

PROFILS GÉNOMIQUES DE LA TRANSCRIPTION GÉNIQUE DURANT LA
PROGRESSION DU CYCLE DE DIVISION CELLULAIRE D'HÉPATOCYTES
SYNCHRONISÉS SUITE À UNE HÉPATECTOMIE PARTIELLE

par

Dominic Villeneuve

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, décembre 2013

Le 18 décembre 2013

Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Dominic Villeneuve dans sa version finale.

Membres du jury :

Professeur Winship Herr
Directeur de recherche
Centre Intégréatif de Génomique, Université de Lausanne

Professeur Luc Gaudreau
Codirecteur de recherche
Département de biologie, Université de Sherbrooke

Professeur Pierre-Étienne Jacques
Président-rapporteur
Département de biologie, Université de Sherbrooke

Professeur Benoît Leblanc
Membre interne
Département de biologie, Université de Sherbrooke

Professeure Nouria Hernandez
Directrice du Centre Intégréatif de génomique
Membre externe
Centre Intégréatif de Génomique, Université de Lausanne

SOMMAIRE

La capacité de régénération des foies de mammifères est considérable. Suite à une hépatectomie partielle, les hépatocytes entrent de façon synchrone dans un état de prolifération dans lequel ils quittent simultanément la phase G0 pour entrer en phase G1. Nous nous sommes intéressés aux changements épigénétiques et transcriptionnels qui surviennent durant ce processus. Pour ce faire, nous avons généré des données de ChIP-seq pour différents temps suivant cette chirurgie pour :

- la polymérase II (pol II),
- la polymérase III (pol III),
- les marqueurs épigénétiques H3K4me3 et H3K36me3,
- ainsi que le cofacteur de transcription HCF-1.

Ces données nous ont permis de suivre et d'explorer les modifications dans la transcription et les changements à travers le génome durant la régénération hépatique.

La chromatine a été préparée à partir de huit points dans le temps différents suivant l'hépatectomie partielle (1h, 10h, 20h, 28h, 36h, 44h, 48h and 60h). Les échantillons ont été séquencés avec la technologie dite "paired-end" (chaque fragment donnent lieu à deux lectures de 50 ou 100 nucléotides, une pour chaque bout) permettant la localisation précise et la longueur exacte de chaque fragment séquencé sur le génome. En moyenne, 225 millions de séquences ont été obtenues pour chaque échantillon, puis cartographiées sur le génome murin (C57BL6/J, assemblage MGSCv37/mm9, juillet 2007).

De façon consistante avec une synchronisation robuste du cycle de division cellulaire, les patrons de transcription des gènes du cycle cellulaire (par exemple, les cdks et les cyclines) révèlent un état actif ou inactif bien défini qui corrèle avec l'activité attendue du gène. Nous avons effectué une première analyse globale de l'occupation par la pol II à travers les différents points dans le temps et avons identifié 9 423 gènes montrant un changement significatif dans la fixation de la polymérase au promoteur. En groupant les gènes ayant un profil similaire, nous avons remarqué une concordance significative entre le point dans le temps du cycle cellulaire pendant lequel la pol II est présente de façon maximale au promoteur des gènes et la fonction qui leur est reliée. Nous continuons d'explorer gène par gène, les variations au niveau des marqueurs épigénétiques, en fonction du profil de fixation de la pol II. Aucune analyse n'a cependant encore débuté en ce qui concerne la pol III et le facteur de transcription HCF-1.

L'analyse continue de la transcription des gènes du cycle de division cellulaire durant ce processus de régénération hépatique vous sera présentée.

Mots-clés : hépatectomie partielle, cycle cellulaire, régénération hépatique, transcription, épigénétique, génomique.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier chaleureusement mon directeur de recherche, le professeur Winship Herr, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir permis de travailler sur ce projet et de l'utiliser comme mon projet de maîtrise et surtout, de m'avoir guidé tout au long de ces deux années passé dans son laboratoire. Je remercie énormément mon co-directeur de recherche, le professeur Luc Gaudreau, pour la considération de mon projet en tant que maîtrise à L'Université de Sherbrooke, et de son soutien tout au long de ce processus. Je tiens à remercier fortement la professeure Nouria Hernandez, qui m'a accueilli en premier lieu dans son laboratoire à l'Université de Lausanne (UNIL), et qui a ouvert la porte à cet enrichissant cheminement.

Je tiens à remercier grandement Leonor Rib, qui a effectué la majorité des analyses bio-informatiques requises dans ce projet, et Viviane Praz, par qui toute la bio-informatique prend forme au sein des laboratoires Herr et Hernandez. Je remercie beaucoup Nicolas Bonhoure, pour m'avoir montré la dissection sur des souris, et l'extraction des organes nécessaires pour mon projet. Un remerciement spécial pour Fabienne Lammers, qui gère le fonctionnement du laboratoire Herr et qui a toujours la solution aux nombreuses questions. Un grand remerciement à Shilpi Minocha, post-doctorante au laboratoire Herr, qui m'a montré plusieurs techniques et avec qui je démarre un nouveau projet relié aux hépatectomies et à la perte de HCF-1 dans le foie. Merci beaucoup à Marianne Renaud, qui m'a grandement aidé à la rédaction de mon mémoire avec tous ses conseils et trucs de rédaction. Je dois aussi remercier tous les membres du laboratoire Herr ainsi que du laboratoire Hernandez, d'avoir été

disponibles pour des discussions et d'avoir soutenu une atmosphère agréable durant toute la progression de mes recherches.

Merci aussi à Gisèle Ferrand, la vétérinaire de L'UNIL et de l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), pour son soutien au niveau des chirurgies et des nombreuses questions sur mes souris et à Sandra Offner, de l'EPFL, pour son soutien dans mon apprentissage de la technique d'hépatectomie partielle sur les souris. Je remercie également le consortium CycliX, qui est à la base même du projet sur lequel je travaille.

Finalement, le plus grand des remerciements à ma charmante épouse, Mélissa Lemesre, pour son soutien tout au long de mon cursus universitaire. Les discussions scientifiques au cours d'innombrables soirées, les échanges de connaissances ainsi que ses corrections m'ont toujours permis d'essayer de me surpasser et de donner le meilleur de moi-même pour l'impressionner et la séduire !

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
CHAPITRE 1.....	1
1.1. La transcription des gènes, et les facteurs impliqués	1
1.1.1. Structure d'un gène chez les mammifères	2
1.1.2. La polymérase II et son rôle.....	4
1.1.3. La polymérase III et son rôle.....	6
1.1.4. Les régulateurs, corégulateurs et facteurs généraux de la transcription de la pol II	8
1.2. La chromatine et les nucléosomes	11
1.2.1. Modifications post-traductionnelles des histones.....	12
1.2.2. Le code des histones et le lien avec la transcription génique.....	13
1.3. Le foie, modèle <i>in vivo</i>	14
1.3.1. Physiologie sommaire structurelle du foie	15
1.3.2. Le rôle majeur du foie dans l'organisme et son utilité dans l'étude des cycles nutritif et cellulaire	16
1.3.3. La régénération hépatique	17
1.4. La prolifération cellulaire.....	19
1.4.1. Les différentes phases du cycle cellulaire.....	21
1.4.2. L'importance du cycle circadien	23
1.5. Étude du cycle cellulaire dans le foie.....	27

1.5.1.	Description du projet de recherche	28
1.5.2.	But du projet de recherche.....	29
CHAPITRE 2		30
2.1.	Animaux utilisés	30
2.2.	Hépatectomie partielle.....	32
2.3.	Immunobuvardage de type western	34
2.4.	Coupe histologique.....	35
2.5.	Coloration hématoxyline et éosine (H&E) sur coupe histologique	35
2.6.	Immunofluorescence sur coupe histologique (IF)	36
2.7.	Immunoprécipitation de chromatine	37
2.8.	Préparation de bibliothèques de séquençage haut-débit	38
2.9.	Analyses bio-informatiques	39
CHAPITRE 3		41
3.1.	Validation de la régénération du foie dans notre système	41
3.2.	Définition des temps post-opératoires.....	44
3.3.	Immunoprécipitation de chromatine et préparation des bibliothèques de séquençage	48
3.4.	Validation des bibliothèques de séquençages de ChIPs	50
3.5.	Visualisation des données de ChIP-seq.....	53
3.6.	Analyses bio-informatiques	55
CHAPITRE 4		61
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		68
ANNEXES		70
Liste des annexes		70
BIBLIOGRAPHIE		81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2/3 HP : hépatectomie partielle de 70%

a.a. : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNnc : ARN non codant

ARNr : ARN ribosomique

ARNsn : petit ARN nucléaire (snRNA : small nuclear RNA)

ARNt : ARN de transfert

BrdU : bromodéoxyuridine

CDK : kinase cycline-dépendante

ChIP(s) : immunoprécipitation(s) de chromatine

CTD : domaine carboxy-terminal

EGF : Epidermal Growth Factor

GTF : plateforme de technologies génomiques

GTFs : facteurs généraux de transcription

H&E : hématoxyline et éosine

H2BK123ub : ubiquitinylation de la lysine 123 de l'histone H2B

H3K36me3 : triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3

H3K4me3 : triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3

HCF-1 : Host cell factor 1

HGF : Hepatocyte Growth Factor

IF : Immunofluorescence

kDa : kiloDalton

mM : millimolaire

ng : nanogramme

NGS : sérum de chèvre (normal goat serum)

O/N : toute la nuit (overnight)

Pb : paire de base

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PIC : complexe de pré-initiation de la transcription

Pol I, II, III : polymérase un, polymérase deux, polymérase trois

Pro : proline

Ser : sérine

Thr : Thréonine

TNF α : Tumor Necrosis Factor

TSS : site d'initiation de la transcription (Transcription Start Site)

Tyr : tyrosine

WB : immunobuvardage de type western

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Les sous-unités de la pol II et leurs descriptifs.....	4
Tableau 1.2 : Composition des facteurs généraux de transcription et leur fonction ...	10
Tableau 2.1 : Anticorps utilisés pour les expériences de WB, d'IF et de ChIP.....	34

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1.1 : Le cycle de phosphorylation du CTD de la grande sous-unité de la pol II.6

Figure 1.2 : Les différents ARN transcrits par la pol III sont classifiés en fonction du type de promoteur.7

Figure 1.3 : Formation du complexe de pré-initiation de la transcription9

Figure 1.4 : Dispersion des modifications post-traductionnelles sur les queues N-terminales d'histones 13

Figure 1.5 : Interrelation des cytokines, facteurs de croissance et métabolites lors de l'induction de la prolifération des hépatocytes 18

Figure 1.6 : Rondes de réplication des hépatocytes durant la régénération du foie induite par une hépatectomie partielle.....21

Figure 1.7 : Schéma du cycle cellulaire23

Figure 1.8 : Schéma du réseau de boucles de rétrocontrôle de l'horloge circadienne.25

Figure 1.9 : Schéma de l'influence du cycle circadien sur le cycle cellulaire.....27

CHAPITRE 2

Figure 2.1 : Schéma du foie et du placement des ligatures en vue d'une 2/3 HP.33

CHAPITRE 3

Figure 3.1 : Graphique de l'évolution du rapport du poids des foies sur le poids des souris.42

Figure 3.2: Evolution visuelle de la régénération du foie43

Figure 3.3 : Coloration H&E de sections de foie sans hépatectomie partielle et 48 heures après.....44

Figure 3.4 : Visualisation de plusieurs protéines par WB.....45

Figure 3.5 : Résultats d'immunofluorescence sur coupe histologique47

Figure 3.6 : Résultat de la fragmentation de la chromatine par sonication.....49

Figure 3.7 : Tailles des librairies analysées par l'appareil « Fragment Analyzer » et séquençage51

Figure 3.8 : Distribution de la redondance des fragments séquencés53

Figure 3.9 : Visualisation d'un locus autour du gène MKI6754

Figure 3.10 : Visualisation à l'échelle des gènes des niveaux de pol II et des marques épigénétiques H3K4me3 et H3K36me3 dans tous les points dans le temps56

Figure 3.11 : Cartographie du profil des 9423 gènes identifiés partitionnés en 6 groupes.....58

Figure 3.12 : Graphique des profils de chacun des groupes et la fonction primaire associée.....60

CHAPITRE 4

Figure 4.1 : modèle proposé du lien entre les phases du cycle de division cellulaire durant la première ronde de réplication en fonction du temps suivant une hépatectomie partielle67

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Tous les mammifères se développent à partir d'une seule cellule originelle, qui prolifère jusqu'à former un organisme entier. Grâce à une suite de cascades moléculaires irréversibles, le cycle cellulaire permet la duplication d'une cellule mère en deux cellules filles. Ce cycle est séparé en quatre phases précises, nommées G1, S, G2 et mitose, qui sont caractérisées par des cascades de signalisation spécifiques durant lesquelles la transcription des gènes est strictement régulée. Certains types cellulaires différenciés, tel que les hépatocytes du foie, sont dans une phase de quiescence nommée G0. Suite à un dommage tissulaire, ces cellules peuvent à nouveau entrer dans le cycle cellulaire afin de régénérer le tissu rapidement et ainsi restaurer la masse initiale du foie. La prolifération de ces cellules entraîne, par conséquent, un changement dans la régulation et l'expression des gènes.

