shift assay to analyze samples.

Bibliographie

Bibliographie

I. Articles scientifiques et revues

Adam, Maryse, François Robert, Marc Larochelle, et Luc Gaudreau. 2001. « H2A.Z Is Required for Global Chromatin Integrity and for Recruitment of RNA Polymerase II under Specific Conditions ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (18): 6270-79. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.18.6270-6279.2001>.

Adams, Paul D., Pavel V. Afonine, Gábor Bunkóczi, Vincent B. Chen, Ian W. Davis, Nathaniel Echols, Jeffrey J. Headd, L.-W. Hung, Gary J. Kapral, et Ralf W. Grosse-Kunstleve. 2010. « PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution ». *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66 (2): 213–221.

Adams, Paul D., Ralf W. Grosse-Kunstleve, L.-W. Hung, Thomas R. Ioerger, Airlie J. McCoy, Nigel W. Moriarty, Randy J. Read, James C. Sacchettini, Nicholas K. Sauter, et Thomas C. Terwilliger. 2002. « PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination ». *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 58 (11): 1948–1954.

Aguilar-Gurrieri, Carmen, Amédé Larabi, Vinesh Vinayachandran, Nisha A. Patel, Kuangyu Yen, Rohit Reja, Ima-O. Ebong, et al. 2016. « Structural Evidence for Nap1-Dependent H2A-H2B Deposition and Nucleosome Assembly ». *The EMBO Journal* 35 (13): 1465-82. <https://doi.org/10.15252/embj.201694105>.

Ahel, Dragana, Zuzana Hořejší, Nicola Wiechens, Sophie E. Polo, Elisa Garcia-Wilson, Ivan Ahel, Helen Flynn, et al. 2009. « Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodelling enzyme ALC1 ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5945): 1240-43. <https://doi.org/10.1126/science.1177321>.

Allis, C. David, Claiborne V. C. Glover, Josephine K. Bowen, et Martin A. Gorovsky. 1980. « Histone Variants Specific to the Transcriptionally Active, Amitotically Dividing Macronucleus of the Unicellular Eucaryote, *Tetrahymena Thermophila* ». *Cell* 20 (3): 609-17. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90307-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90307-4).

Almal, Suhani H., et Harish Padh. 2012. « Implications of Gene Copy-Number Variation in Health and Diseases ». *Journal of Human Genetics* 57 (1): 6-13. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.108>.

Altaf, Mohammed, Andréanne Auger, Julie Monnet-Saksouk, Joëlle Brodeur, Sandra Piquet, Myriam Cramet, Nathalie Bouchard, et al. 2010. « NuA4-Dependent Acetylation of Nucleosomal Histones H4 and H2A Directly Stimulates Incorporation of H2A.Z by the SWR1

Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (21): 15966-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.117069>.

Altucci, Lucia, et Marianne G. Rots. 2016. « Epigenetic drugs: from chemistry via biology to medicine and back ». *Clinical Epigenetics* 8 (mai). <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0222-5>.

Aranda, Sergi, Gloria Mas, et Luciano Di Croce. 2015. « Regulation of Gene Transcription by Polycomb Proteins ». *Science Advances* 1 (11): e1500737. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500737>.

Armache, Jean Paul, Nathan Gamarra, Stephanie L Johnson, John D Leonard, Shenping Wu, Geeta J Narlikar, et Yifan Cheng. 2019. « Cryo-EM structures of remodeler-nucleosome intermediates suggest allosteric control through the nucleosome ». Édité par Cynthia Wolberger, Sjors HW Scheres, et Sjors HW Scheres. *eLife* 8 (juin): e46057. <https://doi.org/10.7554/eLife.46057>.

Auger, Andréanne, Luc Galarneau, Mohammed Altaf, Amine Nourani, Yannick Doyon, Rhea T. Utle, Dominique Cronier, Stéphane Allard, et Jacques Côté. 2008. « Eaf1 Is the Platform for NuA4 Molecular Assembly That Evolutionarily Links Chromatin Acetylation to ATP-Dependent Exchange of Histone H2A Variants ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (7): 2257-70. <https://doi.org/10.1128/MCB.01755-07>.

Avery, Oswald T., Colin M. MacLeod, et Maclyn McCarty. 1944. « STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III ». *Journal of Experimental Medicine* 79 (2): 137-58. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>.

Ayala, Rafael, Oliver Willhoft, Ricardo J. Aramayo, Martin Wilkinson, Elizabeth A. McCormack, Lorraine Ocloo, Dale B. Wigley, et Xiaodong Zhang. 2018. « Structure and Regulation of the Human INO80–Nucleosome Complex ». *Nature* 556 (7701): 391-95. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0021-6>.

Babu, Arvind, et Ram S. Verma. 1987. « Chromosome Structure: Euchromatin and Heterochromatin ». In *International Review of Cytology*, édité par G. H. Bourne, K. W. Jeon, et M. Friedlander, 108:1-60. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61435-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61435-7).

Bagchi, Anindya, Cristian Papazoglu, Ying Wu, Daniel Capurso, Michael Brodt, Dailia Francis, Markus Bredel, Hannes Vogel, et Alea A. Mills. 2007. « CHD5 Is a Tumor Suppressor at Human 1p36 ». *Cell* 128 (3): 459-75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.052>.

Bannister, Andrew J., et Tony Kouzarides. 2011. « Regulation of Chromatin by Histone Modifications ». *Cell Research* 21 (3): 381-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.

Bao, Yunhe, et Xuetong Shen. 2007. « INO80 Subfamily of Chromatin Remodeling Complexes ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*,

Chromatin: Repair, Remodeling and Regulation, 618 (1): 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.10.006>.

Baptista, Tiago, Inês Graça, Elsa J. Sousa, Ana I. Oliveira, Natália R. Costa, Pedro Costa-Pinheiro, Francisco Amado, Rui Henrique, et Carmen Jerónimo. 2013. « Regulation of histone H2A.Z expression is mediated by sirtuin 1 in prostate cancer ». *Oncotarget* 4 (10): 1673-85.

Barkauskaite, Eva, Gytis Jankevicius, et Ivan Ahel. 2015. « Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation ». *Molecular Cell* 58 (6): 935-46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.007>.

Barone, Jacopo, Mathew Smith, Kimberley Kendall, Michael J. Owen, Michael C. O'Donovan, et George Kirov. 2019. « The Rate of de Novo CNVs in Healthy Controls ». *BioRxiv*, novembre, 857797. <https://doi.org/10.1101/857797>.

Barone, Rita, Mariangela Gulisano, Renata Amore, Carla Domini, Maria Chiara Milana, Sabrina Giglio, Francesca Madia, et al. 2020. « Clinical Correlates in Children with Autism Spectrum Disorder and CNVs: Systematic Investigation in a Clinical Setting ». *International Journal of Developmental Neuroscience* 80 (4): 276-86. <https://doi.org/10.1002/jdn.10024>.

Barral, Sophie, Yuichi Morozumi, Hiroki Tanaka, Emilie Montellier, Jérôme Govin, Maud de Dieuleveult, Guillaume Charbonnier, et al. 2017. « Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells ». *Molecular Cell* 66 (1): 89-101.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.025>.

Barski, Artem, Suresh Cuddapah, Kairong Cui, Tae-Young Roh, Dustin E. Schones, Zhibin Wang, Gang Wei, Iouri Chepelev, et Keji Zhao. 2007. « High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome ». *Cell* 129 (4): 823-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>.

Bartholomew, Blaine. 2014. « Regulating the Chromatin Landscape: Structural and Mechanistic Perspectives ». *Annual Review of Biochemistry* 83 (1): 671-96. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051810-093157>.

Becker, Peter B., et Jerry L. Workman. 2013. « Nucleosome Remodeling and Epigenetics ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (9): a017905. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017905>.

Bednar, Jan, Isabel Garcia-Saez, Ramachandran Boopathi, Amber R. Cutter, Gabor Papai, Anna Reymer, Sajad H. Syed, et al. 2017. « Structure and Dynamics of a 197 Bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1 ». *Molecular Cell* 66 (3): 384-397.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.012>.

Bellucci, Luca, Mathieu Dalvai, Silvia Kocanova, Fatima Moutahir, et Kerstin Bystricky. 2013. « Activation of P21 by HDAC Inhibitors Requires Acetylation of H2A.Z ». *PLOS ONE* 8 (1): e54102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054102>.

- Bentley, David R. 2000. « The Human Genome Project—An Overview ». *Medicinal Research Reviews* 20 (3): 189-96. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(200005\)20:3<189::AID-MED2>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(200005)20:3<189::AID-MED2>3.0.CO;2-#).
- Bernier, Raphael, Christelle Golzio, Bo Xiong, Holly A. Stessman, Bradley P. Coe, Osnat Penn, Kali Witherspoon, et al. 2014. « Disruptive CHD8 Mutations Define a Subtype of Autism Early in Development ». *Cell* 158 (2): 263-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.017>.
- Bernier, Raphael, Kyle J. Steinman, Beau Reilly, Arianne Stevens Wallace, Elliott H. Sherr, Nicholas Pojman, Heather C. Mefford, et al. 2016. « Clinical phenotype of the recurrent 1q21.1 copy-number variant ». *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 18 (4): 341-49. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.78>.
- Bestor, T. H. 2000. « The DNA Methyltransferases of Mammals ». *Human Molecular Genetics* 9 (16): 2395-2402. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2395>.
- Billon, Pierre, et Jacques Côté. 2012. « Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, Histone chaperones and Chromatin Assembly*, 1819 (3): 290-302. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.004>.
- Binda, Olivier, Ana Sevilla, Gary LeRoy, Ihor R. Lemischka, Benjamin A. Garcia, et Stéphane Richard. 2013. « SETD6 monomethylates H2AZ on lysine 7 and is required for the maintenance of embryonic stem cell self-renewal ». *Epigenetics* 8 (2): 177-83. <https://doi.org/10.4161/epi.23416>.
- Bird, Adrian. 2002. « DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory ». *Genes & Development* 16 (1): 6-21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>.
- Bird, Alexander W., David Y. Yu, Marilyn G. Pray-Grant, Qifeng Qiu, Kirsty E. Harmon, Paul C. Megee, Patrick A. Grant, M. Mitchell Smith, et Michael F. Christman. 2002. « Acetylation of Histone H4 by Esa1 Is Required for DNA Double-Strand Break Repair ». *Nature* 419 (6905): 411-15. <https://doi.org/10.1038/nature01035>.
- Biswas, Subhankar, et C. Mallikarjuna Rao. 2017. « Epigenetics in Cancer: Fundamentals and Beyond ». *Pharmacology & Therapeutics* 173 (mai): 118-34. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.011>.
- Boginya, Alexandra, Rajesh Detroja, Avi Matityahu, Milana Frenkel-Morgenstern, et Itay Onn. 2019. « The Chromatin Remodeler Chd1 Regulates Cohesin in Budding Yeast and Humans ». *Scientific Reports* 9 (1): 8929. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45263-3>.
- Bönisch, Clemens, Katrin Schneider, Sebastian Pünzeler, Sonja M. Wiedemann, Christina Bielmeier, Marco Bocola, H. Christian Eberl, et al. 2012. « H2A.Z.2.2 is an alternatively spliced histone H2A.Z variant that causes severe nucleosome destabilization ». *Nucleic Acids Research* 40 (13): 5951-64. <https://doi.org/10.1093/nar/gks267>.

- Boopathi, Ramachandran, Stefan Dimitrov, Ali Hamiche, Carlo Petosa, et Jan Bednar. 2020. « Cryo-Electron Microscopy of the Chromatin Fiber ». *Current Opinion in Structural Biology* 64 (octobre): 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.016>.
- Bowman, Andrew, Richard Ward, Nicola Wiechens, Vijender Singh, Hassane El-Mkami, David George Norman, et Tom Owen-Hughes. 2011. « The Histone Chaperones Nap1 and Vps75 Bind Histones H3 and H4 in a Tetrameric Conformation ». *Molecular Cell* 41 (4): 398-408. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.01.025>.
- Brahma, Sandipan, Maheshi I. Udugama, Jongseong Kim, Arjan Hada, Saurabh K. Bhardwaj, Solomon G. Hailu, Tae-Hee Lee, et Blaine Bartholomew. 2017. « INO80 Exchanges H2A.Z for H2A by Translocating on DNA Proximal to Histone Dimers ». *Nature Communications* 8 (1): 15616. <https://doi.org/10.1038/ncomms15616>.
- Brockschmidt, Antje, Boidinh Chung, Stefanie Weber, Dagmar-Christiane Fischer, Maria Kolatsi-Joannou, Laura Christ, André Heimbach, et al. 2012. « CHD1L : A New Candidate Gene for Congenital Anomalies of the Kidneys and Urinary Tract (CAKUT) ». *Nephrology Dialysis Transplantation* 27 (6): 2355-64. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr649>.
- Bruce, Kimberley, Fiona A. Myers, Evangelia Mantouvalou, Pascal Lefevre, Ian Greaves, Constanze Bonifer, David J. Tremethick, Alan W. Thorne, et Colyn Crane-Robinson. 2005. « The Replacement Histone H2A.Z in a Hyperacetylated Form Is a Feature of Active Genes in the Chicken ». *Nucleic Acids Research* 33 (17): 5633-39. <https://doi.org/10.1093/nar/gki874>.
- Brunetti-Pierri, Nicola, Jonathan S. Berg, Fernando Scaglia, John Belmont, Carlos A. Bacino, Trilochan Sahoo, Seema R. Lalani, et al. 2008. « Recurrent Reciprocal 1q21.1 Deletions and Duplications Associated with Microcephaly or Macrocephaly and Developmental and Behavioral Abnormalities ». *Nature Genetics* 40 (12): 1466-71. <https://doi.org/10.1038/ng.279>.
- Brusco, Alfredo, et Giovanni Battista Ferrero. 2019. « Genomic Architecture of ASD ». In *Psychopathology in Adolescents and Adults with Autism Spectrum Disorders*, édité par Roberto Keller, 23-34. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26276-1_2.
- Burkhardt, Lia, Sarah Fuchs, Antje Krohn, Sawinee Masser, Malte Mader, Martina Kluth, Frederik Bachmann, et al. 2013. « CHD1 Is a 5q21 Tumor Suppressor Required for ERG Rearrangement in Prostate Cancer ». *Cancer Research* 73 (9): 2795-2805. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1342>.
- Buschbeck, Marcus, et Sandra B. Hake. 2017. « Variants of Core Histones and Their Roles in Cell Fate Decisions, Development and Cancer ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (5): 299-314. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.166>.
- Busè, Martina, Helenia C. Cuttaia, Daniela Palazzo, Marcella V. Mazara, Salvatrice A. Lauricella, Michela Malacarne, Mauro Pierluigi, Simona Cavani, et Maria Piccione. 2017. « Expanding the

phenotype of reciprocal 1q21.1 deletions and duplications: a case series ». *Italian Journal of Pediatrics* 43 (juillet). <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0380-x>.