1.1. La transcription des gènes, et les facteurs impliqués

Toutes les cellules contiennent du matériel génétique, composé d'acide désoxyribonucléique (ADN). Ce matériel sert de support stable, et permet de conserver l'information servant à obtenir différents types d'acides ribonucléiques (ARN) et des protéines. La transcription est un mécanisme par lequel une polymérase lit un brin d'ADN et synthétise un brin d'ARN complémentaire. Les ARN sont des molécules moins stables que l'ADN, et doivent être constamment renouvelées pour assurer leurs fonctions. Tel que rapporté par Schramm et Hernandez (2002), il existe trois différentes ARN polymérases chez les eucaryotes,

nommées pol I, pol II et pol III. La première est la seule à pouvoir transcrire les grandes répétitions en tandem des gènes d'ARN ribosomiaux (ARNr). La seconde permet de transcrire les ARN messagers (ARNm), qui codent pour des protéines, et une partie des petits ARN nucléaires (ARNsn), qui permettent notamment la conversion d'ARNm précurseurs en ARNm matures tels U1 à U5. Finalement, la troisième polymérase transcrit des gènes très courts, généralement de moins de 400 paires de bases, dont les produits ont une fonction structurale ou catalytique, tel que les ARN de transfert (ARNt), essentiels pour l'assemblage des protéines par les ribosomes, ou l'ARN U6, impliqué dans le spliceosome. Pour distinguer les produits de la transcription d'une polymérase ou d'une autre, il est possible d'utiliser l' α -amanitine, un inhibiteur de l'initiation et de l'élongation de la transcription qui lie directement les polymérases. Celles-ci sont différenciellement inhibées par cette drogue, la pol I y étant insensible, la pol II étant inhibée à la plus petite dose et la pol III ayant une sensibilité intermédiaire (10^{-6} millimolaire (mM) et 10^{-2} à 10^{-1} mM respectivement) (Dieci et al., 2007). La transcription est un mécanisme d'une incroyable complexité à chaque étape, et ceci de l'initiation jusqu'à la terminaison. Nous en survolerons quelques aspects en nous concentrant majoritairement sur la pol II.

1.1.1. Structure d'un gène chez les mammifères

Un gène est une séquence d'ADN destinée à être transcrite en ARNm ou autre ARN fonctionnel. Une grande partie des gènes transcrits par la pol II sont destinés à être traduits en chaîne polypeptidique correspondant à la séquence codante. La majorité des gènes est composée d'un promoteur, d'une séquence fonctionnelle, et d'un terminateur. La régulation des gènes est d'une grande complexité puisqu'elle peut être sous l'influence de régions activatrices distales ou proximales, d'un promoteur

basal, proximal et distal. D'autres éléments génétiques, certains mobiles, et des protéines peuvent aussi modifier l'expression d'un gène. Ces protéines, les facteurs généraux de transcription, les régulateurs et les corégulateurs, ont pour rôle de permettre l'initiation de la transcription à un moment défini et dans un type cellulaire défini (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

La séquence fonctionnelle consiste en région codante dans le cas des ARNm. Suite au site d'initiation de la transcription (TSS), situé dans le promoteur, se trouve une région 5' non-codante (5' UTR, 5' untranslated region). Puis la région codante commence, en général par le codon AUG, codant pour une méthionine. À la suite de ce codon initiateur, chaque trio de nucléotides forme un codon spécifiant un acide aminé (a.a.). Ce codon peut-être décrypté par le code génétique. Plusieurs ensembles de triplet de nucléotides peuvent coder pour le même a.a. Dans le génome des eucaryotes dits supérieurs, les régions codantes sont, à quelques exceptions près, séparées en petits exons et longs introns. Les exons sont les régions conservées lors de la maturation de l'ARNm et qui, en grande partie, codent directement pour les protéines. L'exome est l'ensemble de ces régions codantes pour les ARNm matures dans le génome. Les introns sont de longues régions non codantes, contenant parfois des gènes d'ARN régulateurs ou des régions promotrices pour d'autres gènes. La région codante se termine par un codon stop, UAA, UAG ou UGA, et est suivie par une région non-codante 3' (3' UTR). Le 3' UTR se termine souvent par une séquence de polyadénylation. Lors de la maturation de l'ARNm, cette séquence définit le site de coupure (une vingtaine de nucléotide en aval) suivi de l'ajout d'une queue poly A (AAUAAA chez l'humain), qui agit comme point de contrôle sur la majorité des ARNm. Il existe quelques exceptions, comme ARNm des histones, qui ne sont pas polyadénylés. Les particules ribonucléoprotéiques se lient à l'ARNm précurseur et permettent notamment l'exportation vers le cytoplasme pour la traduction ou la rétention au site de transcription et la dégradation (Hilleren et al., 2001).

1.1.2. La polymérase II et son rôle

L'ARN pol II est un complexe de 12 sous-unités, ayant un poids moléculaire total d'environ 550 kiloDalton (kDa). Les sous-unités sont nommées RPB1 à RPB12 et sont encodées par les gènes POLR2(X) où (X) varie selon les sous-unités comme indiqué dans le tableau 1.1, adapté de Myer et Young, 1998. La structure tri-dimensionnelle de la pol II a déjà été mise à jour. Les sous-unités RPB1 et RPB2 forment le centre catalytique de l'enzyme et jouent un rôle crucial dans la régulation de l'initiation, l'élongation et la terminaison de la transcription.

Tableau 1.1 : Les sous-unités de la pol II et leurs descriptifs

Sous-unité	Gène POLR2(X)	Poid moléculaire (kDa)	Essentiel (oui ou non)	Descriptif
RPB1	POLR2A	192	Oui	Centre catalytique, répétition heptapeptidique
RPB2	POLR2B	139	Oui	Centre catalytique
RPB3	POLR2C	35	Oui	Unique à pol II
RPB4	POLR2D	25	Non	Unique à pol II
RPB5	POLR2E	25	Oui	Commune avec pol I et III
RPB6	POLR2F	18	Oui	Commune avec pol I et III
RPB7	POLR2G	19	Oui	Unique à pol II
RPB8	POLR2H	17	Oui	Commune avec pol I et III
RPB9	POLR2I	14	Non	
RPB10	POLR2L	8	Oui	Commune avec pol I et III
RPB11-a	POLR2J	T	T	

RPB11-b	POL2RJ2	14	Oui	
RPB11-c	POL2RJ3	⊥	⊥	
RPB12	POLR2K	8	Oui	Commune avec pol I et III

RPB1 est la plus grosse et la plus importante des sous-unités. Elle fait partie du cœur de l'enzyme et contient un important domaine carboxy-terminal (CTD) unique à la pol II. Le CTD est composé de 52 répétitions heptapeptidiques chez les vertébrés, 42 chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, 32 chez le ver *Caenorhabditis elegans* et 26 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Une répétition est composée des peptides tyrosine (Tyr), sérine (Ser), proline (Pro) et thréonine (Thr) sous la forme Tyr1–Ser2–Pro3–Thr4–Ser5–Pro6–Ser7. Le CTD est le substrat de plusieurs kinases qui régulent la transcription de l'ADN par la pol II (voir la figure 1.1). Le CTD fait l'objet à lui seul l'objet de plusieurs études (Hsin et Manley, 2012 ; Egloff et al., 2012).

La pol II transcrit l'ensemble de gènes le plus hétérogène des trois polymérases, et la structure des promoteurs auxquels elle se lie est donc d'une grande diversité. Même si sa fonction est de transcrire tous les gènes codant pour des protéines en plus de certains ARN non codants (ARNnc), elle contribue pour moins de 10% de l'ARN total produit dans les cellules en croissance (Werner et al., 2009).

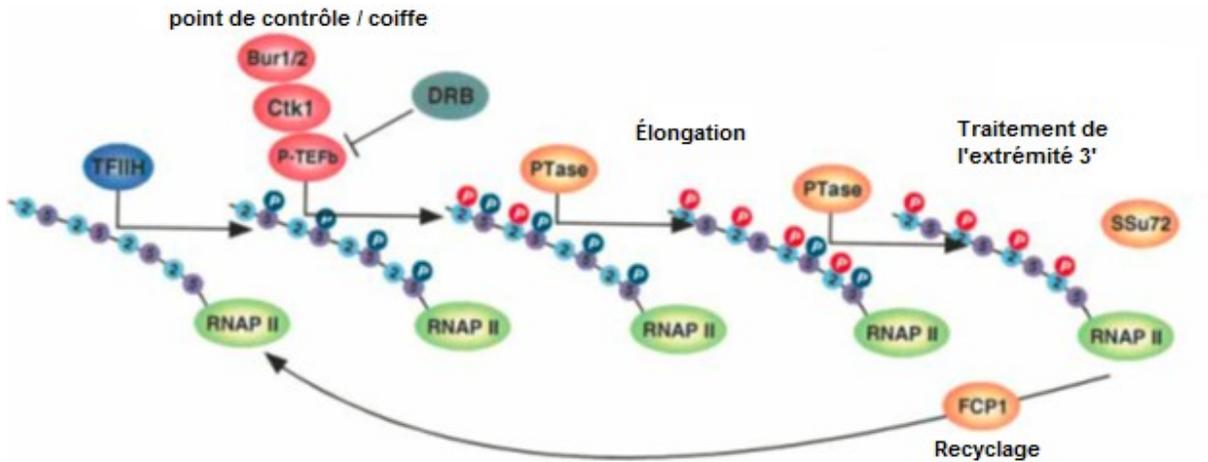


Figure 1.1 : Le cycle de phosphorylation du CTD de la grande sous-unité de la pol II.

De façon séquentielle, des kinases et phosphatases viennent phosphoryler ou déphosphoryler les Ser2 et Ser5 pour réguler l'enzyme durant l'initiation et la progression de la transcription (figure modifiée de Sims III et al., 2004).

1.1.3. La polymérase III et son rôle

La pol III contient 17 sous-unités, dont une partie est partagée avec la pol II (voir le tableau 1.1). Il y en a 10 qui sont uniques à la pol III, nommée RPC1 à RPC10. RPC1 et RPC2 correspondent fonctionnellement aux sous-unités RPB1 et RPB2, c'est-à-dire qu'elles constituent le centre actif de l'enzyme. Les sous-unités RPC8, 9 et 10 ont aussi leur paralogue chez la pol II, respectivement RPB7, 4 et 9. Les 5 sous-unités communes avec les autres polymérases sont désignées sous le nom RPABC1 à RPABC5, et correspondent respectivement à RPB5, 6, 8, 10 et 12. Finalement, les deux communes avec la pol I sont désignées RPAC1 et RPAC2, et leur paralogue chez la pol II sont RPB3 et RPB11 (Hu et al., 2002).

Elle transcrit un petit éventail de gènes, mais ses produits comptent pour environ 15% de la quantité total d'ARN dans une cellule en croissance (Werner et al., 2009). Dieci et al. ont inventorié en 2007 les plus connus des gènes qui lui sont dédiés : les tRNAs, l'ARN 5S, l'ARNsn U6, l'ARN endoribonucléase P (RNase P), la RNase MRP, l'ARN 7SL, les ARN « vaults » (vRNAs), les ARN Y, l'ARN 7SK, les ARN BC1 et BC200, les ARN viraux et les petits éléments nucléaires intercalés (SINEs). Plus récemment chez l'homme, il y a aussi des microARN, des ARNnc régulateurs et des ARNnc induits par le virus d'Epstein-Barr. Ils sont classifiés selon trois différents types de promoteurs, 1, 2 et 3, selon l'organisation et la présence de différents éléments, tel que sur la figure 1.2.

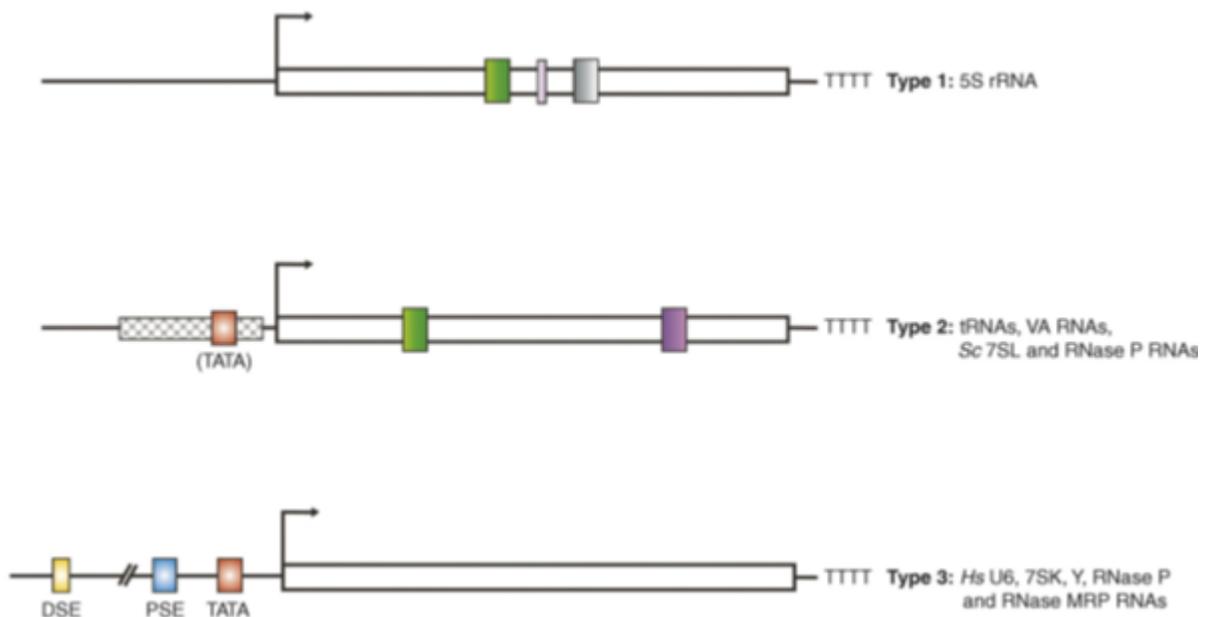


Figure 1.2 : Les différents ARN transcrits par la pol III sont classifiés en fonction du type de promoteur.

Le promoteur de type 1 est interne au gène et est constitué d'une boîte A, d'une région intermédiaire et d'une boîte B. Le type 2 est aussi interne au gène et contient les boîtes A et B. Il peut aussi contenir une séquence apparentée à une boîte TATA. Le promoteur de type 3 est quant à lui plus ressemblant aux promoteurs pol II, en

amont des gènes (figure adaptée de Dieci et al., 2007). Pour les terminateurs des gènes pol III, la région terminatrice arbore le plus fréquemment une série de 4 thymidine réparties sur 5 bases. Pour les ARNt, cette suite se situe le plus souvent dans les 50 nucléotides suivant la dernière base de l'ARNt mature. Cela permet à la fois une terminaison efficace et une réinitiation facilitée. (Orioli et al, 2011).

1.1.4. Les régulateurs, corégulateurs et facteurs généraux de la transcription de la pol II

Les régulateurs et corégulateurs de la transcription sont les protéines qui régissent l'expression des gènes. Ils sont d'une importance capitale, et leur dérèglement mène à une grande diversité de maladies. Le génome code pour environ 1850 facteurs de transcription liant l'ADN, parmi les 20 000 – 25 000 gènes estimés codant pour des protéines. Ces facteurs de transcription sont majoritairement composés d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine d'activation séparé. Les corégulateurs, qui n'ont pas de domaine leur permettant la liaison directe à l'ADN, participent à la transcription en reliant les activateurs et les répresseurs à la machinerie transcriptionnelle générale (Maston et al., 2006).

Un bon exemple de corégulateur transcriptionnel est la protéine « Host Cell Factor 1 » (HCF-1). HCF-1 est un complexe hétérodimérique formé à partir d'un seul précurseur de 2035 a.a. qui est clivé en deux sous-unités : HCF-1_N et HCF-1_C. Ces deux sous-unités restent associées et jouent un rôle dans le cycle cellulaire. Il interagit en tant que corégulateur avec différents facteurs de transcription afin de recruter différents complexes de remodelage sur la chromatine (Wysocka et al, 2003 ; Tyagi et al, 2007). Grâce à ses différentes interactions, il peut aussi bien participer à l'activation qu'à la répression d'un gène. Il est principalement relié au contrôle de la

transition de la phase G1 vers la phase S, en interagissant avec la famille de protéine E2F (Zargar et Tyagi, 2012). Cependant, il est aussi requis pour la bonne progression de la mitose et de la cytokinèse (Julien et Herr, 2003). De manière plus générale, les facteurs généraux de transcription (GTFs) participent à l'initiation en formant un complexe de pré-initiation de la transcription (PIC), qui permet de recruter les polymérases au TSS. Ce phénomène est exposé dans la figure 1.3.

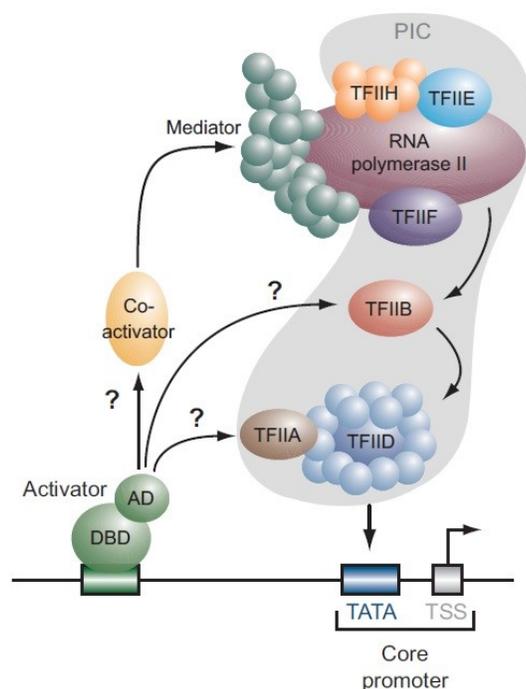


Figure 1.3 : Formation du complexe de pré-initiation de la transcription

La machinerie transcriptionnelle générale de la pol II s'assemble au promoteur proximal, de façon ordonnée afin d'apporter la polymérase au TSS. La transcription est grandement stimulée par les activateurs et les coactivateurs, qui stimulent la formation du PIC en liant une ou plusieurs sous-unités impliquées. La cible directe de ces activateurs et coactivateurs est généralement diverse et peu connue (Maston et al., 2006).

Les GTFs pour la pol II sont nommés TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH. Tel que décrit dans le tableau 1.2, adapté de Thomas et Chiang (2006), ceux-ci sont souvent composés de plusieurs sous-unités et chacun assure une fonction spécifique.

Tableau 1.2 : Composition des facteurs généraux de transcription et leur fonction

Facteur	Composition protéique	Fonction
TFIIA	p35 (α), p19 (β) et p21 (γ)	Antirépresseur, stabilise la liaison de TBP à la TATA.
TFIIB	p33	Sélectionne le TSS, stabilise le complexe TBP–TATA et recrute le complexe pol II/TFIIF
TFIID	TBP + TAFs (TAF1-TAF14)	Facteur de liaison au promoteur proximal, activité kinase, activité liée à l'ubiquitinylation, histone acétyltransférase
TFIIIE	p56 (α) et p34 (β)	Permet le recrutement de TFIIH, impliqué dans le dégagement du promoteur
TFIIF	RAP30 et RAP74	Lie l'ARN pol II facilite son recrutement au promoteur, recrute TFIIIE et TFIIH, sélectionne le TSS en partenariat avec TFIIB, facilite le départ et l'élongation de la transcription
TFIIH	p89/XPB, p80/XPD, p62, p52, p44, p40/CDK7, p38/Cycline H, p34, p32/MAT1 et p8/TFB5	Hélicase, activité ATPase, activité kinase sur le CTD de la pol II, activité E3 ubiquitine ligase, activité de réparation de l'ADN par excision de nucléotides couplé à la transcription

En complément de ces facteurs classiques, le médiateur est un complexe hautement important pour la transcription *in vivo*. Il n'est pas nécessaire dans un système de transcription *in vitro*, mais peut induire un niveau basal de transcription. Il sert de support et d'adaptateur structural aux différents complexes, en plus d'avoir plusieurs activités enzymatiques (Borggreve et al., 2002 ; Lorch et al., 2000 ; Brower et al., 2002).

1.2. La chromatine et les nucléosomes

La chromatine est la forme sous laquelle on retrouve l'ADN dans les noyaux. C'est une structure très dynamique, composé de l'ADN, d'ARN et de protéines associées qui permettent une compaction du génome. Sa structure fondamentale est composée d'histones, qui sont les sous-unités des nucléosomes. Dans chaque nucléosome, il y a deux dimères H2A/H2B ainsi qu'un tétramère H3/H4 qui s'associent et forment un cylindre aplati d'environ 11 nm de diamètre sur environ 5,5 nm de haut (Olins et Olins, 2003).

Au niveau de l'organisation, l'ADN est enroulé autour de chaque nucléosome de façon à former une structure en collier de perles, qui confère une compaction de l'ordre de 5 à 10 fois. Autour de chaque nucléosome s'enroule une longueur d'ADN correspondant à 146 paires de bases (pb) et résultant en 1 tour $\frac{3}{4}$. (Grunstein, 1992). Grâce à l'histone H1, associée à 20 pb en dehors du nucléosome, ce collier de perle se compacte d'avantage pour atteindre des niveaux de compaction de 50 fois et plus, représenté par des fibres de 30 nm et 300 nm. Le chromosome mitotique est quant à lui d'une largeur d'environ 1400 nm. (Bell et al., 2011).

Les histones sont de petites protéines basiques et globulaires de poids moléculaire inclus entre 11 et 22 kDa. Elles sont composées de 3 hélices alpha permettant leur dimérisation, tandis que l'ADN s'enroule autour des parties globulaires. Grâce à sa propriété basique, chaque nucléosome entre en contact de façon ionique sur l'ossature de phosphate de l'ADN sur une surface d'une trentaine de pb. Les histones comportent aussi une queue N-terminale non-structurée et libre, qui sort du nucléosome (Khorasanizadeh, 2004). Ces queues peuvent être modifiées de façon post-traductionnelle par plusieurs types de protéines.

1.2.1. Modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles des histones jouent un rôle majeur dans plusieurs mécanismes nucléaires, dont la régulation de la transcription. Elles peuvent agir sur les interactions entre les histones et l'ADN, modifiant ainsi la stabilité et l'accessibilité de la chromatine ou peuvent être un site de liaison de complexes protéiques. Ce sont des marqueurs épigénétiques, transitoires et ponctuels, qui peuvent dans certains cas être transmis aux travers des divisions cellulaires. Elles permettent le recrutement de protéines non histones associées à la chromatine qui vont interagir et modifier l'état de celle-ci. L'étendue de chaque marque épigénétique est variable. Elles peuvent varier de quelques nucléosomes à des loci entiers (Lacoste et Côté, 2003).

Les queues N-terminales peuvent être acétylées (lysines), biotinylées (lysines), citrullinées (arginines), méthylées (lysines, arginines), phosphorylées (sérines et thréonines), ribosylées (arginines et glutamates), sumoylées (lysines) ou encore ubiquitinées (lysines) (Turner, 2005 ; Latham et Dent 2007). Les sites des modifications soulignées sont schématisés sur la figure 1.4 A.

1.2.2. Le code des histones et le lien avec la transcription génique

Dans le début des années 2000, Strahl et Allis ont proposé que les modifications post-traductionnelles des histones forment un code qui peut être lu et ainsi, définir l'état de la chromatine. Plusieurs groupes se sont alors concentrés sur l'identification des mécanismes de modification des histones, et sur leurs interrelations. Le code des histones est très complexe, mais plusieurs marques sont maintenant connues et reliées à différentes actions sur la chromatine (voir la figure 1.4).