Cai, Yong, Jingji Jin, Laurence Florens, Selene K. Swanson, Thomas Kusch, Bing Li, Jerry L. Workman, Michael P. Washburn, Ronald C. Conaway, et Joan Weliky Conaway. 2005. « The Mammalian YL1 Protein Is a Shared Subunit of the TRRAP/TIP60 Histone Acetyltransferase and SRCAP Complexes ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (14): 13665-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500001200>.

Cairns, B. R., H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, F. Winston, et R. D. Kornberg. 1998. « Two Actin-Related Proteins Are Shared Functional Components of the Chromatin-Remodeling Complexes RSC and SWI/SNF ». *Molecular Cell* 2 (5): 639-51. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80162-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80162-8).

Campos, Eric I., et Danny Reinberg. 2010. « New Chaps in the Histone Chaperone Arena ». *Genes & Development* 24 (13): 1334-38. <https://doi.org/10.1101/gad.1946810>.

Capuano, Floriana, Michael Mülleder, Robert Kok, Henk J Blom, et Markus Ralser. 2014. « Cytosine DNA Methylation Is Found in *Drosophila melanogaster* but Absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and Other Yeast Species ». *Analytical Chemistry* 86 (8): 3697-3702. <https://doi.org/10.1021/ac500447w>.

Carlberg, Carsten, et Ferdinand Molnár. 2018. « The Histone Code ». In *Human Epigenomics*, édité par Carsten Carlberg et Ferdinand Molnár, 75-88. Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7614-5_5.

Carr, A. M., S. M. Dorrington, J. Hindley, G. A. Phear, S. J. Aves, et P. Nurse. 1994. « Analysis of a Histone H2A Variant from Fission Yeast: Evidence for a Role in Chromosome Stability ». *Molecular and General Genetics MGG* 245 (5): 628-35. <https://doi.org/10.1007/BF00282226>.

Carter, Nigel P. 2007. « Methods and Strategies for Analyzing Copy Number Variation Using DNA Microarrays ». *Nature Genetics* 39 (7): S16-21. <https://doi.org/10.1038/ng2028>.

Casey, Jillian P., Tiago Magalhaes, Judith M. Conroy, Regina Regan, Naisha Shah, Richard Anney, Denis C. Shields, et al. 2012. « A Novel Approach of Homozygous Haplotype Sharing Identifies Candidate Genes in Autism Spectrum Disorder ». *Human Genetics* 131 (4): 565-79. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1094-6>.

Chan, Jennifer C., et Ian Maze. 2020. « Nothing Is yet Set in (Hi)Stone: Novel Post-Translational Modifications Regulating Chromatin Function ». *Trends in Biochemical Sciences*, juin. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.05.009>.

Chen, Chih-Ping, Jian-Pei Huang, Yi-Yung Chen, Schu-Rern Chern, Peih-Shan Wu, Shin-Wen Chen, Wayseen Wang, et Chen-Chi Lee. 2019. « Detection of a Familial 1q21.1 Microdeletion and Concomitant CHD1L Mutation in a Fetus with Oligohydramnios and Bilateral Renal Dysplasia on Prenatal Ultrasound ». *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 58 (6): 859-63. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2019.07.031>.

- Chen, Dawei, Melanie Vollmar, Marianna N. Rossi, Claire Phillips, Rolf Kraehenbuehl, Dea Slade, Pawan V. Mehrotra, et al. 2011. « Identification of Macrodomain Proteins as Novel O-Acetyl-ADP-Ribose Deacetylases ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (15): 13261-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.206771>.
- Chen, Jiaoyang, Jing Zhang, Aijie Liu, Liping Zhang, Hua Li, Qi Zeng, Zhixian Yang, Xiaoling Yang, Xiru Wu, et Yuehua Zhang. 2020. « CHD2-Related Epilepsy: Novel Mutations and New Phenotypes ». *Developmental Medicine & Child Neurology* 62 (5): 647-53. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14367>.
- Chen, Leilei, Tim Hon Man Chan, Yun-Fei Yuan, Liang Hu, Jun Huang, Stephanie Ma, Jian Wang, Sui-Sui Dong, Kwan Ho Tang, et Dan Xie. 2010. « CHD1L promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis in mice and is associated with these processes in human patients ». *The Journal of clinical investigation* 120 (4): 1178–1191.
- Chen, Leilei, Liang Hu, Tim Hon Man Chan, George Sai-Wah Tsao, Dan Xie, Ke-Ke Huo, Li Fu, Stephanie Ma, Bo-Jian Zheng, et Xin-Yuan Guan. 2009. « Chromodomain Helicase/Adenosine Triphosphatase DNA Binding Protein 1-like (CHD1L) Gene Suppresses the Nucleus-to-Mitochondria Translocation of Nur77 to Sustain Hepatocellular Carcinoma Cell Survival ». *Hepatology* 50 (1): 122-29. <https://doi.org/10.1002/hep.22933>.
- Cheng, Wen, Yun Su, et Feng Xu. 2013. « CHD1L: A Novel Oncogene ». *Molecular Cancer* 12 (1): 170. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-170>.
- Clapier, Cedric R., et Bradley R. Cairns. 2009. « The Biology of Chromatin Remodeling Complexes ». *Annual Review of Biochemistry* 78 (1): 273-304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>.
- Clapier, Cedric R., Janet Iwasa, Bradley R. Cairns, et Craig L. Peterson. 2017. « Mechanisms of Action and Regulation of ATP-Dependent Chromatin-Remodelling Complexes ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (7): 407-22. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26>.
- Clarkson, M. J., J. R. Wells, F. Gibson, R. Saint, et D. J. Tremethick. 1999. « Regions of Variant Histone His2AvD Required for Drosophila Development ». *Nature* 399 (6737): 694-97. <https://doi.org/10.1038/21436>.
- Collaborative, Computational Project. 1994. « The CCP4 suite: programs for protein crystallography. » *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 50 (Pt 5): 760.
- Conrad, Donald F., Dalila Pinto, Richard Redon, Lars Feuk, Omer Gokcumen, Yujun Zhang, Jan Aerts, et al. 2010. « Origins and Functional Impact of Copy Number Variation in the Human Genome ». *Nature* 464 (7289): 704-12. <https://doi.org/10.1038/nature08516>.
- Contrepois, Kévin, Clément Coudereau, Bérénice A. Benayoun, Nadine Schuler, Pierre-François Roux, Oliver Bischof, Régis Courbeyrette, et al. 2017. « Histone Variant H2A.J Accumulates in Senescent Cells and Promotes Inflammatory Gene Expression ». *Nature Communications* 8 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1038/ncomms14995>.

- Corona, Davide F. V., et John W. Tamkun. 2004. « Multiple Roles for ISWI in Transcription, Chromosome Organization and DNA Replication ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1677 (1-3): 113-19. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.09.018>.
- Cremer, T., et C. Cremer. 2001. « Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells ». *Nature Reviews Genetics* 2 (4): 292-301. <https://doi.org/10.1038/35066075>.
- Cremer, T., et Marion Cremer. 2010. « Chromosome Territories ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (3): a003889. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>.
- Crick, Francis. 1970. « Central Dogma of Molecular Biology ». *Nature* 227 (5258): 561-63. <https://doi.org/10.1038/227561a0>.
- Cvetanovic, Marija, Robert J Rooney, Jesus J Garcia, Nataliya Toporovskaya, Huda Y Zoghbi, et Puneet Opal. 2007. « The role of LANP and ataxin 1 in E4F-mediated transcriptional repression ». *EMBO reports* 8 (7): 671-77. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400983>.
- Dalvai, M., L. Bellucci, L. Fleury, A.-C. Lavigne, F. Moutahir, et K. Bystricky. 2013. « H2A.Z-Dependent Crosstalk between Enhancer and Promoter Regulates Cyclin D1 Expression ». *Oncogene* 32 (36): 4243-51. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.442>.
- D'Amours, Damien, Serge Desnoyers, Icy d'SILVA, et Guy G. Poirier. 1999. « Poly(ADP-Ribosyl)ation Reactions in the Regulation of Nuclear Functions ». *Biochemical Journal* 342 (2): 249-68. <https://doi.org/10.1042/bj3420249>.
- Deans, Carrie, et Keith A. Maggert. 2015. « What Do You Mean, "Epigenetic"? » *Genetics* 199 (4): 887-96. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>.
- DesJarlais, Renee, et Peter J. Tummino. 2016. « Role of Histone-Modifying Enzymes and Their Complexes in Regulation of Chromatin Biology ». *Biochemistry* 55 (11): 1584-99. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01210>.
- Diebold, Marie-Laure, Sébastien Fribourg, Michael Koch, Thibaud Metzger, et Christophe Romier. 2011. « Deciphering Correct Strategies for Multiprotein Complex Assembly by Co-Expression: Application to Complexes as Large as the Histone Octamer ». *Journal of Structural Biology*, SPINE-2 Complexes EU-FP7 project, 175 (2): 178-88. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.02.001>.
- Doğan, Ezgi Süheyla, et Chang Liu. 2018. « Three-Dimensional Chromatin Packing and Positioning of Plant Genomes ». *Nature Plants* 4 (8): 521-29. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0199-5>.
- Dorigo, Benedetta, Thomas Schalch, Alexandra Kulangara, Sylwia Duda, Rasmus R. Schroeder, et Timothy J. Richmond. 2004. « Nucleosome Arrays Reveal the Two-Start Organization of the Chromatin Fiber ». *Science* 306 (5701): 1571-73. <https://doi.org/10.1126/science.1103124>.

- Doyon, Yannick, William Selleck, William S. Lane, Song Tan, et Jacques Côté. 2004. « Structural and Functional Conservation of the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex from Yeast to Humans ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (5): 1884-96. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.5.1884-1896.2004>.
- Draker, Ryan, Marlee K. Ng, Elizabeth Sarcinella, Vladimir Ignatchenko, Thomas Kislinger, et Peter Cheung. 2012. « A Combination of H2A.Z and H4 Acetylation Recruits Brd2 to Chromatin during Transcriptional Activation ». *PLOS Genetics* 8 (11): e1003047. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003047>.
- Dronamraju, Raghuvar, Srinivas Ramachandran, Deepak K. Jha, Alexander T. Adams, Julia V. DiFiore, Michael A. Parra, Nikolay V. Dokholyan, et Brian D. Strahl. 2017. « Redundant Functions for Nap1 and Chz1 in H2A.Z Deposition ». *Scientific Reports* 7 (1): 10791. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11003-8>.
- Dryhurst, Deanna, Toyotaka Ishibashi, Kristie L. Rose, José M. Eirín-López, Darin McDonald, Begonia Silva-Moreno, Nik Veldhoen, et al. 2009. « Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates ». *BMC Biology* 7 (1): 86. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-86>.
- Durak, Omer, Fan Gao, Yea Jin Kaeser-Woo, Richard Rueda, Anthony J. Martorell, Alexi Nott, Carol Y. Liu, L. Ashley Watson, et Li-Huei Tsai. 2016. « Chd8 Mediates Cortical Neurogenesis via Transcriptional Regulation of Cell Cycle and Wnt Signaling ». *Nature Neuroscience* 19 (11): 1477-88. <https://doi.org/10.1038/nn.4400>.
- Dyer, Pamela N., Raji S. Edayathumangalam, Cindy L. White, Yunhe Bao, Srinivas Chakravarthy, Uma M. Muthurajan, et Karolin Luger. 2003. « Reconstitution of Nucleosome Core Particles from Recombinant Histones and DNA ». In *Methods in Enzymology*, 375:23-44. Chromatin and Chromatin Remodeling Enzymes, Part A. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)75002-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)75002-2).
- Eltsov, Mikhail, Kirsty M. MacLellan, Kazuhiro Maeshima, Achilleas S. Frangakis, et Jacques Dubochet. 2008. « Analysis of Cryo-Electron Microscopy Images Does Not Support the Existence of 30-Nm Chromatin Fibers in Mitotic Chromosomes in Situ ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (50): 19732-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810057105>.
- Eustermann, Sebastian, Kevin Schall, Dirk Kostrewa, Kristina Lakomek, Mike Strauss, Manuela Moldt, et Karl-Peter Hopfner. 2018. « Structural Basis for ATP-Dependent Chromatin Remodelling by the INO80 Complex ». *Nature* 556 (7701): 386-90. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0029-y>.
- Faast, Renate, Varaporn Thonglairoam, Thomas C Schulz, Jacquie Beall, Julian R. E Wells, Helen Taylor, Klaus Matthaei, Peter D Rathjen, David J Tremethick, et Ian Lyons. 2001. « Histone Variant H2A.Z Is Required for Early Mammalian Development ». *Current Biology* 11 (15): 1183-87. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00329-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00329-3).

- Fairman-Williams, Margaret E., Ulf-Peter Guenther, et Eckhard Jankowsky. 2010. « SF1 and SF2 Helicases: Family Matters ». *Current Opinion in Structural Biology* 20 (3): 313-24. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.03.011>.
- Falconer, Robert J. 2016. « Applications of Isothermal Titration Calorimetry – the Research and Technical Developments from 2011 to 2015 ». *Journal of Molecular Recognition* 29 (10): 504-15. <https://doi.org/10.1002/jmr.2550>.
- Farnung, Lucas, Moritz Ochmann, et Patrick Cramer. 2020. « Nucleosome-CHD4 chromatin remodeler structure maps human disease mutations ». Édité par Geeta J Narlikar et Jessica K Tyler. *eLife* 9 (juin): e56178. <https://doi.org/10.7554/eLife.56178>.
- Farnung, Lucas, Seychelle M. Vos, Christoph Wigge, et Patrick Cramer. 2017. « Nucleosome–Chd1 Structure and Implications for Chromatin Remodelling ». *Nature* 550 (7677): 539-42. <https://doi.org/10.1038/nature24046>.
- Felsenfeld, Gary, et Mark Groudine. 2003. « Controlling the Double Helix ». *Nature* 421 (6921): 448-53. <https://doi.org/10.1038/nature01411>.
- Feng, Yangyang, Yuan Tian, Zihan Wu, et Yanhui Xu. 2018. « Cryo-EM Structure of Human SRCAP Complex ». *Cell Research* 28 (11): 1121-23. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0102-y>.
- Feuk, Lars, Andrew R. Carson, et Stephen W. Scherer. 2006. « Structural Variation in the Human Genome ». *Nature Reviews Genetics* 7 (2): 85-97. <https://doi.org/10.1038/nrg1767>.
- Fischle, Wolfgang, Boo Shan Tseng, Holger L. Dormann, Beatrix M. Ueberheide, Benjamin A. Garcia, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, Hironori Funabiki, et C. David Allis. 2005. « Regulation of HP1–Chromatin Binding by Histone H3 Methylation and Phosphorylation ». *Nature* 438 (7071): 1116-22. <https://doi.org/10.1038/nature04219>.
- Flanagan, John F., Li-Zhi Mi, Maksymilian Chruszcz, Marcin Cymborowski, Katrina L. Clines, Youngchang Kim, Wladek Minor, Fraydoon Rastinejad, et Sepideh Khorasanizadeh. 2005. « Double Chromodomains Cooperate to Recognize the Methylated Histone H3 Tail ». *Nature* 438 (7071): 1181-85. <https://doi.org/10.1038/nature04290>.
- Flaus, Andrew, et Tom Owen-Hughes. 2019. « The Face of Chromatin Variants ». *Cell* 178 (6): 1284-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.024>.
- Fombonne, Éric, Julianne Myers, Alison Chavez, Alison Presmanes Hill, Katharine Zuckerman, et René Pry. 2019. « Épidémiologie de l'autisme : où en sommes-nous ? » *Enfance* N° 1 (1): 13-47.
- Furuya, Tomoko, Yutaka Suehiro, Yukihisa Namiki, et Kohsuke Sasaki. 2015. « CNVs Associated with Susceptibility to Cancers: A Mini-Review ». *Journal of Cancer Therapy* 06 (05): 413. <https://doi.org/10.4236/jct.2015.65044>.

- Garcia-Saez, Isabel, Hervé Menoni, Ramachandran Boopathi, Manu S. Shukla, Lama Soueidan, Marjolaine Noirclerc-Savoie, Aline Le Roy, et al. 2018. « Structure of an H1-Bound 6-Nucleosome Array Reveals an Untwisted Two-Start Chromatin Fiber Conformation ». *Molecular Cell* 72 (5): 902-915.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.027>.
- Gardiner-Garden, M., et M. Frommer. 1987. « CpG Islands in Vertebrate Genomes ». *Journal of Molecular Biology* 196 (2): 261-82. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9).
- Gaspar-Maia, Alexandre, Adi Alajem, Eran Meshorer, et Miguel Ramalho-Santos. 2011. « Open chromatin in pluripotency and reprogramming ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (1): 36-47. <https://doi.org/10.1038/nrm3036>.
- Gerhold, Christian B., et Susan M. Gasser. 2014. « INO80 and SWR Complexes: Relating Structure to Function in Chromatin Remodeling ». *Trends in Cell Biology* 24 (11): 619-31. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.06.004>.
- Gerhold, Christian B., Duane D. Winkler, Kristina Lakomek, Florian U. Seifert, Sebastian Fenn, Brigitte Kessler, Gregor Witte, Karolin Luger, et Karl-Peter Hopfner. 2012. « Structure of Actin-related protein 8 and its contribution to nucleosome binding ». *Nucleic Acids Research* 40 (21): 11036-46. <https://doi.org/10.1093/nar/gks842>.
- Gévry, Nicolas, Sara Hardy, Pierre-Étienne Jacques, Liette Laflamme, Amy Svtelis, François Robert, et Luc Gaudreau. 2009. « Histone H2A.Z Is Essential for Estrogen Receptor Signaling ». *Genes & Development* 23 (13): 1522-33. <https://doi.org/10.1101/gad.1787109>.
- Gaiimo, Benedetto Daniele, Francesca Ferrante, Andreas Herchenröther, Sandra B. Hake, et Tilman Borggrefe. 2019. « The histone variant H2A.Z in gene regulation ». *Epigenetics & Chromatin* 12 (1): 37. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0274-9>.
- Gaiimo, Benedetto Daniele, Francesca Ferrante, Diana M. Vallejo, Kerstin Hein, Irene Gutierrez-Perez, Andrea Nist, Thorsten Stiewe, et al. 2018. « Histone Variant H2A.Z Deposition and Acetylation Directs the Canonical Notch Signaling Response ». *Nucleic Acids Research* 46 (16): 8197-8215. <https://doi.org/10.1093/nar/gky551>.
- Gibson, Daniel G., John I. Glass, Carole Lartigue, Vladimir N. Noskov, Ray-Yuan Chuang, Mikkel A. Algire, Gwynedd A. Benders, et al. 2010. « Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome ». *Science* 329 (5987): 52-56. <https://doi.org/10.1126/science.1190719>.
- Gibson, Daniel G., Lei Young, Ray-Yuan Chuang, J. Craig Venter, Clyde A. Hutchison, et Hamilton O. Smith. 2009. « Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases ». *Nature Methods* 6 (5): 343-45. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- Giles, Katherine A., et Phillippa C. Taberlay. 2019. « The Role of Nucleosomes in Epigenetic Gene Regulation ». In *Clinical Epigenetics*, édité par Luke B. Hesson et Antonia L. Pritchard, 87-117. Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8958-0_4.

- Godde, James S., et Kiyoe Ura. 2008. « Cracking the Enigmatic Linker Histone Code ». *The Journal of Biochemistry* 143 (3): 287-93. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn013>.
- Golzio, Christelle, et Nicholas Katsanis. 2013. « Genetic Architecture of Reciprocal CNVs ». *Current opinion in genetics & development* 23 (3): 240-48. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.04.013>.
- Golzio, Christelle, Jason Willer, Michael E. Talkowski, Edwin C. Oh, Yu Taniguchi, Sébastien Jacquemont, Alexandre Reymond, et al. 2012. « KCTD13 Is a Major Driver of Mirrored Neuroanatomical Phenotypes of the 16p11.2 Copy Number Variant ». *Nature* 485 (7398): 363-67. <https://doi.org/10.1038/nature11091>.
- Gómez-Zambrano, Ángeles, Wiam Merini, et Myriam Calonje. 2019. « The Repressive Role of Arabidopsis H2A.Z in Transcriptional Regulation Depends on AtBMI1 Activity ». *Nature Communications* 10 (1): 2828. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10773-1>.
- Goodbourn, P. T., J. M. Bosten, G. Bargary, R. E. Hogg, A. J. Lawrance-Owen, et J. D. Mollon. 2014. « Variants in the 1q21 Risk Region Are Associated with a Visual Endophenotype of Autism and Schizophrenia: Variants in 1q21 and a Psychological Endophenotype ». *Genes, Brain and Behavior* 13 (2): 144-51. <https://doi.org/10.1111/gbb.12096>.
- Gottschalk, Aaron J., Rushi D. Trivedi, Joan W. Conaway, et Ronald C. Conaway. 2012. « Activation of the SNF2 Family ATPase ALC1 by Poly(ADP-Ribose) in a Stable ALC1·PARP1·Nucleosome Intermediate ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (52): 43527-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401141>.
- Greaves, Ian K., Danny Rangasamy, Patricia Ridgway, et David J. Tremethick. 2007. « H2A.Z Contributes to the Unique 3D Structure of the Centromere ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2): 525-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607870104>.
- Greenberg, Rachel S., Hannah K. Long, Tomek Swigut, et Joanna Wysocka. 2019. « Single Amino Acid Change Underlies Distinct Roles of H2A.Z Subtypes in Human Syndrome ». *Cell* 178 (6): 1421-1436.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.002>.
- Grigorian, Melina, Heather DeBruhl, et Joseph S. Lipsick. 2017. « The role of variant histone H2AV in Drosophila melanogaster larval hematopoiesis ». *Development (Cambridge, England)* 144 (8): 1441-49. <https://doi.org/10.1242/dev.142729>.
- Grigoryev, Sergei A., Gaurav Arya, Sarah Correll, Christopher L. Woodcock, et Tamar Schlick. 2009. « Evidence for Heteromorphic Chromatin Fibers from Analysis of Nucleosome Interactions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (32): 13317-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903280106>.
- Guillemette, Benoît, et Luc Gaudreau. 2006. « H2A.Z : un variant d'histone qui orne les promoteurs des gènes ». *médecine/sciences* 22 (11): 941-46. <https://doi.org/10.1051/medsci/20062211941>.

- Gupta, Shikha, et Katheryn Meek. 2005. « The Leucine Rich Region of DNA-PKcs Contributes to Its Innate DNA Affinity ». *Nucleic Acids Research* 33 (22): 6972-81. <https://doi.org/10.1093/nar/gki990>.
- Gursoy-Yuzugullu, Ozge, Marina K. Ayrapetov, et Brendan D. Price. 2015. « Histone Chaperone Anp32e Removes H2A.Z from DNA Double-Strand Breaks and Promotes Nucleosome Reorganization and DNA Repair ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (24): 7507-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504868112>.
- Haldeman-Englert, Chad R., et Tamison Jewett. 2011. « 1q21.1 Recurrent Microdeletion ». In *GeneReviews*®, édité par Margaret P. Adam, Holly H. Ardingier, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora JH Bean, Karen Stephens, et Anne Amemiya. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52787/>.
- Hammond, Colin M., Caroline B. Strømme, Hongda Huang, Dinshaw J. Patel, et Anja Groth. 2017. « Histone Chaperone Networks Shaping Chromatin Function ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (3): 141-58. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.159>.
- Han, Weidong, Xiaolei Li, et Xiaobing Fu. 2011. « The macro domain protein family: Structure, functions, and their potential therapeutic implications ». *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* 727 (3): 86-103. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.03.001>.
- Han, Yan, Alexis A. Reyes, Sara Malik, et Yuan He. 2020. « Cryo-EM Structure of SWI/SNF Complex Bound to a Nucleosome ». *Nature* 579 (7799): 452-55. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2087-1>.
- Harata, Masahiko, Yukako Oma, Shigeki Mizuno, Yi Wei Jiang, David J. Stillman, et Ulrike Wintersberger. 1999. « The Nuclear Actin-related Protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Act3p/Arp4, Interacts with Core Histones ». *Molecular Biology of the Cell* 10 (8): 2595-2605. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.8.2595>.
- Hauk, Glenn, Jeffrey N. McKnight, Ilana M. Nodelman, et Gregory D. Bowman. 2010. « The Chromodomains of the Chd1 Chromatin Remodeler Regulate DNA Access to the ATPase Motor ». *Molecular Cell* 39 (5): 711-23. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.012>.
- He, Li-Ru, Ning-Fang Ma, Jie-Wei Chen, Bin-Kui Li, Xin-Yuan Guan, Meng-Zhong Liu, et Dan Xie. 2015. « Overexpression of CHD1L is positively associated with metastasis of lung adenocarcinoma and predicts patients poor survival ». *Oncotarget* 6 (31): 31181-90.
- He, Shuang, Zihan Wu, Yuan Tian, Zishuo Yu, Jiali Yu, Xinxin Wang, Jie Li, Bijun Liu, et Yanhui Xu. 2020. « Structure of Nucleosome-Bound Human BAF Complex ». *Science* 367 (6480): 875-81. <https://doi.org/10.1126/science.aaz9761>.
- He, Wei-Peng, Juan Zhou, Mu-Yan Cai, Xiang-Shen Xiao, Yi-Ji Liao, Hsiang-Fu Kung, Xin-Yuan Guan, Dan Xie, et Guo-Fen Yang. 2012. « CHD1L protein is overexpressed in human ovarian carcinomas and is a novel predictive biomarker for patients survival ». *BMC cancer* 12 (1): 437.

- Henikoff, Steven, et M. Mitchell Smith. 2015. « Histone variants and epigenetics. » *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019364>.
- Hesson, Luke B., et Antonia L. Pritchard, éd. 2019. *Clinical Epigenetics*. Singapore: Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8958-0>.
- Hirota, Toru, Jesse J. Lipp, Ban-Hock Toh, et Jan-Michael Peters. 2005. « Histone H3 Serine 10 Phosphorylation by Aurora B Causes HP1 Dissociation from Heterochromatin ». *Nature* 438 (7071): 1176-80. <https://doi.org/10.1038/nature04254>.
- Hodawadekar, S. C., et R. Marmorstein. 2007. « Chemistry of Acetyl Transfer by Histone Modifying Enzymes: Structure, Mechanism and Implications for Effector Design ». *Oncogene* 26 (37): 5528-40. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210619>.
- Hodges, Holly, Casey Fealko, et Neelkamal Soares. 2020. « Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation ». *Translational Pediatrics* 9 (Suppl 1): S55-65. <https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.09>.
- Holliday, R. 1987. « The Inheritance of Epigenetic Defects ». *Science* 238 (4824): 163-70. <https://doi.org/10.1126/science.3310230>.
- Hondele, Maria, Tobias Stuwe, Markus Hassler, Felix Halbach, Andrew Bowman, Elisa T. Zhang, Bianca Nijmeijer, et al. 2013. « Structural Basis of Histone H2A–H2B Recognition by the Essential Chaperone FACT ». *Nature* 499 (7456): 111-14. <https://doi.org/10.1038/nature12242>.
- Hong, Jingjun, Hanqiao Feng, Feng Wang, Anand Ranjan, Jianhong Chen, Jiansheng Jiang, Rodolfo Ghirlando, T. Sam Xiao, Carl Wu, et Yawen Bai. 2014. « The Catalytic Subunit of the SWR1 Remodeler Is a Histone Chaperone for the H2A.Z-H2B Dimer ». *Molecular Cell* 53 (3): 498-505. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.010>.
- Hood, Rebecca L., Matthew A. Lines, Sarah M. Nikkel, Jeremy Schwartzenruber, Chandree Beaulieu, Małgorzata J. M. Nowaczyk, Judith Allanson, et al. 2012. « Mutations in SRCAP, Encoding SNF2-Related CREBBP Activator Protein, Cause Floating-Harbor Syndrome ». *The American Journal of Human Genetics* 90 (2): 308-13. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.12.001>.
- Hotchkiss, Rollin D. 1948. « The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography ». *Journal of Biological Chemistry* 175 (1): 315-32.
- Hou, Haitong, Yu Wang, Scott P. Kallgren, James Thompson, John R. Yates, et Songtao Jia. 2010. « Histone Variant H2A.Z Regulates Centromere Silencing and Chromosome Segregation in Fission Yeast ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (3): 1909-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058487>.
- Hsu, Chih-Chao, Jiejun Shi, Chao Yuan, Dan Zhao, Shiming Jiang, Jie Lyu, Xiaolu Wang, et al. 2018. « Recognition of Histone Acetylation by the GAS41 YEATS Domain Promotes H2A.Z

Deposition in Non-Small Cell Lung Cancer ». *Genes & Development* 32 (1): 58-69. <https://doi.org/10.1101/gad.303784.117>.