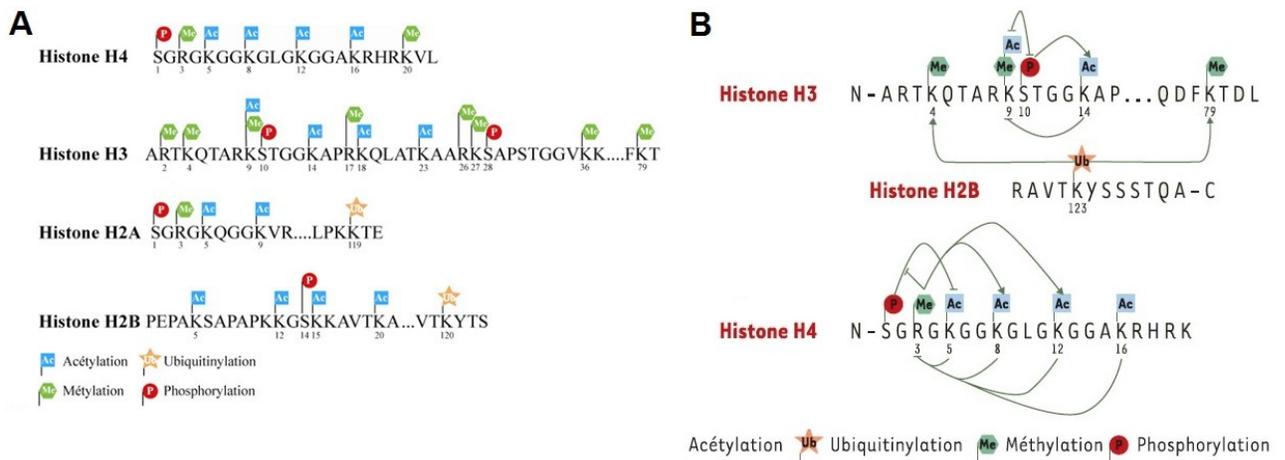


Figure 1.4 : Dispersion des modifications post-traductionnelles sur les queues N-terminales d'histones

En A, chaque histone dans les nucléosomes peut être modifiée par l'une ou l'autre des 4 modifications post-traductionnelles les plus connues, soit l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation. Les autres modifications étant moins courantes, elles ne sont pas montrées ici. En B, les marques épigénétiques ont un effet activateur ou inhibiteur sur une ou plusieurs autres marques. Elles peuvent être reliées à l'intérieur de la même histone, ou entre les histones (non-montré). La figure a été modifiée de Lacoste et Côté, 2003.

Par exemple, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) est reliée aux promoteurs actifs, tandis que la triméthylation de la lysine 36 de l'histone 3 (H3K36me3) est reliée au corps des gènes activement transcrits. (Martin et Zhang, 2005 ; Metzger et Schule, 2007). Les marques épigénétiques ont une influence sur l'apparition ou la disparition de certaines autres marques. Par exemple, l'ubiquitinylation de la lysine 123 de l'histone H2B (H2BK123ub) apparaît d'abord, et permet le recrutement d'histones méthyltransférases qui ajoutent les marques H3K4me3 et H3K36me3 durant l'activation du gène (figure 1.4 B).

Pour toutes les protéines interagissant directement ou indirectement avec l'ADN, il est possible de localiser leurs sites de liaison grâce à l'immunoprécipitation de chromatine. Cette technique consiste à lier de façon covalente les protéines de la chromatine entre elles et avec l'ADN. La chromatine est ensuite fragmentée et, avec l'aide d'anticorps spécifiques, l'échantillon est enrichi pour la protéine d'intérêt avec ses complexes et les fragments d'ADN associés. La cible de ces anticorps peut être une séquence spécifique dans la protéine d'intérêt, ou encore une modification post-traductionnelle sur une séquence spécifique. Finalement, en identifiant les fragments d'ADN récupérés, on peut ensuite déduire quelles étaient les positions liées par la protéine d'intérêt dans le génome.

1.3. Le foie, modèle *in vivo*

Les souris de laboratoire sont des organismes de plus en plus utilisés en génomique depuis que le génome de la lignée la plus commune, nommée C57BL/6, a été séquencé. Le foie est un organe important dans l'études des différents métabolismes, donnant aux souris de laboratoire un intérêt particulier depuis des décennies dans le cadre d'études *in vivo* (Higgins et al., 1931). Par exemple, il a été établi qu'à la

naissance des souriceaux, les hépatocytes (cellules du foie) sont majoritairement diploïdes, et que le degré de ploïdie augmente avec l'âge. Chez la souris adulte, le foie contient plus de 90% d'hépatocytes polyploïdes dont une grande quantité est aussi binucléée (Duncan et Soto-Gutierrez, 2013). Contrairement aux cellules en culture, les tissus contiennent plusieurs types cellulaires qui interagissent entre eux et qui permettent une régulation plus fine de tous les mécanismes biologiques inhérents à l'organisme. Parmi ces mécanismes, le cycle cellulaire est l'un des plus étudiés.

1.3.1. Physiologie sommaire structurelle du foie

Le foie est un tissu complexe composé de cellules endothéliales, de cellules des canaux biliaires, de cellules de Kupffer, de lymphocytes hépatocytaires, de cellules stellaires, et de cellules ovaies (progénitrices). Ces cellules composent environ 20% du foie. La majorité des cellules sont des hépatocytes. Chez la souris, le foie est constitué de 4 lobes ; du plus volumineux au plus petit : le lobe médian, le lobe latéral gauche, le lobe droit et le lobe caudé. Au niveau tissulaire, ils sont tous organisés sous forme de lobules hépatiques, de forme grossièrement hexagonale, et centrés par une veinule centrolobulaire. Les espaces portes sont situés aux angles de l'hexagone et comprennent entre autres les branches de la veine porte et de l'artère hépatique. Le sang circule à partir des espaces portes vers les veinules centrolobulaires. Il passe entre les hépatocytes par de larges canaux vasculaires très perméables, appelés capillaires sinusoides. Les espaces portes les plus volumineux comprennent aussi les canaux biliaires, qui transportent la bile du foie vers le duodénum (Wheater et al., 2001).

1.3.2. Le rôle majeur du foie dans l'organisme et son utilité dans l'étude des cycles nutritif et cellulaire

Le foie est un modèle largement utilisé à cause de son importance capitale. Il contribue à la digestion, grâce à la production de bile (protéines non-enzymatiques et sels biliaires) qui se déverse dans l'intestin grêle. Il participe activement au métabolisme en détruisant les globules rouges, en réglant la glycémie, en synthétisant l'urée pour évacuer les déchets azotés, en produisant le fibrinogène et d'autres protéines utilisées dans la coagulation sanguine, en stockant le glycogène et des vitamines, en synthétisant et dégradant des lipides et le cholestérol, en produisant des substances protectrices et anti oxydantes et en collaborant avec le système immunitaire pour combattre les cellules et substances nocives pour l'organisme (Arias et al., 2009). Il est aussi connu pour sa capacité exceptionnelle de régénération lors de dommages tissulaires (Higgins et al., 1931 ; Fausto et al., 2006).

Le cycle nutritif est très complexe à étudier étant donné la multitude de phénomènes métaboliques qui entrent en jeu. La méthode courante avec les cellules en culture est d'enlever le sérum du milieu, mais cela est bien différent d'une privation de nourriture à un organisme, puisque le rôle des hormones impliquées doit aussi être étudié (Kozak, 2012). Le cycle cellulaire peut être étudié à l'aide des dommages produits par des éléments chimiques, tel que le tétrachlorométhane, ou à l'aide de dommages physiques, tel que l'ablation partielle. Dans les deux cas, si le dommage n'est pas extrêmement sévère, les hépatocytes intacts vont entrer en prolifération afin de restaurer la masse complète initiale. Le cycle circadien peut quant à lui être étudié grâce à la génération de souris KO qui font varier soit la période, soit l'amplitude d'expression des gènes répondant au cycle. En effet, l'horloge circadienne peut être complètement désactivée en supprimant par exemple la protéine BMAL1, essentielle pour l'auto-entraînement de ce cycle.

Dans les pays industrialisés ou en voie de développement, on observe une augmentation de l'incidence des maladies du foie (Mouzaki et Allard, 2012). Ces maladies sont majoritairement reliées à la suralimentation et l'obésité. Les modèles visant à les étudier doivent nécessairement être des mammifères afin d'avoir une certaine relation avec l'humain. Cette problématique étant relativement nouvelle, de nouveaux modèles sont en train de voir le jour pour permettre l'étude des changements importants au niveau du foie durant le développement de ces maladies (Charlton et al., 2011). L'émergence de ces modèles permet de nouvelles études qui étaient auparavant peu réalisables dans des études de populations, dont le suivi de l'évolution de formes peu sévères d'une maladie hépatique jusqu'à une forme plus sévère. Il est donc maintenant plus aisé de relier certaines maladies génétiques du foie en une succession d'évolution de la même maladie ou non (Wouters et al., 2008).

1.3.3. La régénération hépatique

Chez les mammifères, la grande majorité des organes est dépourvue de la capacité de se régénérer suite à des dommages. Au sens propre du terme, la régénération d'un organe implique que la partie réséquée repousse à partir du site de coupure, tel la queue du lézard. Dans le cas spécifique de la régénération hépatique, il s'agit plutôt d'une hyperplasie compensatoire (processus, au cours duquel le nombre de cellules augmente de façon à réajuster la taille optimale de l'organe en fonction de l'organisme), qui ne restaure pas l'anatomie du foie. Les lobes aux sites de coupure forment chacun un moignon qui va dégénérer au cours de la régénération, et les cellules des autres lobes vont entrer en croissance. Chez l'humain, la fonction normale du foie est presque totalement restaurée en 2 à 3 semaines alors que la régénération complète de l'organe peut prendre de 3 à 6 mois (Court et al., 2002).

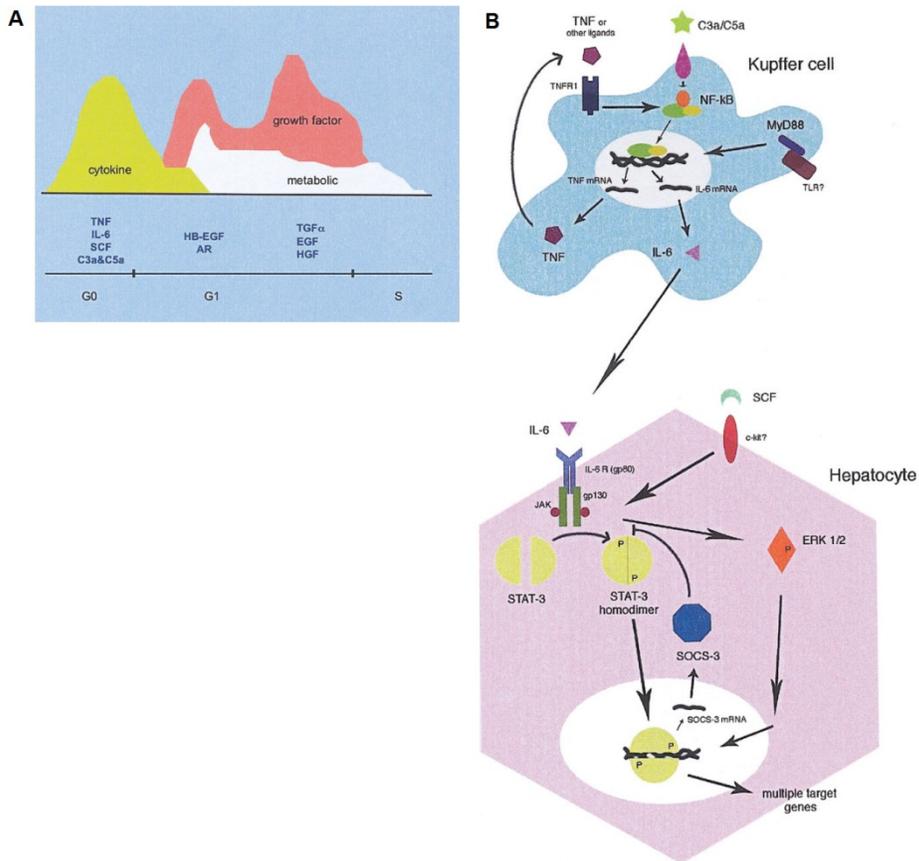


Figure 1.5 : Interrelation des cytokines, facteurs de croissance et métabolites lors de l'induction de la prolifération des hépatocytes

En A sont représentées les vagues d'activation transitoire des cytokines (en vert), facteurs de croissance (en rouge) et métabolites (en blanc) lors de l'initiation du cycle cellulaire. En B, l'interaction des cellules de Kupffer, par l'entremise des cytokines, avec les hépatocytes active le facteur de transcription STAT3. Ce facteur de transcription régule la transcription d'une grande variété de gènes, entre autre impliqués dans la croissance des cellules ou l'apoptose. La figure a été adaptée de Fauto et al., 2006.

L'élévation du niveau de $TNF\alpha$ (facteur de nécrose tumorale) et d'IL-6 pousse les hépatocytes à répondre aux hormones de croissance HGF (facteur de croissance hépatocytaire) et EGF (facteur de croissance épidermique, voir la figure 1.5 A) afin d'entrer dans le cycle de division cellulaire (Michalopoulos, 2010). Le modèle le plus courant pour étudier ce phénomène de régénération est l'hépatectomie partielle (2/3 HP) (Mitchell et Willenbring, 2008). Cette chirurgie consiste à retirer certains lobes du foie, idéalement 70%, pour aboutir à 4 vagues de divisions synchrones, elles-même liées au cycle circadien, qui restaurent la masse totale du foie en 5-7 jours chez les souris et 7-10 jours chez les rats (Court et al., 2002 ; Zou et al., 2012).