Hsu, Jer-Yuan, Zu-Wen Sun, Xiumin Li, Melanie Reuben, Kelly Tatchell, Douglas K Bishop, Jeremy M Grushcow, et al. 2000. « Mitotic Phosphorylation of Histone H3 Is Governed by Ipl1/Aurora Kinase and Glc7/PP1 Phosphatase in Budding Yeast and Nematodes ». *Cell* 102 (3): 279-91. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00034-9).

Hu, Guang, et Paul A. Wade. 2012. « NuRD and Pluripotency: A Complex Balancing Act ». *Cell Stem Cell* 10 (5): 497-503. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.011>.

Hua, Sujun, Caleb B Kallen, Ruby Dhar, Maria T Baquero, Christopher E Mason, Beth A Russell, Parantu K Shah, et al. 2008. « Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression ». *Molecular Systems Biology* 4 (1): 188. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.25>.

Huang, S., Z. G. Gulzar, K. Salari, J. Lapointe, J. D. Brooks, et J. R. Pollack. 2012. « Recurrent Deletion of CHD1 in Prostate Cancer with Relevance to Cell Invasiveness ». *Oncogene* 31 (37): 4164-70. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.590>.

Humphrey, T. C., J. A. Downs, et A. L. Chambers. 2016. « Chapter 11 - Variation, Modification, and Reorganization of Broken Chromatin ». In *Chromatin Signaling and Diseases*, édité par Olivier Binda et Martin Ernesto Fernandez-Zapico, 197-216. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802389-1.00011-3>.

Hunter, Chad S., Raleigh E. Malik, Frank A. Witzmann, et Simon J. Rhodes. 2013. « LHX3 Interacts with Inhibitor of Histone Acetyltransferase Complex Subunits LANP and TAF-1 β to Modulate Pituitary Gene Regulation ». *PLOS ONE* 8 (7): e68898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068898>.

Hwang, Daw-Yang, Gabriel C. Dworschak, Stefan Kohl, Pawaree Saisawat, Asaf Vivante, Alina C. Hilger, Heiko M. Reutter, et al. 2014. « Mutations in 12 Known Dominant Disease-Causing Genes Clarify Many Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract ». *Kidney International* 85 (6): 1429-33. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.508>.

Iouzalén, Nathalie, Jacques Moreau, et Marcel Méchali. 1996. « H2A.ZI, a New Variant Histone Expressed during *Xenopus* Early Development Exhibits Several Distinct Features from the Core Histone H2A ». *Nucleic Acids Research* 24 (20): 3947-52. <https://doi.org/10.1093/nar/24.20.3947>.

Izzo, Annalisa, Kinga Kamieniarz, et Robert Schneider. 2008. « The Histone H1 Family: Specific Members, Specific Functions? ». *Biological Chemistry* 389 (4): 333-43. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.037>.

Jabbari, Kamel, et Giorgio Bernardi. 2004. « Cytosine Methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA Frequencies ». *Gene* 333 (mai): 143-49. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.02.043>.

- Jackson, J. D., et M. A. Gorovsky. 2000. « Histone H2A.Z Has a Conserved Function That Is Distinct from That of the Major H2A Sequence Variants ». *Nucleic Acids Research* 28 (19): 3811-16. <https://doi.org/10.1093/nar/28.19.3811>.
- Jang, Seongmin, et Ji-Joon Song. 2019. « The Big Picture of Chromatin Biology by Cryo-EM ». *Current Opinion in Structural Biology* 58: 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.05.017>.
- Janssen, Aniek, Serafin U. Colmenares, et Gary H. Karpen. 2018. « Heterochromatin: Guardian of the Genome ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34 (1): 265-88. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062653>.
- Jenuwein, Thomas, et C. David Allis. 2001. « Translating the Histone Code ». *Science* 293 (5532): 1074-80. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>.
- Jeronimo, Célia, Shinya Watanabe, Craig D. Kaplan, Craig L. Peterson, et François Robert. 2015. « The Histone Chaperones FACT and Spt6 Restrict H2A.Z from Intragenic Locations ». *Molecular Cell* 58 (6): 1113-23. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.030>.
- Ji, Xiaopin, Jianfang Li, Li Zhu, Jianhua Cai, Jianian Zhang, Yin Qu, Haobo Zhang, Bingya Liu, Ren Zhao, et Zhenggang Zhu. 2013. « CHD1L Promotes Tumor Progression and Predicts Survival in Colorectal Carcinoma ». *Journal of Surgical Research* 185 (1): 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.05.008>.
- Jiang, Bo-Hua, Wei-Yi Chen, Hsin-Yang Li, Yueh Chien, Wei-Chao Chang, Pei-Chen Hsieh, Ping Wu, et al. 2015. « CHD1L Regulated PARP1-Driven Pluripotency and Chromatin Remodeling During the Early-Stage Cell Reprogramming ». *STEM CELLS* 33 (10): 2961-72. <https://doi.org/10.1002/stem.2116>.
- Jiang, Xuanzhao, Tatiana A. Soboleva, et David J. Tremethick. 2020. « Short Histone H2A Variants: Small in Stature but Not in Function ». *Cells* 9 (4): 867. <https://doi.org/10.3390/cells9040867>.
- Jin, Chunyuan, Chongzhi Zang, Gang Wei, Kairong Cui, Weiqun Peng, Keji Zhao, et Gary Felsenfeld. 2009. « H3.3/H2A.Z Double Variant–Containing Nucleosomes Mark “nucleosome-Free Regions” of Active Promoters and Other Regulatory Regions ». *Nature Genetics* 41 (8): 941-45. <https://doi.org/10.1038/ng.409>.
- Jones, Peter A. 2012. « Functions of DNA Methylation: Islands, Start Sites, Gene Bodies and Beyond ». *Nature Reviews Genetics* 13 (7): 484-92. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>.
- Kabsch, W. 2010. « XDS ». *Acta Crystallogr. D* 66: 125–132.
- Kadoch, Cigall, Diana C. Hargreaves, Courtney Hodges, Laura Elias, Lena Ho, Jeff Ranish, et Gerald R. Crabtree. 2013. « Proteomic and Bioinformatic Analysis of mSWI/SNF (BAF) Complexes Reveals Extensive Roles in Human Malignancy ». *Nature genetics* 45 (6): 592-601. <https://doi.org/10.1038/ng.2628>.

Kadota, Shinichi, et Kyosuke Nagata. 2011. « Pp32, an INHAT Component, Is a Transcription Machinery Recruiter for Maximal Induction of IFN-Stimulated Genes ». *Journal of Cell Science* 124 (6): 892-99. <https://doi.org/10.1242/jcs.078253>.

Kalocsay, Marian, Natalie Jasmin Hiller, et Stefan Jentsch. 2009. « Chromosome-Wide Rad51 Spreading and SUMO-H2A.Z-Dependent Chromosome Fixation in Response to a Persistent DNA Double-Strand Break ». *Molecular Cell* 33 (3): 335-43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.016>.

Kamakaka, Rohinton T., et Sue Biggins. 2005. « Histone Variants: Deviants? » *Genes & Development* 19 (3): 295-316. <https://doi.org/10.1101/gad.1272805>.

Karras, Georgios I, Georg Kustatscher, Heeran R Buhecha, Mark D Allen, Céline Pugieux, Fiona Sait, Mark Bycroft, et Andreas G Ladurner. 2005. « The macro domain is an ADP-ribose binding module ». *The EMBO Journal* 24 (11): 1911-20. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600664>.

Keller, Roberto, Stefania Bari, et Romina Castaldo. 2019. « Diagnosing ASD in Adolescence and Adulthood ». *Psychopathology in Adolescents and Adults with Autism Spectrum Disorders*, 1-21. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26276-1_1.

Keogh, Michael-Christopher, Thomas A. Mennella, Chika Sawa, Sharon Berthelet, Nevan J. Krogan, Adam Wolek, Vladimir Podolny, et al. 2006. « The Saccharomyces Cerevisiae Histone H2A Variant Htz1 Is Acetylated by NuA4 ». *Genes & Development* 20 (6): 660-65. <https://doi.org/10.1101/gad.1388106>.

Khan, Muhammad Z., Avinash Vaidya, et Olimpia Meucci. 2011. « CXCL12-Mediated Regulation of ANP32A/Lanp, A Component of the Inhibitor of Histone Acetyl Transferase (INHAT) Complex, in Cortical Neurons ». *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 6 (1): 163-70. <https://doi.org/10.1007/s11481-010-9228-5>.

Kim, Kyunghwan, Vasu Punj, Jongkyu Choi, Kyu Heo, Jin-Man Kim, Peter W. Laird, et Woojin An. 2013. « Gene dysregulation by histone variant H2A.Z in bladder cancer ». *Epigenetics & Chromatin* 6 (1): 34. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-34>.

Kim, Young J., Sattar Khoshkhoo, Jan C. Frankowski, Bingyao Zhu, Saad Abbasi, Sunyoung Lee, Ye Emily Wu, et Robert F. Hunt. 2018. « Chd2 Is Necessary for Neural Circuit Development and Long-Term Memory ». *Neuron* 100 (5): 1180-1193.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.049>.

Klopocki, Eva, Harald Schulze, Gabriele Strauß, Claus-Eric Ott, Judith Hall, Fabienne Trotier, Silke Fleischhauer, et al. 2007. « Complex Inheritance Pattern Resembling Autosomal Recessive Inheritance Involving a Microdeletion in Thrombocytopenia–Absent Radius Syndrome ». *The American Journal of Human Genetics* 80 (2): 232-40. <https://doi.org/10.1086/510919>.

Konev, Alexander Y., Martin Tribus, Sung Yeon Park, Valerie Podhraski, Chin Yan Lim, Alexander V. Emelyanov, Elena Vershilova, et al. 2007. « CHD1 Motor Protein Is Required for

Deposition of Histone Variant H3.3 into Chromatin in Vivo ». *Science* 317 (5841): 1087-90. <https://doi.org/10.1126/science.1145339>.

Kouzarides, Tony. 2007. « Chromatin Modifications and Their Function ». *Cell* 128 (4): 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.

Kovač, Kristina, Anja Sauer, Igor Mačinković, Stephan Awe, Florian Finkernagel, Helen Hoffmeister, Andreas Fuchs, et al. 2018. « Tumour-Associated Missense Mutations in the DMI-2 ATPase Alters Nucleosome Remodelling Properties in a Mutation-Specific Manner ». *Nature Communications* 9 (1): 2112. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04503-2>.

Krogan, Nevan J., Kristin Baetz, Michael-Christopher Keogh, Nira Datta, Chika Sawa, Trevor C. Y. Kwok, Natalie J. Thompson, et al. 2004. « Regulation of Chromosome Stability by the Histone H2A Variant Htz1, the Swr1 Chromatin Remodeling Complex, and the Histone Acetyltransferase NuA4 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (37): 13513-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405753101>.

Krogan, Nevan J., Michael-Christopher Keogh, Nira Datta, Chika Sawa, Owen W. Ryan, Huiming Ding, Robin A. Haw, Jeffrey Pootoolal, Amy Tong, et Dawn P. Richards. 2003. « A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1 ». *Molecular cell* 12 (6): 1565–1576.

Kusch, Thomas, Laurence Florens, W. Hayes MacDonald, Selene K. Swanson, Robert L. Glaser, John R. Yates, Susan M. Abmayr, Michael P. Washburn, et Jerry L. Workman. 2004. « Acetylation by Tip60 Is Required for Selective Histone Variant Exchange at DNA Lesions ». *Science* 306 (5704): 2084-87. <https://doi.org/10.1126/science.1103455>.

Lachner, Monika, Dónal O'Carroll, Stephen Rea, Karl Mechtler, et Thomas Jenuwein. 2001. « Methylation of Histone H3 Lysine 9 Creates a Binding Site for HP1 Proteins ». *Nature* 410 (6824): 116-20. <https://doi.org/10.1038/35065132>.

Latrick, Chrysa M., Martin Marek, Khalid Ouararhni, Christophe Papin, Isabelle Stoll, Maria Ignatyeva, Arnaud Obri, et al. 2016. « Molecular Basis and Specificity of H2A.Z-H2B Recognition and Deposition by the Histone Chaperone YL1 ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (4): 309-16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3189>.

LaVallie, Edward R., Elizabeth A. DiBlasio, Sharlotte Kovacic, Kathleen L. Grant, Paul F. Schendel, et John M. McCoy. 1993. « A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the E. Coli Cytoplasm ». *Bio/Technology* 11 (2): 187-93. <https://doi.org/10.1038/nbt0293-187>.

Lawrence, Moyra, Sylvain Daujat, et Robert Schneider. 2016. « Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression ». *Trends in Genetics* 32 (1): 42-56. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>.