L'activation de plusieurs voies de signalisation est requise pour le bon déroulement de la régénération. Ce phénomène, très complexe, implique des voies interdépendantes dont certaines sont activées séquentiellement et d'autres simultanément (voir la figure 1.5 B). Elles peuvent se produire dans différents types cellulaires du tissu, et peuvent aussi n'être activées que pendant une étape particulière de la régénération (Fausto et al., 2006).

1.4. La prolifération cellulaire

Dans tous les organismes, les signaux extérieurs sont détectés et permettent la prolifération des cellules lorsque l'environnement est permissif. Dans le cas des mammifères, ces signaux sont des hormones et autres protéines signalisatrices qui permettent la communication entre les cellules et l'équilibre des tissus.

Les hépatocytes sont hautement différenciés et assurent la fonction métabolique du foie. Ils sont quiescents, et leur renouvellement normal est assuré par les cellules ovales et la division de certains hépatocytes (environ 1 division / 10 000 cellules). Cependant, en cas de dommage majeur, les hépatocytes ont la capacité de retourner à la phase proliférative et restaurer la masse du foie perdue.

Suite aux stimuli qui induisent la prolifération chez les hépatocytes, l'induction du cycle cellulaire prend un certain temps à se mettre en place. Plusieurs changements sont requis afin que les mécanismes soient en place pour assurer une progression correcte des divisions cellulaires (voir la figure 1.5). Afin de régénérer le foie, les cellules effectuent d'une à quatre rondes de réplication sur les 6 jours suivant une hépatectomie partielle (voir la figure 1.6). Le septième jour, 80% de la masse du foie est restaurée (Zou et al., 2012). Afin de détecter l'occurrence de la prolifération, plusieurs marqueurs peuvent être utilisés. Par exemple, les cyclines sont connues pour apparaître à des moments spécifiques du cycle cellulaire, afin de former des complexes avec des CDK spécifiques pour l'activation de certains points de contrôle du cycle cellulaire. De manière générale, la prolifération peut aussi être détectée grâce à la protéine Ki67, exprimée seulement lorsque les cellules prolifèrent, ou grâce à l'intégration de bromodéoxyuridine (BrdU), qui substitue la thymidine dans l'ADN.

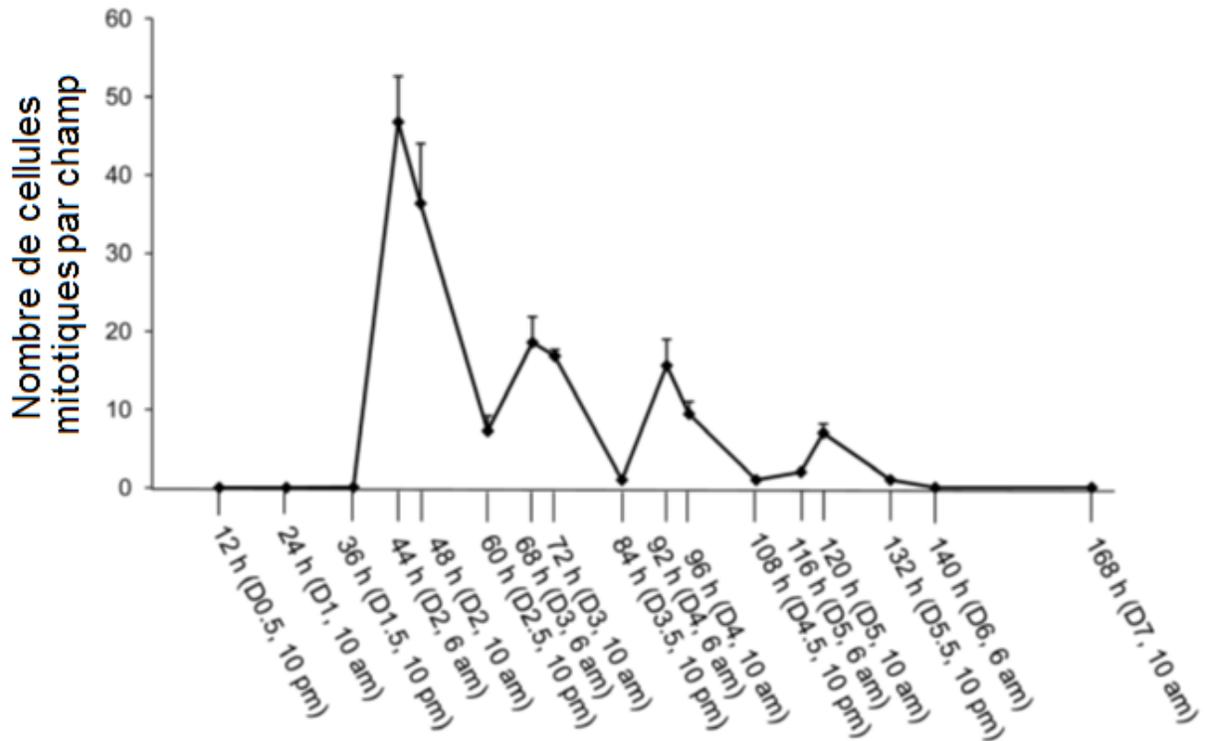


Figure 1.6 : Rondes de réplication des hépatocytes durant la régénération du foie induite par une hépatectomie partielle

Les résultats de Zou et al. (2012) démontrent que l'induction et la première ronde de réplication durent environ 2,5 jours, puis les rondes subséquentes ne durent que 24 heures.

1.4.1. Les différentes phases du cycle cellulaire

La transition de la phase G0 à la phase G1 est caractérisée par une profonde modification du profil d'expression génique (Iyer et al., 1999). Comparativement aux cellules qui terminent la mitose, la phase G1 est plus longue chez les cellules quiescentes qui entrent en prolifération. Elles répondent à une cascade hormonale afin d'adapter le métabolisme du foie et préparer la prolifération. Les cyclines font leur

apparition successivement, et ne correspondent pas toujours à ce qui est déjà connu avec les cultures primaires et les cellules HeLa dans la littérature (Nevzorova et al., 2009). Le cycle cellulaire est séparé en 4 phases distinctes (voir la figure 1.7) :

- la phase G1 est une phase de croissance cellulaire où la cellule accroît sa taille et se prépare à la duplication de son génome,
- La phase S, durant laquelle la duplication de l'ADN se produit,
- La phase G2, où la duplication de l'ADN et la croissance cellulaire sont finalisées. La cellule répare les dommages, puis se prépare à la division,
- la phase M correspond à la division cellulaire et la cytokinèse, générant deux cellules filles.
- La phase G0 correspond à un stade de quiescence. Celle-ci ne fait pas partie intégrante de cycle cellulaire puisque les cellules ne se divisent pas. Elle est souvent représentée comme un cercle indépendant qui commence depuis la phase G1 et retourne directement à son point de départ, ou une entrée et une sortie du cycle, tel que sur la figure 1.7.

À toutes ces étapes, on retrouve des points de contrôle qui peuvent arrêter la progression du cycle cellulaire en cas d'anomalie. Ceux-ci sont inactivés lorsque les anomalies détectées sont résolues, et autorisent la reprise du cycle. La régulation de ce cycle et des points de contrôle est très importante, puisqu'un dérèglement incontrôlé peut mener vers une prolifération anarchique, première étape vers l'apparition d'un cancer chez les mammifères.

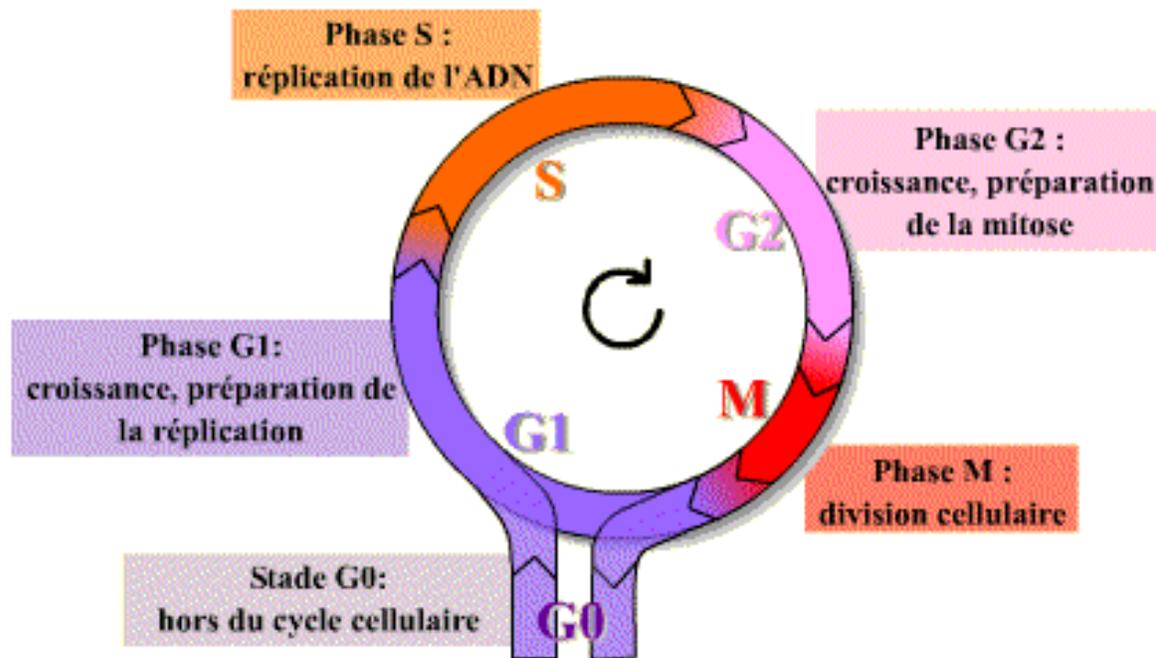


Figure 1.7 : Schéma du cycle cellulaire

Représentation cyclique des 4 phases prolifératives du cycle cellulaire, ainsi que l'entrée du cycle à partir de la phase G0 ou sa sortie vers la quiescence. Les phases sont généralement représentées en respectant leur durée approximative, la mitose étant la moins longue et la phase G1 étant la plus longue. Le début du cycle est par convention, le début de la phase G1.

1.4.2. L'importance du cycle circadien

Le cycle circadien est quant à lui plus difficile à étudier *in vitro*. Cependant, il a été démontré que les fibroblastes en culture continuent à faire fonctionner ce cycle de façon asynchrone, cellule par cellule (Welsh et al., 2004). Chez les mammifères, la lumière a un effet au niveau de l'horloge centrale dans le cerveau, permettant de

synchroniser toutes les horloges périphériques dans les cellules des différents tissus. Seul un modèle *in vivo* permet d'observer cette interaction, tandis que les cultures cellulaires nous renseignent seulement sur les mécanismes de l'horloge périphérique (Takahashi et al., 2001).

Le cycle circadien se définit comme une oscillation moléculaire durant une période de 24 heures, revenant aux mêmes étapes aux mêmes moments de la journée. Il dépend d'une horloge centrale et d'horloges périphériques. La première est un groupe de neurones situé au noyau supra-chiasmatique (NSC), dans la partie antérieure de l'hypothalamus. Des neurones spécifiques de l'oeil captent la lumière et la transmettent au NSC, qui à son tour, envoie différents signaux (hormones et neurotransmetteurs) qui permettent de synchroniser le corps avec son environnement au niveau circadien. Les horloges périphériques sont situées dans la majorité des cellules et tissus, et expriment un programme de 24 heures pour chacun d'entre eux. L'entraînement du cycle utilise des boucles de rétrocontrôle (voir la figure 1.8) transcrivant principalement des activateurs-clé du cycle circadien (par exemple : Bmal1, Clock), et des répresseurs (par exemple : Per, Cry). D'abord découvert chez la drosophile, il a été démontré que le modèle est robuste et a évolué de façon différente chez une grande majorité d'espèces des différents règnes. (Young et Kay, 2001). Plusieurs fonctions essentielles sont influencées par ce cycle, tels que le cycle de sommeil, la température corporelle, la pression du sang, la production d'hormone, l'activité immunitaire, le cycle cellulaire ainsi que les sécrétions digestives. Les fonctions normales du foie, telles que le métabolisme des lipides et des glucides, la biosynthèse des stérols ou la détoxification sont aussi compartimentées selon la période de la journée (Le Martelot et al., 2012).

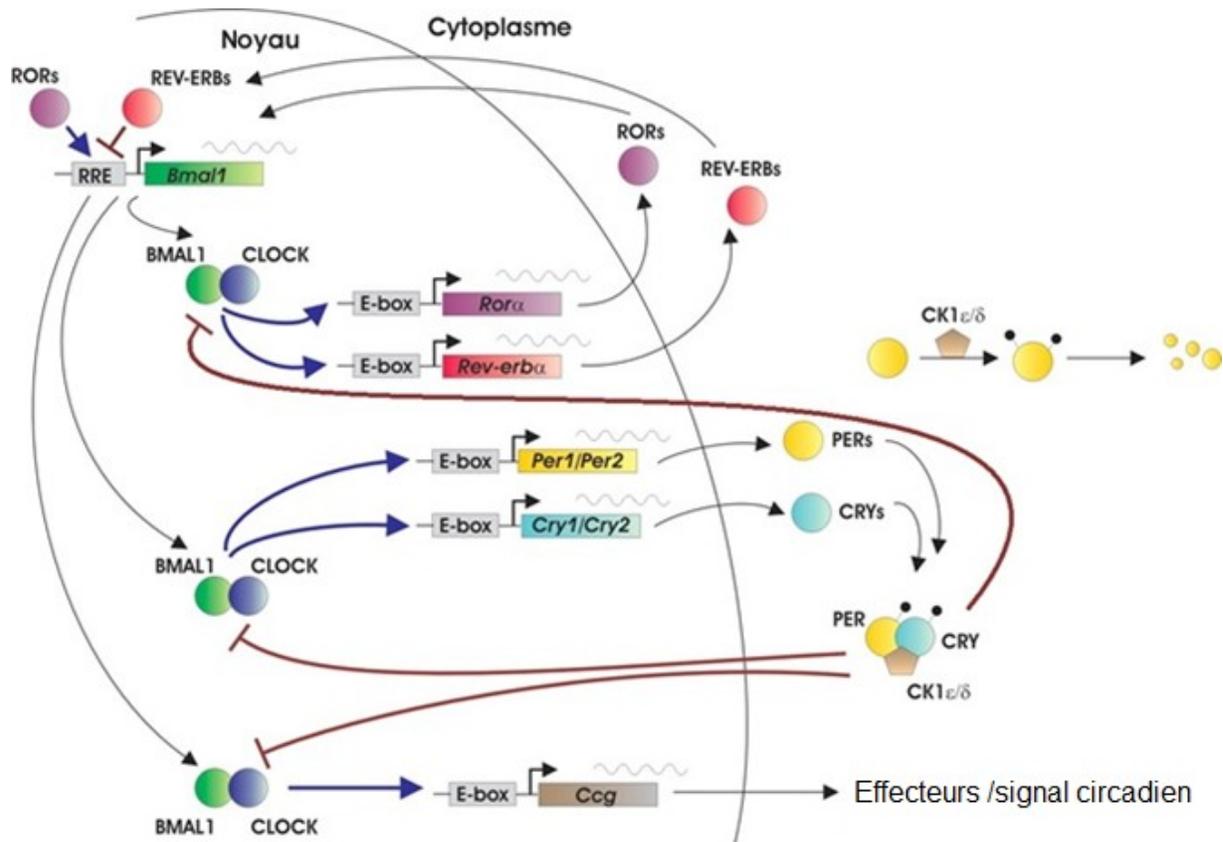


Figure 1.8 : Schéma du réseau de boucles de rétrocontrôle de l'horloge circadienne.

Dans la boucle de rétrocontrôle du haut, le complexe essentiel du cycle BMAL1/CLOCK régule sa propre transcription grâce à l'activation des récepteurs nucléaires REV-ERBs et RORs, qui peuvent lier le promoteur de BMAL1 (rétrocontrôles négatif et positif respectivement). Dans la boucle du bas, le complexe BMAL1/CLOCK active les répresseurs PERs et CRYs, qui s'accumulent, relocalisent au noyau et répriment l'action du complexe, donc la transcription même de BMAL1 (rétrocontrôle négatif). Ces événements moléculaires cyclent environ aux 24 heures, aidés par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'ubiquitinylation. Ces processus constituent la base de l'horloge moléculaire circadienne. (modifié de Ko et Takahashi, 2006)

Plusieurs interactions entre ces différents cycles sont déjà très bien connues. Par exemple, Nagoshi et al. (2004) démontrent *in vitro* que la division cellulaire (i.e. la mitose) lors de la régénération du foie ne s'effectue qu'à une période précise du cycle circadien. Matsuo et al. (2003) ont démontré le même principe *in vivo*, et ont identifié la protéine circadienne Wee1 comme une excellente candidate couplant ces deux cycles (voir la figure 1.9). Plusieurs stimuli sont capables de réinitialiser les horloges périphériques du corps, en fonction des facteurs extérieurs comme la disponibilité de nourriture, le niveau de glucocorticoïdes ou encore la température. Cependant, l'horloge centrale ne répond qu'à la présence ou l'absence de lumière. Dans le cas où les stimuli ne correspondent plus au cycle lumineux, les deux horloges sont découplées et entraînent donc un effet de décalage horaire (Huang et al., 2011). Plusieurs travaux sont en cours afin d'identifier les régulateurs clé fondamentaux qui sont aptes à relier ces deux différents cycles (projet CycliX, communication personnelle).

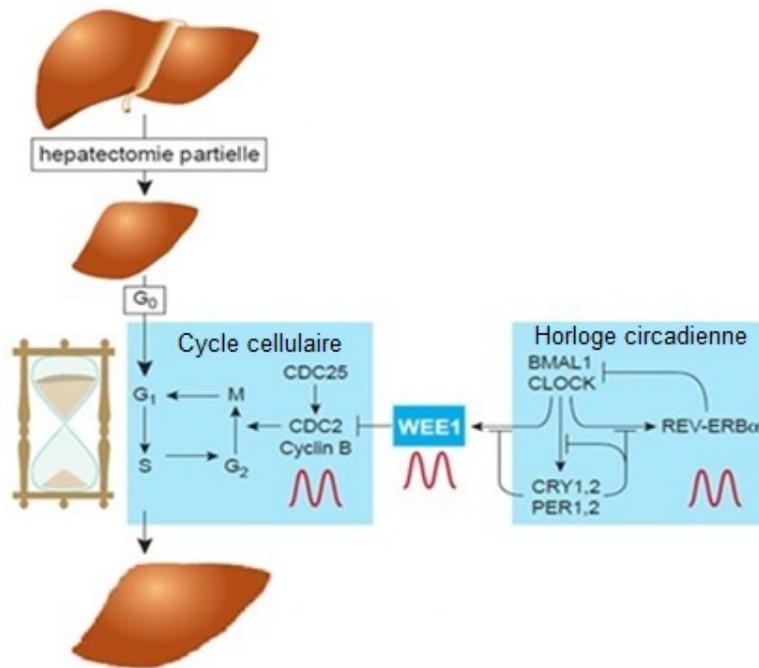


Figure 1.9 : Schéma de l'influence du cycle circadien sur le cycle cellulaire

L'expression de la protéine Wee1 est contrôlée directement par le complexe BMAL1/CLOCK, et son expression génique oscille de façon circadienne. Une de ses fonctions est de phosphoryler la kinase cycline-dépendente 1 (CDK1, anciennement CDC2), empêchant la translocation du complexe CDK1/cycline B au noyau, essentielle pour l'entrée en mitose. (figure modifiée de Schibler, 2003)

1.5. Étude du cycle cellulaire dans le foie

Dans le cadre du projet « CycliX : réseaux de régulation de la transcription de trois cycles interconnectés », nous nous sommes intéressés aux patrons de transcription durant le cycle cellulaire dans le foie de souris. Des études précédentes sur le cycle circadien (Canella et al., 2012 ; James Faresse et al., 2012 ; Le Martelot et al., 2012) nous ont guidé afin de générer des données consistantes sur notre projet.

1.5.1. Description du projet de recherche

Grâce aux nouvelles avancées de ces dernières années, le rapport entre les différents cycles biologiques commence à être déchiffré. Le dérèglement d'un de ces mécanismes dynamiques a beaucoup d'implication sur les autres cycles et peut mener à des maladies aux causes très larges telles que le cancer, l'obésité ou la cirrhose. Les modèles animaux sont très utiles dans le cadre de la recherche sur les systèmes biologiques, et le foie est un organe très intéressant à comprendre. Les recherches futures continueront à examiner les impacts d'un dérèglement d'un cycle sur le foie, et les conséquences sur le système entier, pour la santé de l'homme et la compréhension de ses maladies.

Les travaux effectués au cours de ma maîtrise ont permis d'obtenir les données nécessaires afin d'explorer les changements transcriptionnels durant la régénération hépatique chez la souris. Pour ce faire, nous avons généré des données pour 54 librairies d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) couplée au séquençage haut-débit (9 x H3K4me3, 9x H3K36me3, 9 x pol II, 9 x pol III, 9 x HCF-1 et 9 x ADN initial), dont l'analyse est débutée depuis peu sur 36 d'entre elles (soulignées). Ces données sont d'une très bonne qualité, consistante avec l'évolution des techniques depuis les études similaires sur le cycle circadien.

Afin d'avoir une vision globale de ce projet de recherche, voir l'annexe 1. Elle contient une affiche qui a présenté le projet lors du symposium international « Chromatin Changes in Differentiation and Malignancies », du 2 au 4 septembre 2013, à Egmond aan Zee, Pays-Bas.

1.5.2. But du projet de recherche

L'objectif de ce projet de recherche est de caractériser l'état génomique à plusieurs phases clés du cycle cellulaire, en considérant le cycle circadien et le cycle nutritif dans un modèle *in vivo*. Nous désirons établir un lien solide entre les phases du cycle cellulaire au cours de la première ronde de réplication et la période circadienne à laquelle chacune survient. Pour cela, nous voulons observer les changements génomiques qui se produisent lors de la réponse immédiate à la chirurgie, lors de l'entrée dans le cycle cellulaire et au courant de celui-ci. Finalement, nous souhaitons découvrir différentes classes de gènes ayant des réponses similaires, afin d'identifier de nouveaux liens épistatiques dans ce modèle. Grâce aux nouvelles technologies de séquençage et aux avancées de la bio-informatique, nous espérons atteindre une précision jusqu'à présent inégalée dans ce type d'analyse. Les objectifs précis de mon projet sont les suivants :

1. Déterminer les temps postopératoires à analyser, afin de couvrir la totalité du cycle cellulaire.
2. Établir une procédure reproductible de ChIP-seq adaptée pour une quantité de tissu limitée.
3. Étudier le profil d'occupation génomique de la polymérase II et de la polymérase III à travers le cycle cellulaire dans un modèle *in vivo*.
4. Étudier des modifications de l'histone 3 à travers le cycle cellulaire : H3K4Me3 et H3K36Me3.
5. Étudier le patron de liaison à l'ADN de la protéine d'intérêt principal du laboratoire, HCF-1, à travers le cycle cellulaire dans un modèle *in vivo*.
6. Intégrer et comparer les résultats à ceux des cycles circadien et nutritif pour comprendre comment le cycle cellulaire se synchronise avec ceux-ci.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Animaux utilisés

Les animaux ont été maintenus sous l'autorité de l'animalerie du centre intégratif de génomique (CIG) à l'Université de Lausanne (UNIL), et sous la licence 2546.0 délivrée par les affaires vétérinaires du Service de la consommation et des affaires vétérinaires du canton de Vaud. Cette autorisation est valable pour des expériences d'ablation partielle du foie pour 144 souris au total. 60 d'entre-elles ont été utilisées dans le cadre de nos expériences. Les souris proviennent toutes du « Charles River Laboratories France ». Les conditions de détention sont restées stable tout au long des expériences : température entre 21°C et 23°C, cycle de lumière de 12 heures et eau *ad libitum*. Les souris sont référencées par groupe, chronologiquement selon les expériences auxquelles elles ont été destinées. Ce sont toutes des mâles C57BL/6J âgés entre 10 et 14 semaines.

- Une série de 5 souris pour 5 points dans le temps différents. Celles-ci ont servi aux premières analyses d'immunobuvardage de type western (WB). Les souris ont été sacrifiées selon les points dans le temps suivants : 0H, 10H, 36H, 44H, 48H.
- Une série de 7 souris a servi à une étude plus extensive par WB, coloration de tissus et immunofluorescence (IF). Elles pourront aussi être ultérieurement analysées pour l'ARN grâce au nCounter de Nanostring. Les souris ont été

sacrifiées selon les points dans le temps suivants : 0H, 10H, 20H, 36H, 44H, 48H et 60H.