- Le Morvan, V., J.-L. Formento, G. Milano, J. Bonnet, et J. Robert. 2005. « Techniques de recherche des polymorphismes génétiques ». *Oncologie* 7 (1): 7-16. <https://doi.org/10.1007/s10269-005-0146-8>.
- Lehmann, Laura C., Graeme Hewitt, Shintaro Aibara, Alexander Leitner, Emil Marklund, Sarah L. Maslen, Varun Maturi, et al. 2017. « Mechanistic Insights into Autoinhibition of the Oncogenic Chromatin Remodeler ALC1 ». *Molecular Cell* 68 (5): 847-859.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.017>.
- Leppä, Virpi M., Stephanie N. Kravitz, Christa Lese Martin, Joris Andrieux, Cedric Le Caignec, Dominique Martin-Coignard, Christina DyBuncio, et al. 2016. « Rare Inherited and De Novo CNVs Reveal Complex Contributions to ASD Risk in Multiplex Families ». *American Journal of Human Genetics* 99 (3): 540-54. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.036>.
- Li, Bing, Samantha G. Pattenden, Daeyoung Lee, José Gutiérrez, Jie Chen, Chris Seidel, Jennifer Gerton, et Jerry L. Workman. 2005. « Preferential Occupancy of Histone Variant H2AZ at Inactive Promoters Influences Local Histone Modifications and Chromatin Remodeling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (51): 18385-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507975102>.
- Li, Guohong, et Danny Reinberg. 2011. « Chromatin Higher-Order Structures and Gene Regulation ». *Current Opinion in Genetics & Development, Chromosomes and expression mechanisms*, 21 (2): 175-86. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.01.022>.
- Liang, Xiaoping, Shan Shan, Lu Pan, Jicheng Zhao, Anand Ranjan, Feng Wang, Zhuqiang Zhang, et al. 2016. « Structural Basis of H2A.Z Recognition by SRCAP Chromatin-Remodeling Subunit YL1 ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (4): 317-23. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3190>.
- Link, Stephanie, Ramona M. M. Spitzer, Maryam Sana, Mario Torrado, Moritz C. Völker-Albert, Eva C. Keilhauer, Thomas Burgold, et al. 2018. « PWWP2A Binds Distinct Chromatin Moieties and Interacts with an MTA1-Specific Core NuRD Complex ». *Nature Communications* 9 (1): 4300. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06665-5>.
- Liu, Shan-Shan, Yin-Shan Bai, Li Feng, Wen-Wei Dong, Yang Li, Li-Ping Xu, et Ning-Fang Ma. 2016. « Identification of CHD1L as an Important Regulator for Spermatogonial Stem Cell Survival and Self-Renewal ». Research Article. *Stem Cells International*. Hindawi. 27 novembre 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4069543>.
- Liu, Xiaoyu, Meijing Li, Xian Xia, Xueming Li, et Zhucheng Chen. 2017. « Mechanism of Chromatin Remodelling Revealed by the Snf2-Nucleosome Structure ». *Nature* 544 (7651): 440-45. <https://doi.org/10.1038/nature22036>.
- Long, Mengping, Xulun Sun, Wenjin Shi, An Yanru, Sophia T. C. Leung, Dongbo Ding, Manjinder S. Cheema, et al. 2019. « A Novel Histone H4 Variant H4G Regulates RDNA Transcription in

Breast Cancer ». *Nucleic Acids Research* 47 (16): 8399-8409. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz547>.

Loviglio, Maria Nicla, Thomas Arbogast, Aia Elise Jønch, Stephan C. Collins, Konstantin Popadin, Camille S. Bonnet, Giuliana Giannuzzi, et al. 2017. « The Immune Signaling Adaptor LAT Contributes to the Neuroanatomical Phenotype of 16p11.2 BP2-BP3 CNVs ». *The American Journal of Human Genetics* 101 (4): 564-77. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.016>.

Lowary, P. T., et J. Widom. 1998. « New DNA Sequence Rules for High Affinity Binding to Histone Octamer and Sequence-Directed Nucleosome Positioning ». *Journal of Molecular Biology* 276 (1): 19-42. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1494>.

Luger, Karolin, Mekonnen L. Dechassa, et David J. Tremethick. 2012. « New Insights into Nucleosome and Chromatin Structure: An Ordered State or a Disordered Affair? » *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (7): 436-47. <https://doi.org/10.1038/nrm3382>.

Luger, Karolin, Armin W. Mäder, Robin K. Richmond, David F. Sargent, et Timothy J. Richmond. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution ». *Nature* 389 (6648): 251-60. <https://doi.org/10.1038/38444>.

Luger, Karolin, et Timothy J Richmond. 1998. « The Histone Tails of the Nucleosome ». *Current Opinion in Genetics & Development* 8 (2): 140-46. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80134-2](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80134-2).

Luk, Ed, Anand Ranjan, Peter C. FitzGerald, Gaku Mizuguchi, Yingzi Huang, Debbie Wei, et Carl Wu. 2010. « Stepwise Histone Replacement by SWR1 Requires Dual Activation with Histone H2A.Z and Canonical Nucleosome ». *Cell* 143 (5): 725-36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.019>.

Luk, Ed, Ngoc-Diep Vu, Kem Patteson, Gaku Mizuguchi, Wei-Hua Wu, Anand Ranjan, Jonathon Backus, et al. 2007. « Chz1, a Nuclear Chaperone for Histone H2AZ ». *Molecular Cell* 25 (3): 357-68. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.015>.

Lyko, Frank. 2018. « The DNA Methyltransferase Family: A Versatile Toolkit for Epigenetic Regulation ». *Nature Reviews Genetics* 19 (2): 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>.

Macé, Aurélien, Marcus A. Tuke, Patrick Deelen, Kati Kristiansson, Hannele Mattsson, Margit Nõukas, Yadav Sapkota, et al. 2017. « CNV-Association Meta-Analysis in 191,161 European Adults Reveals New Loci Associated with Anthropometric Traits ». *Nature Communications* 8 (1): 744. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00556-x>.

Malhotra, Dheeraj, et Jonathan Sebat. 2012. « CNVs: Harbingers of a Rare Variant Revolution in Psychiatric Genetics ». *Cell* 148 (6): 1223-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.039>.

Manning, Benjamin J., et Timur Yusufzai. 2017. « The ATP-Dependent Chromatin Remodeling Enzymes CHD6, CHD7, and CHD8 Exhibit Distinct Nucleosome Binding and Remodeling

Activities ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (28): 11927-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.779470>.

Marfella, Concetta G. A., et Anthony N. Imbalzano. 2007. « The Chd Family of Chromatin Remodelers ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Chromatin: Repair, Remodeling and Regulation*, 618 (1): 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.07.012>.

Markert, Jonathan, et Karolin Luger. 2020. « Nucleosomes Meet Their Remodeler Match ». *Trends in Biochemical Sciences*, septembre. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.08.010>.

Marshall, Christian R., Daniel P. Howrigan, Daniele Merico, Bhooma Thiruvahindrapuram, Wenting Wu, Douglas S. Greer, Danny Antaki, et al. 2017. « Contribution of Copy Number Variants to Schizophrenia from a Genome-Wide Study of 41,321 Subjects ». *Nature Genetics* 49 (1): 27-35. <https://doi.org/10.1038/ng.3725>.

Martin-Hernandez, K., J-M. Rodriguez-Vargas, V. Schreiber, et F. Dantzer. 2017. « Expanding Functions of ADP-Ribosylation in the Maintenance of Genome Integrity ». *Seminars in Cell & Developmental Biology, Regulation of development by SOX proteins*, 63 (mars): 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.09.009>.

Martire, Sara, et Laura A. Banaszynski. 2020. « The Roles of Histone Variants in Fine-Tuning Chromatin Organization and Function ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, juillet, 1-20. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0262-8>.

Marzluff, William F., Preetam Gongidi, Keith R. Woods, Jianping Jin, et Lois J. Maltais. 2002. « The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes ». *Genomics* 80 (5): 487-98. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6850>.

Marzluff, William F., Eric J. Wagner, et Robert J. Duronio. 2008. « Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail ». *Nature reviews. Genetics* 9 (11): 843-54. <https://doi.org/10.1038/nrg2438>.

Matilla, Antoni, et Martin Radrizzani. 2005. « The Anp32 Family of Proteins Containing Leucine-Rich Repeats ». *The Cerebellum* 4 (1): 7-18. <https://doi.org/10.1080/14734220410019020>.

Mavrich, Travis N., Cizhong Jiang, Ilya P. Ioshikhes, Xiaoyong Li, Bryan J. Venters, Sara J. Zanton, Lynn P. Tomsho, et al. 2008. « Nucleosome Organization in the Drosophila Genome ». *Nature* 453 (7193): 358-62. <https://doi.org/10.1038/nature06929>.

McCarroll, Steven A., Finny G. Kuruvilla, Joshua M. Korn, Simon Cawley, James Nemesh, Alec Wysoker, Michael H. Shapero, et al. 2008. « Integrated Detection and Population-Genetic Analysis of SNPs and Copy Number Variation ». *Nature Genetics* 40 (10): 1166-74. <https://doi.org/10.1038/ng.238>.

McGhee, James D., et Gary Felsenfeld. 1980. « Nucleosome Structure ». *Annual Review of Biochemistry* 49 (1): 1115-56. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.005343>.

McGinty, Robert K., et Song Tan. 2014. « Histone, Nucleosome, and Chromatin Structure ». In *Fundamentals of Chromatin*, édité par Jerry L. Workman et Susan M. Abmayr, 1-28. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8624-4_1.

McGinty, Robert K., et Song Tan. 2015. « Nucleosome Structure and Function ». *Chemical Reviews* 115 (6): 2255-73. <https://doi.org/10.1021/cr500373h>.

Mefford, Heather C., Gregory M. Cooper, Troy Zerr, Joshua D. Smith, Carl Baker, Neil Shafer, Erik C. Thorland, et al. 2009. « A Method for Rapid, Targeted CNV Genotyping Identifies Rare Variants Associated with Neurocognitive Disease ». *Genome Research* 19 (9): 1579-85. <https://doi.org/10.1101/gr.094987.109>.

Mendel, Gregor. 1865. « Versuche iber Pflanzen-Hybriden ». *Verh. Naturf. Verein, Briinn* 4: 1865.

Meneghini, Marc D., Michelle Wu, et Hiten D. Madhani. 2003. « Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin ». *Cell* 112 (5): 725-36. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00123-5).

Merikangas, Alison K., Aiden P. Corvin, et Louise Gallagher. 2009. « Copy-Number Variants in Neurodevelopmental Disorders: Promises and Challenges ». *Trends in Genetics* 25 (12): 536-44. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.10.006>.

Miranda Furtado, Cristiana Libardi, Maria Claudia Dos Santos Luciano, Renan Da Silva Santos, Gilvan Pessoa Furtado, Manoel Odorico Moraes, et Claudia Pessoa. 2019. « Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment ». *Epigenetics* 14 (12): 1164-76. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>.

Mizuguchi, Gaku, Xuetong Shen, Joe Landry, Wei-Hua Wu, Subhojit Sen, et Carl Wu. 2004. « ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex ». *Science* 303 (5656): 343–348.

Mohanty, Biswaranjan, Stephanie Helder, Ana P. G. Silva, Joel P. Mackay, et Daniel P. Ryan. 2016. « The Chromatin Remodelling Protein CHD1 Contains a Previously Unrecognised C-Terminal Helical Domain ». *Journal of Molecular Biology* 428 (21): 4298-4314. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.028>.

Moore, Shaun, N. Daniel Berger, Martijn S. Luijsterburg, Cortt G. Pielt, Fintan K. T. Stanley, Christoph U. Schröder, Shujuan Fang, et al. 2019. « The CHD6 Chromatin Remodeler Is an Oxidative DNA Damage Response Factor ». *Nature Communications* 10 (1): 241. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08111-y>.

Moosmann, Alexandra, Coen Campsteijn, Pascal WTC Jansen, Carole Nasrallah, Martina Raasholm, Henk G. Stunnenberg, et Eric M. Thompson. 2011. « Histone Variant Innovation in

a Rapidly Evolving Chordate Lineage ». *BMC Evolutionary Biology* 11 (1): 208. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-208>.

Morris, Mark. 2019. « The DNA Methylation Machinery: The Readers, Writers and Erasers of Methylcytosine and Their Regulation ». In , 47-64. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8958-0_2.

Morrison, Ashby J., et Xuetong Shen. 2005. « DNA Repair in the Context of Chromatin ». *Cell Cycle* 4 (4): 513-512. <https://doi.org/10.4161/cc.4.4.1612>.

Mu, Qing-Jie, Hong-Li Li, Yuan Yao, Shi-Chao Liu, Chong-Gao Yin, et Xue-Zhen Ma. 2015. « Chromodomain Helicase/ATPase DNA-Binding Protein 1-Like Gene (CHD1L) Expression and Implications for Invasion and Metastasis of Breast Cancer ». *PLOS ONE* 10 (11): e0143030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143030>.

Munemasa, Yoshiko, Toru Suzuki, Kenichi Aizawa, Saku Miyamoto, Yasushi Imai, Takayoshi Matsumura, Masami Horikoshi, et Ryoza Nagai. 2008. « Promoter Region-Specific Histone Incorporation by the Novel Histone Chaperone ANP32B and DNA-Binding Factor KLF5 ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (3): 1171-81. <https://doi.org/10.1128/MCB.01396-07>.

Mutai, Hideki, Yasushi Toyoshima, Weiyong Sun, Naka Hattori, Satoshi Tanaka, et Kunio Shiota. 2000. « PAL31, a Novel Nuclear Protein, Expressed in the Developing Brain ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274 (2): 427-33. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3133>.

Nam, Suk-Woo, et YANG Hee-Doo. 2019. Use of h2a. z. 1 as a hepatocellular carcinoma biomarker, issued 29 août 2019.

Nan, Xinsheng, Huck-Hui Ng, Colin A. Johnson, Carol D. Laherty, Bryan M. Turner, Robert N. Eisenman, et Adrian Bird. 1998. « Transcriptional Repression by the Methyl-CpG-Binding Protein MeCP2 Involves a Histone Deacetylase Complex ». *Nature* 393 (6683): 386-89. <https://doi.org/10.1038/30764>.

Narlikar, Geeta J., Ramasubramanian Sundaramoorthy, et Tom Owen-Hughes. 2013. « Mechanisms and Functions of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes ». *Cell* 154 (3): 490-503. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.011>.

Nguyen, Vu Q., Anand Ranjan, Florian Stengel, Debbie Wei, Ruedi Aebersold, Carl Wu, et Andres E. Leschziner. 2013. « Molecular Architecture of the ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complex SWR1 ». *Cell* 154 (6): 1220-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.018>.

Nieto-Estevez, Vanesa, et Jenny Hsieh. 2018. « CHD2: One Gene, Many Roles ». *Neuron* 100 (5): 1014-16. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.036>.