- 27 souris en 9 groupes de 3 souris par points dans le temps destinées à une analyse par ChIP-seq. Cette série diffère des deux précédentes sur un point majeur. Les précédentes ont toujours reçu de la nourriture *ad libitum* tandis que ce groupe de 27 souris n'a reçu de la nourriture que durant le cycle d'obscurité de 12 heures, une semaine avant la chirurgie jusqu'au sacrifice. Nous pourrions donc évaluer l'impact de la restriction nutritionnelle sur la régénération hépatique. Les souris ont été sacrifiées selon les points dans le temps suivants : 0H, 1H, 10H, 20H, 28H, 36H, 44H, 48H, et 60H
- Finalement, 19 souris sous le même cycle de 12 heures de nourriture que le troisième groupe, ont été sacrifiées pour une analyse ARN (Ncounter de Nanostring et/ou puce d'expression génique) à mettre en relation avec l'analyse par ChIP-seq. Une des deux sections du lobe droit est consacrée à une analyse morphologique, d'IF et de WB. Les souris ont été sacrifiées selon les points dans le temps suivants : 0H, 1H, 10H, 20H, 24H, 28H, 36H, 44H, 48H, 60H, 72H, 96H et 1 semaine.

Les sacrifices ont été effectués grâce à une anesthésie profonde à 5% d'isoflurane suivi par une dislocation cervicale. Une perfusion par la rate avec du PBS a permis de retirer la majorité du sang au foie. Celui-ci a ensuite rapidement été collecté, puis nettoyé pour être destiné aux expériences. Dans certains cas, notamment pour les foies destinés à l'IF, une perfusion par le cœur a été d'abord utilisée, puis la perfusion par la rate et l'excision du foie.

2.2. Hépatectomie partielle

La chirurgie a toujours été effectuée sous anesthésie générale durant les heures matinales, entre 8 :30 et 9 :30. Chaque souris a reçu une dose de 0,1 mg / kg de buprénorphine deux heures avant l'opérateur, puis jusqu'au sacrifice ou 3 jours post-opérateur, dans le but d'éviter les douleurs aux animaux. L'induction de l'anesthésie a été faite à 5% d'isoflurane dans une chambre d'induction, puis a été maintenue avec 1,5% d'isoflurane distribué dans un masque, toujours sur un flux d'oxygène de 0,8 litre par minute. Durant toute la durée de l'opération, d'environ 20 minutes, chaque souris est restée sur un tapis chauffant réglé à 38,0°C (38,4°C mesuré).

La procédure de chirurgie est adaptée de celle détaillée par Mitchell et Willenbring, 2008, pour le matériel de notre laboratoire. Les étapes et la procédure sont donc les mêmes. Grâce à une ligature, il a été possible d'isoler de lobe latéral gauche puis le lobe médian, tel que sur la figure 2.1. Il faut commencer par le lobe latéral gauche, qui se trouve normalement à l'arrière de l'organe, sous le lobe médian. Après la ligature et l'excision, la plus grosse partie du foie est retirée. La seconde ligature se doit d'être dans la zone hachurée (voir la figure 2.1 B). Si elle est plus près de la veine cave inférieure sus-hépatique, cela augmente le risque de nécrose du foie entier en limitant le flux du sang. Si elle est trop près de la vésicule biliaire, cela augmente le risque de complications post-chirurgicales, notamment une fistule biliaire. Le lobe médian est le plus volumineux, mais ces restrictions empêchent de le retirer en totalité. La moitié du lobe est retiré, tandis que l'autre moitié, ligaturée, est vouée à dégénérer à l'intérieur de l'animal. Lorsque l'ablation est terminée, le péritoine est alors suturé et la peau est refermée à l'aide de petites agrafes de 12 millimètres. Toutes les souris ont reçu 500 µL de solution saline (NaCl 0,9%) et de la Bétadine (antiseptique de plaies superficielles) a été appliquée sur les plaies. Finalement, les souris ont été remises individuellement dans une nouvelle cage, sous une lampe chauffante durant 20 minutes.

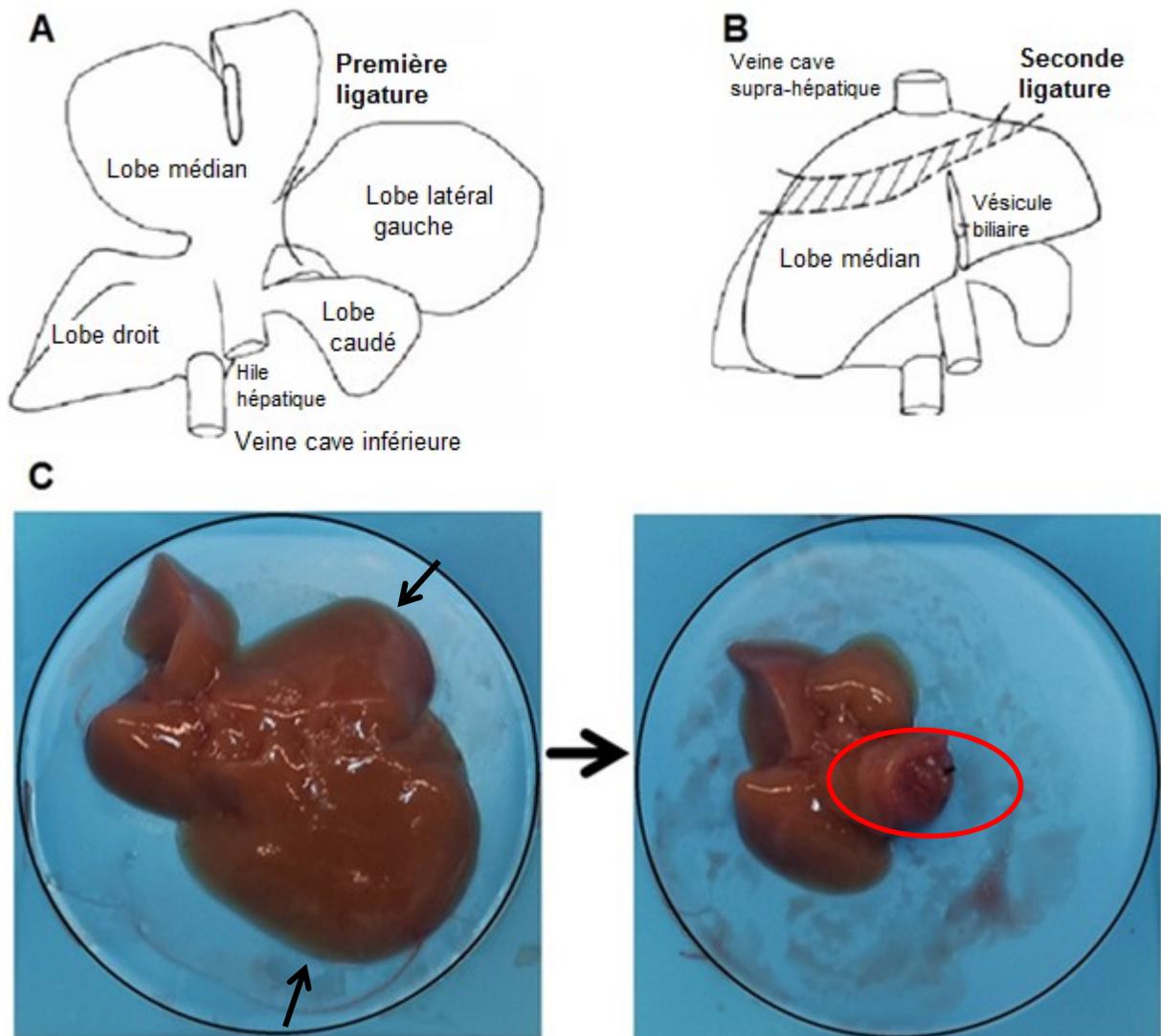


Figure 2.1 : Schéma du foie et du placement des ligatures en vue d'une 2/3 HP.

En A, le placement de la première ligature à la base du lobe latéral gauche. En B, le placement de la seconde ligature sur le lobe médian. En C, vue à l'échelle d'un foie entier et d'un foie après chirurgie. On note la disparition du lobe latéral gauche (flèche du haut), laissant apparaître le lobe caudé, et du lobe médian (flèche du bas) qui laisse un moignon et une place inoccupée. Le moignon (encerclé en rouge) est voué à dégénérer, et a été retiré lors de l'excision du foie pour les expériences. (A et B : modifié de Mitchell et Willenbring, 2008)

2.3. Immunobuvardage de type western

L'isolation de l'extrait cellulaire total a été effectuée à l'aide d'une lyse mécanique dans le tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,25% acide déoxycholique, 1% NP40, 1mM EDTA, proteinase inhibitor tablet© de Roche et 1 mM PMSF). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines d'intérêt ont été révélées à l'aide d'un anticorps primaire spécifique et un anticorps secondaire couplé à une sonde fluorescente tel qu'indiqué dans le tableau 2.1. La lecture des membranes a été effectuée avec le système ODYSSEY de Li-Cor.

Tableau 2.1 : Anticorps utilisés pour les expériences de WB, d'IF et de ChIP.

Cible	Compagnie	Anticorps	expérience
Anticorps primaires			
Cdk1_Tyr15 phosphorylé	Abcam	ab133463	WB, IF
Cyclin A	Abcam	ab2097	WB, IF
Cyclin B1	Abcam, Santa Cruz biotechnology	ab2949, sc-245	WB
Cyclin D1	Abcam	ab40754	WB
Cyclin E	Abcam	ab7959	WB
H3K36me3	Abcam	ab9050	ChIP
H3K4Me3	Abcam	ab8580	ChIP
H3S10 phosphorylé	Abcam	ab5176	WB, IF
HCF-1	Laboratoire Herr	(H-12)	WB, ChIP
Ki-67	Abcam	ab15580	WB, IF

POLR2B (H-201)	Santa Cruz biotechnology	sc-67318	ChIP
RPC4	Laboratoire Hernandez	CS682#6	ChIP
Wee1	abcam	ab2315	WB
β -actin	Sigma	A5441	WB
Anticorps secondaire			
Chèvre anti-lapin couplé à Alexa Fluor 680	Life technologies	A21076	WB, IF
Chèvre anti-lapin couplé à IRDye 800	Rockland	611-132-122	WB
Chèvre anti-souris couplé à Alexa Fluor 680	Life technologies	A21078	WB
Chèvre anti-souris couplé à IRDye 800	Rockland	610-132-121	WB

2.4. Coupe histologique

Suite à la collecte et au nettoyage des foies, ceux-ci ont été fixés par immersion dans du paraformaldéhyde 4% à 4°C durant 8 à 10 heures. Ils ont été transférés dans un préparateur de tissus Leica TP1020 (Leica Biosystems) qui déshydrate et enrobe les tissus grâce à des immersions successives dans différents bains d'alcool (EtOH), de Xylol et de paraffine, pour une durée de 15 heures. Ils ont ensuite passé sur une station de paraffinage pour être inclus dans un bloc de paraffine. Les tissus ont été coupés en section de 4 μ m au microtome (Microm International), et ont été déposés sur une lame. Pour une observation directe, la lame peut être directement protégée par une lamelle. Sinon, elle doit subir une coloration ou une IF pour différentes observations.

2.5. Coloration hématoxyline et éosine (H&E) sur coupe histologique

Les sections ont d'abord été débarrassées de la paraffine et réhydratées en vue de la coloration. Sur un support à lame, les lames contenant les sections ont été immergées dans différents bains de xylène, d'alcool éthylique et d'eau distillée (100% xylol, 100% EtOH, 95%, 80% et 70% EtOH, H₂O), avec agitation délicate durant une minute. Ensuite, les sections ont été colorées par immersion des lames d'abord dans l'hématoxyline de Mayer durant 5 minutes. Les lames ont été nettoyées à l'eau courante, puis la couleur est différenciée à l'alcool acide. Une fois que le bon contraste a été obtenu, celui-ci dépend de l'âge de l'animal duquel le tissu est prélevé et de l'épaisseur de la coupe, les lames ont été plongées dans de l'éosine alcool 0,25% durant 30 secondes. Les sections ont été déshydratées une dernière fois par immersion dans des bains successifs, dans l'ordre inverse de la réhydratation. Les lames ont été couvertes d'une lamelle de protection grâce à une machine de montage Tissue-Tek SCA (Sakura).