Nodelman, Ilana M., Franziska Bleichert, Ashok Patel, Ren Ren, Kyle C. Horvath, James M. Berger, et Gregory D. Bowman. 2017. « Interdomain Communication of the Chd1 Chromatin

Remodeler across the DNA Gyres of the Nucleosome ». *Molecular Cell* 65 (3): 447-459.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.011>.

North, Justin A., Sarah Javid, Michelle B. Ferdinand, Nilanjana Chatterjee, Jonathan W. Picking, Matthew Shoffner, Robin J. Nakkula, et al. 2011. « Phosphorylation of Histone H3(T118) Alters Nucleosome Dynamics and Remodeling ». *Nucleic Acids Research* 39 (15): 6465-74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr304>.

Nowakowska, Beata. 2017. « Clinical interpretation of copy number variants in the human genome ». *Journal of Applied Genetics* 58 (4): 449-57. <https://doi.org/10.1007/s13353-017-0407-4>.

Obri, Arnaud, Khalid Ouararhni, Christophe Papin, Marie-Laure Diebold, Kiran Padmanabhan, Martin Marek, Isabelle Stoll, et al. 2014. « ANP32E Is a Histone Chaperone That Removes H2A.Z from Chromatin ». *Nature* 505 (7485): 648-53. <https://doi.org/10.1038/nature12922>.

Okuwaki, Mitsuru, Kohsuke Kato, Hideto Shimahara, Shin-ichi Tate, et Kyosuke Nagata. 2005. « Assembly and Disassembly of Nucleosome Core Particles Containing Histone Variants by Human Nucleosome Assembly Protein I ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (23): 10639-51. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10639-10651.2005>.

Olins, Ada L., et Donald E. Olins. 1974. « Spheroid Chromatin Units (v Bodies) ». *Science* 183 (4122): 330-32. <https://doi.org/10.1126/science.183.4122.330>.

Ooi, Soon-Keat, Shigeo Sato, Chieri Tomomori-Sato, Ronald C. Conaway, et Joan W. Conaway. 2020. « Activation of Alc1 (Chd1l) Nucleosome Remodeling by Parp-1-Dependent Poly(Adp-Ribosyl)ation ». *The FASEB Journal* 34 (S1): 1-1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.06254>.

O'Roak, Brian J., Laura Vives, Wenqing Fu, Jarrett D. Egertson, Ian B. Stanaway, Ian G. Phelps, Gemma Carvill, et al. 2012. « Multiplex Targeted Sequencing Identifies Recurrently Mutated Genes in Autism Spectrum Disorders ». *Science* 338 (6114): 1619-22. <https://doi.org/10.1126/science.1227764>.

Pande, Vineet. 2016. « Understanding the Complexity of Epigenetic Target Space ». *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (4): 1299-1307. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01507>.

Patel, Avinash B, Camille M Moore, Basil J Greber, Jie Luo, Stefan A Zukin, Jeff Ranish, et Eva Nogales. 2019. « Architecture of the chromatin remodeler RSC and insights into its nucleosome engagement ». Édité par Cynthia Wolberger. *eLife* 8 (décembre): e54449. <https://doi.org/10.7554/eLife.54449>.

Perell, Gabriella T., Neeraj K. Mishra, Babu Sudhamalla, Peter D. Ycas, Kabirul Islam, et William C. K. Pomerantz. 2017. « Specific Acetylation Patterns of H2A.Z Form Transient Interactions with the BPTF Bromodomain ». *Biochemistry* 56 (35): 4607-15. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00648>.

- Perrakis, Anastassis, et Christophe Romier. 2008. « Assembly of protein complexes by coexpression in prokaryotic and eukaryotic hosts: an overview ». In *Structural Proteomics*, 247–256. Springer.
- Pierson, Tyler Mark, Maria G. Otero, Katheryn Grand, Andrew Choi, John M. Graham, Juan I. Young, et Joel P. Mackay. 2019. « The NuRD Complex and Macrocephaly Associated Neurodevelopmental Disorders ». *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 181 (4): 548-56. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31752>.
- Pilarowski, Genay O., Hilary J. Vernon, Carolyn D. Applegate, Leandros Boukas, Megan T. Cho, Christina A. Gurnett, Paul J. Benke, et al. 2018. « Missense Variants in the Chromatin Remodeler CHD1 Are Associated with Neurodevelopmental Disability ». *Journal of Medical Genetics* 55 (8): 561-66. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104759>.
- Pines, Alex, Mischa G. Vrouwe, Jurgen A. Marteijn, Dimitris Typas, Martijn S. Luijsterburg, Medine Cansoy, Paul Hensbergen, et al. 2012. « PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1 ». *The Journal of Cell Biology* 199 (2): 235-49. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112132>.
- Piquet, Sandra, Florent Le Parc, Siau-Kun Bai, Odile Chevallier, Salomé Adam, et Sophie E. Polo. 2018. « The Histone Chaperone FACT Coordinates H2A.X-Dependent Signaling and Repair of DNA Damage ». *Molecular Cell* 72 (5): 888-901.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.010>.
- Platt, Randall J., Yang Zhou, Ian M. Slaymaker, Ashwin S. Shetty, Niels R. Weisbach, Jin-Ah Kim, Jitendra Sharma, et al. 2017. « Chd8 Mutation Leads to Autistic-like Behaviors and Impaired Striatal Circuits ». *Cell Reports* 19 (2): 335-50. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.052>.
- Poli, Jérôme, Susan M. Gasser, et Manolis Papamichos-Chronakis. 2017. « The INO80 remodeler in transcription, replication and repair ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1731): 20160290. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0290>.
- Portela, Anna, et Manel Esteller. 2010. « Epigenetic Modifications and Human Disease ». *Nature Biotechnology* 28 (10): 1057-68. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>.
- Pritchard, Antonia L. 2019. « The Role of Histone Variants in Cancer ». *Clinical Epigenetics*, septembre, 133-51. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8958-0_6.
- Probst, Aline V., Bénédicte Desvoves, et Crisanto Gutierrez. 2020. « Similar yet Critically Different: The Distribution, Dynamics and Function of Histone Variants ». *Journal of Experimental Botany* 71 (17): 5191-5204. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa230>.
- Pünzeler, Sebastian, Stephanie Link, Gabriele Wagner, Eva C Keilhauer, Nina Kronbeck, Ramona MM Spitzer, Susanne Leidescher, et al. 2017. « Multivalent binding of PWWP2A to H2A.Z regulates mitosis and neural crest differentiation ». *The EMBO Journal* 36 (15): 2263-79. <https://doi.org/10.15252/emj.201695757>.

Quénet, Delphine. 2018. « Chapter One - Histone Variants and Disease ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Friedemann Loos, 335:1-39. Transcriptional Gene Regulation in Health and Disease. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.006>.

Rack, Johannes Gregor Matthias, Dragutin Perina, et Ivan Ahel. 2016. « Macrodomains: structure, function, evolution, and catalytic activities ». *Annual review of biochemistry* 85: 431–454.

Ragvin, Anja, Håvard Valvatne, Sigrid Erdal, Vibeke Årskog, Katharina R. Tufteland, Kamilla Breen, Anne M. Øyan, et al. 2004. « Nucleosome Binding by the Bromodomain and PHD Finger of the Transcriptional Cofactor P300 ». *Journal of Molecular Biology* 337 (4): 773-88. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.01.051>.

Raisner, Ryan M., Paul D. Hartley, Marc D. Meneghini, Marie Z. Bao, Chih Long Liu, Stuart L. Schreiber, Oliver J. Rando, et Hiten D. Madhani. 2005. « Histone Variant H2A.Z Marks the 5' Ends of Both Active and Inactive Genes in Euchromatin ». *Cell* 123 (2): 233-48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.002>.

Ramzan, Firyal, Samantha D. Creighton, Meaghan Hall, Jennet Baumbach, Malak Wahdan, Sandra J. Poulson, Vassilia Michailidis, et al. 2020. « Sex-Specific Effects of the Histone Variant H2A.Z on Fear Memory, Stress-Enhanced Fear Learning and Hypersensitivity to Pain ». *Scientific Reports* 10 (1): 14331. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71229-x>.

Rangasamy, Danny, Ian Greaves, et David J. Tremethick. 2004. « RNA Interference Demonstrates a Novel Role for H2A.Z in Chromosome Segregation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (7): 650-55. <https://doi.org/10.1038/nsmb786>.

Ranjan, Anand, Vu Q. Nguyen, Sheng Liu, Jan Wisniewski, Jee Min Kim, Xiaona Tang, Gaku Mizuguchi, et al. 2020. « Live-Cell Single Particle Imaging Reveals the Role of RNA Polymerase II in Histone H2A.Z Eviction ». *BioRxiv*, février, 2020.02.13.947119. <https://doi.org/10.1101/2020.02.13.947119>.

Rasmussen, Theodore P., Tracy Huang, Mary-Ann Mastrangelo, Janet Loring, Barbara Panning, et Rudolf Jaenisch. 1999. « Messenger RNAs Encoding Mouse Histone MacroH2A1 Isoforms Are Expressed at Similar Levels in Male and Female Cells and Result from Alternative Splicing ». *Nucleic Acids Research* 27 (18): 3685-89. <https://doi.org/10.1093/nar/27.18.3685>.

Rea, Stephen, Frank Eisenhaber, Dónal O'Carroll, Brian D. Strahl, Zu-Wen Sun, Manfred Schmid, Susanne Opravil, et al. 2000. « Regulation of Chromatin Structure by Site-Specific Histone H3 Methyltransferases ». *Nature* 406 (6796): 593-99. <https://doi.org/10.1038/35020506>.

Reilly, Patrick T., Yun Yu, Ali Hamiche, et Lishun Wang. 2014. « Cracking the ANP32 Whips: Important Functions, Unequal Requirement, and Hints at Disease Implications ». *BioEssays*:

News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology 36 (11): 1062-71. <https://doi.org/10.1002/bies.201400058>.

Richmond, Timothy J., et Curt A. Davey. 2003. « The Structure of DNA in the Nucleosome Core ». *Nature* 423 (6936): 145-50. <https://doi.org/10.1038/nature01595>.

Robinson, Philip J. J., Louise Fairall, Van A. T. Huynh, et Daniela Rhodes. 2006. « EM Measurements Define the Dimensions of the “30-Nm” Chromatin Fiber: Evidence for a Compact, Interdigitated Structure ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (17): 6506-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601212103>.

Romier, C., M. Ben Jelloul, S. Albeck, G. Buchwald, D. Busso, P. H. N. Celie, E. Christodoulou, et al. 2006. « Co-Expression of Protein Complexes in Prokaryotic and Eukaryotic Hosts: Experimental Procedures, Database Tracking and Case Studies ». *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 62 (10): 1232-42. <https://doi.org/10.1107/S0907444906031003>.

Roos, Cajska. 2020. *Strategies for Co-Crystallizing Human Macro Domains Using Defined PAR Oligomers*. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-413647>.

Rossetto, Dorine, Nikita Avvakumov, et Jacques Côté. 2012. « Histone phosphorylation ». *Epigenetics* 7 (10): 1098-1108. <https://doi.org/10.4161/epi.21975>.

Ruhl, Donald D., Jingji Jin, Yong Cai, Selene Swanson, Laurence Florens, Michael P. Washburn, Ronald C. Conaway, Joan Weliky Conaway, et John C. Chrivia. 2006. « Purification of a Human SRCAP Complex That Remodels Chromatin by Incorporating the Histone Variant H2A.Z into Nucleosomes ». *Biochemistry* 45 (17): 5671-77. <https://doi.org/10.1021/bi060043d>.

Santisteban, Maria Soledad, Tatyana Kalashnikova, et M. Mitchell Smith. 2000. « Histone H2A.Z Regulates Transcription and Is Partially Redundant with Nucleosome Remodeling Complexes ». *Cell* 103 (3): 411-22. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00133-1).

Sarcinella, Elizabeth, Philip C. Zuzarte, Priscilla N. I. Lau, Ryan Draker, et Peter Cheung. 2007. « Monoubiquitylation of H2A.Z Distinguishes Its Association with Euchromatin or Facultative Heterochromatin ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (18): 6457-68. <https://doi.org/10.1128/MCB.00241-07>.

Schneider, Robert, Andrew J. Bannister, Christoph Weise, et Tony Kouzarides. 2004. « Direct Binding of INHAT to H3 Tails Disrupted by Modifications ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 23859-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400151200>.

Schulz, W. A., C. Steinhoff, et A. R. Florl. 2006. « Methylation of Endogenous Human Retroelements in Health and Disease ». In *DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer*, édité par Walter Doerfler et Petra Böhm, 211-50. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-31181-5_11.

- Schwartz, Yuri B, et Vincenzo Pirrotta. 2008. « Polycomb Complexes and Epigenetic States ». *Current Opinion in Cell Biology*, Nucleus and gene expression, 20 (3): 266-73. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.002>.
- Sellou, Hafida, Théo Lebeaupin, Catherine Chapuis, Rebecca Smith, Anna Hegele, Hari R. Singh, Marek Kozlowski, et al. 2016. « The poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeler Alc1 induces local chromatin relaxation upon DNA damage ». *Molecular Biology of the Cell* 27 (24): 3791-99. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0269>.
- Seo, Sang-beom, Todd Macfarlan, Peter McNamara, Rui Hong, Yuki Mukai, Soyoung Heo, et Debabrata Chakravarti. 2002. « Regulation of Histone Acetylation and Transcription by Nuclear Protein Pp32, a Subunit of the INHAT Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 14005-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112455200>.
- Seo, Sang-beom, Peter McNamara, Soyoung Heo, April Turner, William S Lane, et Debabrata Chakravarti. 2001. « Regulation of Histone Acetylation and Transcription by INHAT, a Human Cellular Complex Containing the Set Oncoprotein ». *Cell* 104 (1): 119-30. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00196-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00196-9).
- Seto, Edward, et Minoru Yoshida. 2014. « Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (4): a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>.
- Sharma, Gayatri, Sameer Mirza, Yi-Hsin Yang, Rajinder Parshad, Priya Hazrah, Siddartha Datta Gupta, et Ranju Ralhan. 2009. « Prognostic Relevance of Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Breast Cancer Patients ». *Analytical Cellular Pathology* 31 (6): 487-500. <https://doi.org/10.3233/CLO-2009-0507>.
- Shen, Tianjin, Fen Ji, Zengqiang Yuan, et Jianwei Jiao. 2015. « CHD2 Is Required for Embryonic Neurogenesis in the Developing Cerebral Cortex ». *STEM CELLS* 33 (6): 1794-1806. <https://doi.org/10.1002/stem.2001>.
- Shen, Xuetong, Gaku Mizuguchi, Ali Hamiche, et Carl Wu. 2000. « A Chromatin Remodelling Complex Involved in Transcription and DNA Processing ». *Nature* 406 (6795): 541-44. <https://doi.org/10.1038/35020123>.
- Shen, Xuetong, Ryan Ranallo, Eugene Choi, et Carl Wu. 2003. « Involvement of Actin-Related Proteins in ATP-Dependent Chromatin Remodeling ». *Molecular Cell* 12 (1): 147-55. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00264-8).
- Shi, Xiaobing, Tao Hong, Kay L. Walter, Mark Ewalt, Eriko Michishita, Tiffany Hung, Dylan Carney, et al. 2006. « ING2 PHD Domain Links Histone H3 Lysine 4 Methylation to Active Gene Repression ». *Nature* 442 (7098): 96-99. <https://doi.org/10.1038/nature04835>.
- Shim, Yoonjung, Ming-Rui Duan, Xuejing Chen, Michael J. Smerdon, et Jung-Hyun Min. 2012. « Polycistronic Coexpression and Nondenaturing Purification of Histone Octamers ». *Analytical Biochemistry* 427 (2): 190-92. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.05.006>.

- Shinawi, Marwan, et Sau Wai Cheung. 2008. « The Array CGH and Its Clinical Applications ». *Drug Discovery Today* 13 (17): 760-70. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.06.007>.
- Siegel, T. Nicolai, Doeke R. Hekstra, Louise E. Kemp, Luisa M. Figueiredo, Joanna E. Lowell, David Fenyo, Xuning Wang, Scott Dewell, et George A. M. Cross. 2009. « Four Histone Variants Mark the Boundaries of Polycistronic Transcription Units in *Trypanosoma Brucei* ». *Genes & Development* 23 (9): 1063-76. <https://doi.org/10.1101/gad.1790409>.
- Simpson, R. T., et D. W. Stafford. 1983. « Structural Features of a Phased Nucleosome Core Particle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (1): 51-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.1.51>.
- Simpson, Robert T. 1978. « Structure of the Chromatosome, a Chromatin Particle Containing 160 Base Pairs of DNA and All the Histones ». Research-article. American Chemical Society. World. 1978. <https://doi.org/10.1021/bi00618a030>.
- Sims, Jennifer K., et Paul A. Wade. 2011. « SnapShot: chromatin remodeling: CHD ». *Cell* 144 (4): 626–626.
- Sims, Robert J., Chi-Fu Chen, Helena Santos-Rosa, Tony Kouzarides, Smita S. Patel, et Danny Reinberg. 2005. « Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (51): 41789–41792.
- Singh, Hari R., Aurelio P. Nardoza, Ingvar R. Möller, Gunnar Knobloch, Hans A. V. Kistemaker, Markus Hassler, Nadine Harrer, et al. 2017. « A Poly-ADP-Ribose Trigger Releases the Auto-Inhibition of a Chromatin Remodeling Oncogene ». *Molecular Cell* 68 (5): 860-871.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.019>.
- Singh, Hari Raj. 2018. « Allosteric activation mechanism of a human oncogenic chromatin remodeler ALC1 ». Text.PhDThesis, Ludwig-Maximilians-Universität München. <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/21965/>.
- Snider, Alyssa C., Denise Leong, Q. Tian Wang, Joanna Wysocka, Mylene W. M. Yao, et Matthew P. Scott. 2013. « The Chromatin Remodeling Factor Chd1l Is Required in the Preimplantation Embryo ». *Biology Open* 2 (2): 121-31. <https://doi.org/10.1242/bio.20122949>.
- Song, Chun-Xiao, et Chuan He. 2013. « Potential Functional Roles of DNA Demethylation Intermediates ». *Trends in Biochemical Sciences* 38 (10): 480-84. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.07.003>.
- Song, Feng, Ping Chen, Dapeng Sun, Mingzhu Wang, Liping Dong, Dan Liang, Rui-Ming Xu, Ping Zhu, et Guohong Li. 2014. « Cryo-EM Study of the Chromatin Fiber Reveals a Double Helix Twisted by Tetranucleosomal Units ». *Science* 344 (6182): 376-80. <https://doi.org/10.1126/science.1251413>.

- Steunou, Anne-Lise, Dorine Rossetto, et Jacques Côté. 2014. « Regulating Chromatin by Histone Acetylation ». In *Fundamentals of Chromatin*, édité par Jerry L. Workman et Susan M. Abmayr, 147-212. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8624-4_4.
- Steward, Melissa M., Jung-Shin Lee, Aisling O'Donovan, Matt Wyatt, Bradley E. Bernstein, et Ali Shilatifard. 2006. « Molecular Regulation of H3K4 Trimethylation by ASH2L, a Shared Subunit of MLL Complexes ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (9): 852-54. <https://doi.org/10.1038/nsmb1131>.
- Stockdale, Chris, Andrew Flaus, Helder Ferreira, et Tom Owen-Hughes. 2006. « Analysis of Nucleosome Repositioning by Yeast ISWI and Chd1 Chromatin Remodeling Complexes ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (24): 16279-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600682200>.
- Studier, F. William. 2005. « Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures ». *Protein Expression and Purification* 41 (1): 207-34. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.
- Su, Fa-Ren, Jing-Hua Ding, Lin Bo, et Xin-Gang Liu. 2014. « Chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein 1-like protein expression predicts poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 8 (6): 1745-50. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.2017>.
- Sugathan, Aarathi, Marta Biagioli, Christelle Golzio, Serkan Erdin, Ian Blumenthal, Poornima Manavalan, Ashok Ragavendran, et al. 2014. « CHD8 Regulates Neurodevelopmental Pathways Associated with Autism Spectrum Disorder in Neural Progenitors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (42): E4468-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405266111>.
- Sun, Yingli, Xiaofeng Jiang, Ye Xu, Marina K. Ayrappetov, Lisa A. Moreau, Johnathan R. Whetstine, et Brendan D. Price. 2009. « Histone H3 Methylation Links DNA Damage Detection to Activation of the Tumour Suppressor Tip60 ». *Nature Cell Biology* 11 (11): 1376-82. <https://doi.org/10.1038/ncb1982>.
- Sun, Zhen, Dan Filipescu, Joshua Andrade, Alexandre Gaspar-Maia, Beatrix Ueberheide, et Emily Bernstein. 2018. « Transcription-Associated Histone Pruning Demarcates MacroH2A Chromatin Domains ». *Nature Structural & Molecular Biology* 25 (10): 958-70. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0134-5>.
- Sundaram, Rajivgandhi, et Dileep Vasudevan. 2020. « Structural Basis of Nucleosome Recognition and Modulation ». *BioEssays* 42 (9): 1900234. <https://doi.org/10.1002/bies.201900234>.
- Sundaramoorthy, Ramasubramanian, Amanda L Hughes, Hassane El-Mkami, David G Norman, Helder Ferreira, et Tom Owen-Hughes. 2018. « Structure of the chromatin remodelling enzyme Chd1 bound to a ubiquitinated nucleosome ». Édité par Geeta J Narlikar, John

Kuriyan, Hitoshi Kurumizaka, et Song Tan. *eLife* 7 (août): e35720. <https://doi.org/10.7554/eLife.35720>.

Suto, Robert K., Michael J. Clarkson, David J. Tremethick, et Karolin Luger. 2000. « Crystal Structure of a Nucleosome Core Particle Containing the Variant Histone H2A.Z ». *Nature Structural & Molecular Biology* 7 (12): 1121-24. <https://doi.org/10.1038/81971>.

Svotelis, Amy, Nicolas Gévry, Gilles Grondin, et Luc Gaudreau. 2010. « H2A.Z overexpression promotes cellular proliferation of breast cancer cells ». *Cell Cycle* 9 (2): 364-70. <https://doi.org/10.4161/cc.9.2.10465>.

Szenker, Emmanuelle, Ekaterina Boyarchuk, et Geneviève Almouzni. 2014. « Properties and Functions of Histone Variants ». In *Fundamentals of Chromatin*, édité par Jerry L. Workman et Susan M. Abmayr, 375-426. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8624-4_10.

Talbert, Paul B., Kami Ahmad, Geneviève Almouzni, Juan Ausió, Frederic Berger, Prem L. Bhalla, William M. Bonner, et al. 2012. « A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants ». *Epigenetics & Chromatin* 5 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-5-7>.

Tallis, Michael, Rosa Morra, Eva Barkauskaite, et Ivan Ahel. 2014. « Poly(ADP-Ribosyl)ation in Regulation of Chromatin Structure and the DNA Damage Response ». *Chromosoma* 123 (1): 79-90. <https://doi.org/10.1007/s00412-013-0442-9>.

Taverna, Sean D., Haitao Li, Alexander J. Ruthenburg, C. David Allis, et Dinshaw J. Patel. 2007. « How Chromatin-Binding Modules Interpret Histone Modifications: Lessons from Professional Pocket Pickers ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (11): 1025-40. <https://doi.org/10.1038/nsmb1338>.

Thoma, F., et Th. Koller. 1981. « Unravelling Nucleosomes, Nucleosome Beads and Higher Order Structures of Chromatin: Influence of Non-Histone Components and Histone H1 ». *Journal of Molecular Biology* 149 (4): 709-33. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90354-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90354-5).

Thompson, Brandi A., Véronique Tremblay, Grace Lin, et Daniel A. Bochar. 2008. « CHD8 Is an ATP-Dependent Chromatin Remodeling Factor That Regulates β -Catenin Target Genes ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (12): 3894-3904. <https://doi.org/10.1128/MCB.00322-08>.

Tochio, Naoya, Takashi Umehara, Yoshiko Munemasa, Toru Suzuki, Shin Sato, Kengo Tsuda, Seizo Koshihara, Takanori Kigawa, Ryozi Nagai, et Shigeyuki Yokoyama. 2010. « Solution Structure of Histone Chaperone ANP32B: Interaction with Core Histones H3–H4 through Its Acidic Concave Domain ». *Journal of Molecular Biology* 401 (1): 97-114. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.005>.

Tollefsbol, Trygve O. 2018. « Epigenetics of Human Disease ». In *Epigenetics in Human Disease*, 3-10. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812215-0.00001-7>.

- Tonna, Stephen, Assam El-Osta, Mark E. Cooper, et Chris Tikellis. 2010. « Metabolic Memory and Diabetic Nephropathy: Potential Role for Epigenetic Mechanisms ». *Nature Reviews Nephrology* 6 (6): 332-41. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.55>.
- Torigoe, Sharon E., Debra L. Urwin, Haruhiko Ishii, Douglas E. Smith, et James T. Kadonaga. 2011. « Identification of a Rapidly Formed Nonnucleosomal Histone-DNA Intermediate That Is Converted into Chromatin by ACF ». *Molecular Cell* 43 (4): 638-48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.017>.
- Tosi, Alessandro, Caroline Haas, Franz Herzog, Andrea Gilmozzi, Otto Berninghausen, Charlotte Ungewickell, Christian B. Gerhold, et al. 2013. « Structure and Subunit Topology of the INO80 Chromatin Remodeler and Its Nucleosome Complex ». *Cell* 154 (6): 1207-19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.016>.
- Tsai, Cheng-Hui, Yun-Ju Chen, Chia-Jung Yu, Shiou-Ru Tzeng, I.-Chen Wu, Wen-Hung Kuo, Ming-Chieh Lin, Nei-Li Chan, Kou-Juey Wu, et Shu-Chun Teng. 2016. « SMYD3-Mediated H2A.Z.1 Methylation Promotes Cell Cycle and Cancer Proliferation ». *Cancer Research* 76 (20): 6043-53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0500>.
- Tsuda, Masataka, Kosai Cho, Masato Ooka, Naoto Shimizu, Reiko Watanabe, Akira Yasui, Yuka Nakazawa, et al. 2017. « ALC1/CHD1L, a Chromatin-Remodeling Enzyme, Is Required for Efficient Base Excision Repair ». *PLOS ONE* 12 (11): e0188320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188320>.
- Tweedie-Cullen, Ry Y., Andrea M. Brunner, Jonas Grossmann, Safa Mohanna, David Sichau, Paolo Nanni, Christian Panse, et Isabelle M. Mansuy. 2012. « Identification of Combinatorial Patterns of Post-Translational Modifications on Individual Histones in the Mouse Brain ». *PLOS ONE* 7 (5): e36980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036980>.
- Valdés-Mora, Fátima, Jenny Z. Song, Aaron L. Statham, Dario Strbenac, Mark D. Robinson, Shalima S. Nair, Kate I. Patterson, David J. Tremethick, Clare Stirzaker, et Susan J. Clark. 2012. « Acetylation of H2A.Z Is a Key Epigenetic Modification Associated with Gene Dereglulation and Epigenetic Remodeling in Cancer ». *Genome Research* 22 (2): 307-21. <https://doi.org/10.1101/gr.118919.110>.
- Vardabasso, Chiara, Alexandre Gaspar-Maia, Dan Hasson, Sebastian Pünzeler, David Valle-Garcia, Tobias Straub, Eva C. Keilhauer, et al. 2015. « Histone Variant H2A.Z.2 Mediates Proliferation and Drug Sensitivity of Malignant Melanoma ». *Molecular Cell* 59 (1): 75-88. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.009>.
- Vardabasso, Chiara, Sandra B. Hake, et Emily Bernstein. 2016. « Histone variant H2A.Z.2: A novel driver of melanoma progression ». *Molecular & Cellular Oncology* 3 (2): e1073417. <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1073417>.

- Vardabasso, Chiara, Dan Hasson, Kajan Ratnakumar, Chi-Yeh Chung, Luis F. Duarte, et Emily Bernstein. 2014. « Histone Variants: Emerging Players in Cancer Biology ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (3): 379-404. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1343-z>.
- Venkatasubrahmanyam, Shivkumar, William W. Hwang, Marc D. Meneghini, Amy Hin Yan Tong, et Hiten D. Madhani. 2007. « Genome-Wide, as Opposed to Local, Antisilencing Is Mediated Redundantly by the Euchromatic Factors Set1 and H2A.Z ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (42): 16609-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700914104>.
- Vincentelli, Renaud, et Christophe Romier. 2013. « Expression in Escherichia coli: becoming faster and more complex ». *Current Opinion in Structural Biology* 23 (3): 326–334.
- Vincentelli, Renaud, et Christophe Romier. 2016. « Complex Reconstitution and Characterization by Combining Co-expression Techniques in Escherichia coli with High-Throughput ». In *ADVANCED TECHNOLOGIES FOR PROTEIN COMPLEX PRODUCTION AND CHARACTERIZATION*, édité par MC Vega, 896:43-58. Advances in Experimental Medicine and Biology. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27216-0_4.
- Waddington, C. H. 1942. « Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters ». *Nature* 150 (3811): 563-65. <https://doi.org/10.1038/150563a0>.
- Waddington, C. H. 2012. « The Epigenotype ». *International Journal of Epidemiology* 41 (1): 10-13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>.
- Wagner, Felix R., Christian Dienemann, Haibo Wang, Alexandra Stützer, Dimitry Tegunov, Henning Urlaub, et Patrick Cramer. 2020. « Structure of SWI/SNF Chromatin Remodeller RSC Bound to a Nucleosome ». *Nature* 579 (7799): 448-51. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2088-0>.
- Wang, Jian, Ming Liu, Leilei Chen, Tim Hon Man Chan, Lingxi Jiang, Yun-Fei Yuan, et Xin-Yuan Guan. 2015. « Overexpression of N-terminal kinase like gene promotes tumorigenicity of hepatocellular carcinoma by regulating cell cycle progression and cell motility ». *Oncotarget* 6 (3): 1618.
- Wang, Yunyun, Sheng Liu, Lu Sun, Ning Xu, Shan Shan, Fei Wu, Xiaoping Liang, et al. 2019. « Structural Insights into Histone Chaperone Chz1-Mediated H2A.Z Recognition and Histone Replacement ». *PLoS Biology* 17 (5): e3000277. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000277>.
- Watson, J. D., et F. H. C. Crick. 1953. « The Structure of Dna ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 18 (janvier): 123-31. <https://doi.org/10.1101/SQB.1953.018.01.020>.
- Weber, Christopher M., et Steven Henikoff. 2014. « Histone variants: dynamic punctuation in transcription ». *Genes & Development* 28 (7): 672-82. <https://doi.org/10.1101/gad.238873.114>.

- West, Michael HP, et William M. Bonner. 1980. « Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species ». *Biochemistry* 19 (14): 3238–3245.
- Whyte, Warren A., Steve Bilodeau, David A. Orlando, Heather A. Hoke, Garrett M. Frampton, Charles T. Foster, Shaun M. Cowley, et Richard A. Young. 2012. « Enhancer Decommissioning by LSD1 during Embryonic Stem Cell Differentiation ». *Nature* 482 (7384): 221-25. <https://doi.org/10.1038/nature10805>.
- Willhoft, Oliver, Mohamed Ghoneim, Chia-Liang Lin, Eugene Y. D. Chua, Martin Wilkinson, Yuriy Chaban, Rafael Ayala, et al. 2018. « Structure and Dynamics of the Yeast SWR1-Nucleosome Complex ». *Science* 362 (6411). <https://doi.org/10.1126/science.aat7716>.
- Willhoft, Oliver, et Dale B Wigley. 2020. « INO80 and SWR1 Complexes: The Non-Identical Twins of Chromatin Remodelling ». *Current Opinion in Structural Biology, Theory and Simulation, Macromolecular Assemblies*, 61 (avril): 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.09.002>.
- Wong, Madeline M., Linda K. Cox, et John C. Chrivia. 2007. « The Chromatin Remodeling Protein, SRCAP, Is Critical for Deposition of the Histone Variant H2A.Z at Promoters ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (36): 26132-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703418200>.
- Woodage, Trevor, Munira A. Basrai, Andreas D. Baxevanis, Philip Hieter, et Francis S. Collins. 1997. « Characterization of the CHD Family of Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (21): 11472-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11472>.
- Woodcock, Christopher L., et Rajarshi P. Ghosh. 2010. « Chromatin Higher-Order Structure and Dynamics ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5): a000596. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000596>.
- Woodcock, Christopher L., Arthur I. Skoultchi, et Yuhong Fan. 2006. « Role of Linker Histone in Chromatin Structure and Function: H1 Stoichiometry and Nucleosome Repeat Length ». *Chromosome Research* 14 (1): 17-25. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-1024-3>.
- Wu, C.-t., et J. R. Morris. 2001. « Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence ». *Science* 293 (5532): 1103-5. <https://doi.org/10.1126/science.293.5532.1103>.
- Wu, Wei-Hua, Samar Alami, Edward Luk, Chwen-Huey Wu, Subhojit Sen, Gaku Mizuguchi, Debbie Wei, et Carl Wu. 2005. « Swc2 Is a Widely Conserved H2AZ-Binding Module Essential for ATP-Dependent Histone Exchange ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (12): 1064-71. <https://doi.org/10.1038/nsmb1023>.
- Wu, Wei-Hua, Chwen-Huey Wu, Andreas Ladurner, Gaku Mizuguchi, Debbie Wei, Hua Xiao, Ed Luk, Anand Ranjan, et Carl Wu. 2009. « N Terminus of Swr1 Binds to Histone H2AZ and Provides a Platform for Subunit Assembly in the Chromatin Remodeling Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (10): 6200-6207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808830200>.

- Xia, Xian, Xiaoyu Liu, Tong Li, Xianyang Fang, et Zhucheng Chen. 2016. « Structure of chromatin remodeler Swi2/Snf2 in the resting state ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (8): 722.
- Xiao, Bing, Chun Jing, Jonathan R. Wilson, Philip A. Walker, Nishi Vasisht, Geoff Kelly, Steven Howell, Ian A. Taylor, G. Michael Blackburn, et Steven J. Gamblin. 2003. « Structure and Catalytic Mechanism of the Human Histone Methyltransferase SET7/9 ». *Nature* 421 (6923): 652-56. <https://doi.org/10.1038/nature01378>.
- Xu, Peng, Chengmin Li, Zhihong Chen, Shuanying Jiang, Shilong Fan, Jiawei Wang, Junbiao Dai, Ping Zhu, et Zhucheng Chen. 2016. « The NuA4 Core Complex Acetylates Nucleosomal Histone H4 through a Double Recognition Mechanism ». *Molecular Cell* 63 (6): 965-75. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.024>.
- Xu, Ye, Marina K. Ayrapetov, Chang Xu, Ozge Gursoy-Yuzugullu, Yiduo Hu, et Brendan D. Price. 2012. « Histone H2A.Z Controls a Critical Chromatin Remodeling Step Required for DNA Double-Strand Break Repair ». *Molecular Cell* 48 (5): 723-33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.026>.
- Yan, Lijuan, et Zhucheng Chen. 2020. « A Unifying Mechanism of DNA Translocation Underlying Chromatin Remodeling ». *Trends in Biochemical Sciences* 45 (3): 217-27. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.09.002>.
- Yan, Lijuan, Li Wang, Yuanyuan Tian, Xian Xia, et Zhucheng Chen. 2016. « Structure and Regulation of the Chromatin Remodeller ISWI ». *Nature* 540 (7633): 466-69. <https://doi.org/10.1038/nature20590>.
- Yan, Lijuan, Hao Wu, Xuemei Li, Ning Gao, et Zhucheng Chen. 2019. « Structures of the ISWI-Nucleosome Complex Reveal a Conserved Mechanism of Chromatin Remodeling ». *Nature Structural & Molecular Biology* 26 (4): 258-66. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0199-9>.
- Ye, Buqing, Liuliu Yang, Guomin Qian, Benyu Liu, Xiaoxiao Zhu, Pingping Zhu, Jing Ma, et al. 2020. « The chromatin remodeler SRCAP promotes self-renewal of intestinal stem cells ». *The EMBO Journal* 39 (13): e103786. <https://doi.org/10.15252/embj.2019103786>.
- Yun, Miyong, Jun Wu, Jerry L. Workman, et Bing Li. 2011. « Readers of Histone Modifications ». *Cell Research* 21 (4): 564-78. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.42>.
- Zhang, Zhihui, Xuejuan Wang, Jiyu Xin, Zhenrui Ding, Sheng Liu, Qianglin Fang, Na Yang, Ruimin Xu, et Gang Cai. 2018. « Architecture of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex ». *Protein & Cell* 9 (12): 1045-49. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0524-9>.
- Zheng, Hui, et Wei Xie. 2019. « The Role of 3D Genome Organization in Development and Cell Differentiation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (9): 535-50. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0132-4>.

- Zhou, Bing-Rui, Hanqiao Feng, Hidenori Kato, Liang Dai, Yuedong Yang, Yaoqi Zhou, et Yawen Bai. 2013. « Structural Insights into the Histone H1-Nucleosome Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (48): 19390-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314905110>.
- Zhou, Bing-Rui, Jiansheng Jiang, Hanqiao Feng, Rodolfo Ghirlando, T. Sam Xiao, et Yawen Bai. 2015. « Structural Mechanisms of Nucleosome Recognition by Linker Histones ». *Molecular Cell* 59 (4): 628-38. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.025>.
- Zhou, Coral Y., Stephanie L. Johnson, Nathan I. Gamarra, et Geeta J. Narlikar. 2016. « Mechanisms of ATP-Dependent Chromatin Remodeling Motors ». *Annual Review of Biophysics* 45 (1): 153-81. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051013-022819>.
- Zhou, Zheng, Hanqiao Feng, D. Flemming Hansen, Hidenori Kato, Ed Luk, Daron I. Freedberg, Lewis E. Kay, Carl Wu, et Yawen Bai. 2008. « NMR Structure of Chaperone Chz1 Complexed with Histones H2A.Z-H2B ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (8): 868-69. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1465>.
- Zilberman, Daniel, Devin Coleman-Derr, Tracy Ballinger, et Steven Henikoff. 2008. « Histone H2A.Z and DNA Methylation Are Mutually Antagonistic Chromatin Marks ». *Nature* 456 (7218): 125-29. <https://doi.org/10.1038/nature07324>.
- Ziller, Michael J., Hongcang Gu, Fabian Müller, Julie Donaghey, Linus T.-Y. Tsai, Oliver Kohlbacher, Philip L. De Jager, et al. 2013. « Charting a Dynamic DNA Methylation Landscape of the Human Genome ». *Nature* 500 (7463): 477-81. <https://doi.org/10.1038/nature12433>.
- Zlatanova, Jordanka, et Amit Thakar. 2008. « H2A.Z: View from the Top ». *Structure (London, England: 1993)* 16 (2): 166-79. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.12.008>.
- Żylicz, Jan J., et Edith Heard. 2020. « Molecular Mechanisms of Facultative Heterochromatin Formation: An X-Chromosome Perspective ». *Annual Review of Biochemistry* 89: 255-82. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012655>.

II. Sitographies et ouvrages utilisés

Encyclopédie ENCODE : <https://www.encodeproject.org/>

Histone DB 2.0 : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/HistoneDB2.0/>

Inserm : <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/autisme>

International Human Epigenome Consortium (IHEC): <http://ihec-epigenomes.org/>

NEB protocols : <https://www.nebiolabs.com.au/protocols/2012/06/02/dilution-assembly-protocol-e5350>

Cours de génomique fonctionnelle, Odile Lecompte, 2015

S. Weinman et P. Méhul, Toute la biochimie, Dunod, 2004

Résumé

La modulation de la structure de la chromatine régit l'accès à l'ADN. Elle régule ainsi les mécanismes nucléaires avec des conséquences directes sur la santé. Les effecteurs épigénétiques tels que les variants d'histone, chaperons d'histone et remodeleurs contribuent à cette modulation. Toutefois, de nombreuses questions subsistent sur la manière dont ces acteurs régulent les processus cellulaires.

Au cours de ma thèse, j'ai ainsi étudié plusieurs de ces effecteurs épigénétiques :

(1) L'interaction entre le variant d'histone H2A.Z et ses chaperons YL1 et ANP32E, interagissant avec les remodeleurs p400/TIP60 et SRCAP.

(2) Les isoformes et le mécanisme d'auto-inhibition de CHD1L, remodeleur impliqué dans des troubles neuro-développementaux.

Mes travaux ont permis de mieux comprendre l'action de YL1 et ANP32E et apportent de nouvelles caractéristiques fonctionnelles et structurales pour ANP32E. Ainsi, nous proposons un modèle d'éviction de H2A.Z/H2B par ANP32E.

Mes résultats ont également permis de caractériser deux isoformes de CHD1L, associées aux réarrangements chromosomiques de la région 1q21.1. et aux phénotypes neuro-développementaux.

L'ensemble de ces travaux permet une meilleure compréhension des processus de régulation épigénétique, ouvrant la voie au développement de thérapies ciblant ces effecteurs.

Mots clés : épigénétique, remodeleur, variant d'histone H2A.Z, chaperons d'histone, CHD1L, troubles neuro-développementaux.

Summary

Modulation of chromatin structure regulates access to the genetic information, thereby regulating all nuclear processes with direct implications in health and disease. Epigenetic effectors such as histone variants, histone chaperones, and ATP-dependent chromatin remodelers are major contributors to this modulation. However, many questions remain on how the physical and functional interplays between epigenetic actors regulate cellular processes.

During my Ph.D., I studied several of these epigenetic players:

(1) the interaction between histone variant H2A.Z and its specific chaperones YL1 and ANP32E, which interact with the chromatin remodelers p400/TIP60 and SRCAP.

(2) the isoforms and auto-inhibitory mechanism of the remodeler CHD1L, involved in neurodevelopmental diseases.

My results enlarge our knowledge on H2A.Z specific chaperones, YL1 and ANP32E. and provide new functional and structural features for ANP32E. Thus, we propose an eviction model of H2A.Z/H2B by ANP32E.

My work also provided new biochemical data on the characterization of two CHD1L isoforms, associated with chromosomal rearrangements of the 1q21.1 region and neurodevelopmental phenotypes.

This work contributes to a better understanding of epigenetic regulation processes, paving the way for the development of therapies targeting these effectors.

Key words: epigenetics, ATP-dependent chromatin remodelers, histone variant H2A.Z, histone chaperones, CHD1L, neurodevelopmental disorders