2.6. Immunofluorescence sur coupe histologique (IF)

Les sections ont d'abord été débarrassées de la paraffine et réhydratées en vue de la coloration. Sur un support à lame, les lames contenant les sections ont été immergées dans différents bains de xylène, d'alcool éthylique et d'eau distillée (100% xylol, 100% EtOH, 95%, 80% et 70% EtOH, H₂O) avec agitation délicate durant une minute. Les lames ont ensuite été lavées par trempage dans du PBS et dans un tampon citrate (10 mM acide citrique, ajusté à pH=6 avec du HCl). Afin de récupérer les épitopes des antigènes, elles ont été chauffées dans un bain-marie, au micro-onde et en présence du tampon citrate, puis refroidies au réfrigérateur. La section a été bloquée avec 1% de sérum de chèvre (NGS) pendant une demi-heure, puis incubée de 1 heure à toute la nuit (O/N à 4°C) avec un anticorps primaire dans 1% NGS (voir tableau 2.1). Les sections ont été lavées au PBS, NGS 1%, puis incubées

30 minutes avec un anticorps secondaire dans du NGS 1%. Elles ont ensuite été lavées au PBS, colorées au DAPI, relavées au PBS, puis scellées par une couche de milieu de montage MOWIOL (10,4% polyvinyl-alcool-4-88, 21,7% glycérol, 104 mM Tris pH=8 et 0,0001% DABCO) sous une lamelle. Les photos ont été prises sur un microscope automatisé à fluorescente Axio Imager M1 (Zeiss).

2.7. Immunoprécipitation de chromatine

Le foie a été homogénéisé et ponté durant 1 minute dans du PBS / 1% formaldéhyde à l'aide d'un piston rotatif et laissé incubé 9 minutes supplémentaires à température ambiante. La réaction de pontage a été arrêtée par ajout de 25 ml de solution 2.2M Sucrose contenant 150 mM de glycine (pour plus de détail sur le protocole et les solutions, voir le protocole complet et détaillé « ChIP using mouse liver » en annexe 2). Les noyaux ont été séparés sur un coussin de sucrose par centrifugation pendant 1 heure à 100 000 x g à 4°C. Les noyaux ont été récupérés, nettoyés dans du tampon A froid, puis congelé dans le tampon de congélation dans de l'azote liquide. Ils ont été placés à -80°C. Chaque échantillon contient alors les noyaux d'un foie de souris. Lorsque tous les échantillons ont été réunis, ils ont été décongelés, nettoyés dans le tampon A, puis rassemblés en fonction des points dans le temps de l'expérience (3 échantillons par point, 2 échantillons pour le point 48H). Les noyaux ont été incubés durant 10 minutes sur glace dans le tampon de lyse nucléaire, puis soniqués dans un mélange de tampon de lyse nucléaire et tampon de dilution d'immunoprécipitation. La sonication a été faite durant 6 minutes à l'aide d'une sonde, à raison de 12 impulsions de 10 secondes à 50% d'amplitude, avec 20 secondes de repos entre chaque impulsion, le tout constamment sur glace. La chromatine a été diluée avec du tampon de dilution d'immunoprécipitation, puis incubée sur roue rotative durant une heure à 4°C avec du sérum pré-immun de lapin.

Elle a ensuite été incubée 3 heures de la même manière avec ajout de 200 μ l de solution contenant 50% de billes d'agarose couplé à la protéine A. Les billes ont ensuite été retirées. Pour l'immunoprécipitation, 3 μ g de chromatine humaine contrôle (cellule HeLa) a été ajoutée à 57 μ g de chromatine de foie de souris (5% du total) dans un volume total de 1,2 ml. L'anticorps d'immunoprécipitation (voir tableau 3.1) a été ajouté et le tout a été incubé sur roue rotative à 4°C durant toute la nuit. Pour l'échantillon d'ADN initial, 3 μ g de chromatine a été prélevé des échantillons H3K36me3 suite à l'ajout d'anticorps, et ont été congelés à -20°C.

Le lendemain, les tubes d'immunoprécipitation ont été centrifugés à 13 000 rpm puis transférés dans un nouveau tube afin de retirer d'éventuels résidus précipités. 40 μ l de solution de billes d'agarose couplées à la protéine A ont été ajoutés à chaque échantillon, puis ceux-ci ont été incubés de 3 à 4 heures à 4°C sur une roue rotative. Les billes ont ensuite été lavées à l'aide de différents tampons de lavage, puis éluées deux fois avec un tampon d'éluion contenant 1% de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 37°C pendant 5 minutes sur une plaque rotative adaptée (1000 rotations / minutes). Les complexes récupérés ont été incubés à 65°C pendant 6 heures en présence de 300 mM de NaCl et de RNase A. L'ADN initial a été décongelé à ce moment, le volume a été ajusté aux volumes d'échantillons avec le tampon d'éluion, et il a subi les mêmes traitements que les échantillons H3K36me3. Suite à cette incubation, la protéinase K a été ajoutée aux échantillons, qui ont été incubés à 45°C toute la nuit. Le lendemain, les échantillons ont été purifiés sur colonne selon les directives du fournisseur (Macherey-Nagel), puis l'ADN a été dosée à l'aide du système Qubit de la compagnie Life Technologies.

2.8. Préparation de bibliothèques de séquençage haut-débit

La préparation des librairies de séquençage haut-débit a été effectuée avec le kit « MicroPlex Library Preparation », de Diagenode, selon les directives du fournisseur. Toutes les librairies ont été effectuées à partir de 5 à 10 nanogrammes d'ADN de ChIP ou d'ADN initial, et ont été soumises à 14 cycles (15 cycles dans le cas des ChIPs avec un anticorps dirigé contre RPB2) de réaction en chaîne par polymérase (PCR). Enfin, les librairies ont été purifiées avec la solution de billes « AMPure XP beads » (Beckman Coulter), sans sélection de tailles des fragments. Les concentrations finales des librairies variaient entre 52 ng / μ g et 96 ng / μ g. Les librairies ont été prises en charge par la plateforme de technologies génomiques (GTF) et ont été dosées pour leur contenu en ADN avec un Qubit (Life Technologies). La longueur des fragments générés a été vérifiée avec un « Fragment Analyzer Automated CE system » (Advanced Analytical), puis 100 nucléotides (nt) à chaque extrémité ont été séquencés par un HiSeq 2500 (Illumina).

2.9. Analyses bio-informatiques

Avant de libérer les séquences brutes, le GTF trie les séquences de l'échantillon par rapport aux séquences de contrôle du séquençage (génomme du phage phiX174) et enlève les nucléotides correspondant aux adaptateurs. Il attribue ensuite une note aux séquences en fonction de la qualité de séquençage de chaque base.

Les séquences brutes ont été alignées en paires sur le génome murin mm9 et sur le génome humain hg19 à l'aide de l'outil de cartographie ELAND, fourni par Illumina avec le séquenceur. Les séquences ayant une bonne qualité d'alignement, qui pouvaient être alignées de façon unique sur le génome murin ou sur les deux génomes, et dont la distance entre une paire (longueur de l'insert) était comprise entre 50 nt et 1000 nt ont été conservées séparément de celles qui ne pouvaient être

alignées que sur le génome humain pour la suite des analyses. Les séquences n'ayant pas une bonne qualité ou une longueur plus petite que 50 nt ou plus longue que 1000 nt ont été écartées. Parmi les séquences conservées pour l'analyse, chaque séquence redondante n'a été conservée qu'une seule fois. Ce triage est montré en annexe 3. Les lectures ont été quantifiées pour les échantillons pol II, H3K4me3 et H3K36me3. Pour chacun des échantillons, les quantifications ont été faites à ± 1000 pb de part et d'autre des TSS des transcrits sûrs pour la pol II et H3K4me3. La quantification pour H3K36me3 a été effectuée sur les 40% de la fin des transcrits sûrs. Les transcrits sûrs ont été définis dans le cadre du projet CycliX, et correspondent à des gènes dont le promoteur est à 1500 pb d'autres promoteurs non-associés au transcrit, à partir de l'annotation Ensembl60 NCBI37. Il s'agit donc d'un ensemble de 22 463 transcrits. Pour l'ADN initial, toutes ces régions ont été quantifiées.

Les gènes ayant une quantification aberrante, toujours nulle, ou sous le 3^{ème} quartile de l'ADN initial normalisé ont été retirés de l'analyse. Après ce filtrage, 18 847 transcrits étaient toujours pris en compte. Les échantillons ont été normalisés par rapport à l'ADN initial, en effectuant une transformation mathématique impliquant les deux sujets. Il s'agit de faire le logarithme en base 2 du quotient de la quantification des échantillons sur la quantification de l'ADN initial. Les données ont ensuite été corrigées pour les erreurs techniques grâce à l'ADN humain qui a été rajouté dans tous les échantillons. La variation dans cet ADN ne peut provenir que de la partie technique, puisqu'il n'y a aucune variation biologique dans cette partie de la chromatine de départ. Les quantifications pour l'ADN humain ont été normalisées sur le nombre total de lectures et les moyennes ont été corrigées pour être similaire. Les quantifications pour l'ADN de souris ont été corrigées en conséquence. Les données ont été finalement normalisées par quantile.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1. Validation de la régénération du foie dans notre système

La première étape afin de suivre la régénération des foies de souris a été de valider que ce phénomène se produisait bel et bien en fonction de notre procédure. Nous avons donc suivi le poids des foies ainsi que celui des souris. Les poids des souris ont été pris avant et après la chirurgie, ainsi qu'avant le sacrifice. Ceux-ci ont diminué suite à la chirurgie, jusqu'à un maximum de 12% dans certains cas, principalement lorsque la restriction nutritionnelle était en place. Les poids des foies après la chirurgie ont été mesurés sans la partie restante des lobes ligaturés, voués à la dégénérescence.

Sur la figure 3.1, on peut remarquer deux phases de croissance. La première, entre 1 heure et 28 heures après la chirurgie, période durant laquelle les hépatocytes entrent en prolifération. La seconde se déroule après 48 heures, lorsque les cellules terminent leur première ronde de réplication. Ces données ne sont valables que dans le cas où la nourriture est distribuée *ad libitum*. Lorsqu'une restriction alimentaire est imposée, les souris ont tendance à perdre et regagner environ 10% de masse en fonction de ce cycle nutritionnel. Dans ce cas, l'effet du poids de la souris sur la courbe masque l'effet de la régénération, et suit la nutrition en fonction du jour et de la nuit (données non-montrées).

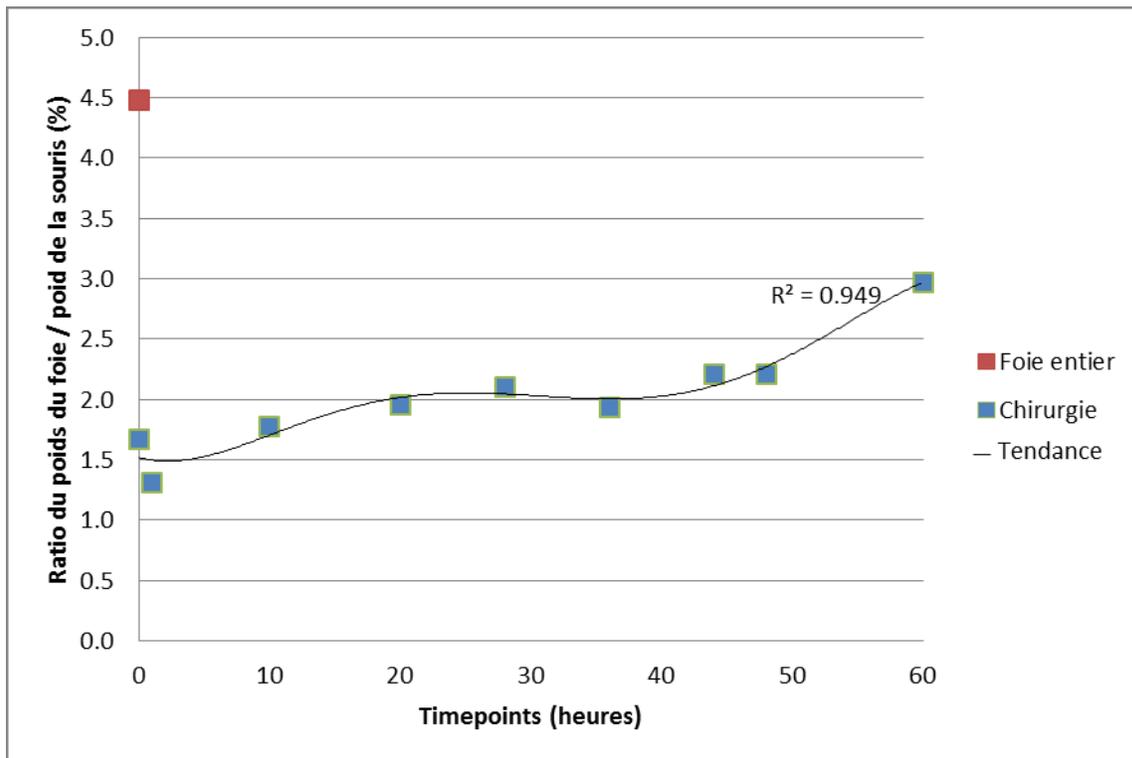


Figure 3.1 : Graphique de l'évolution du rapport du poids des foies sur le poids des souris.

En rouge, un foie entier sain n'ayant subi aucune ablation donne une indication sur la proportion normale entre le poids du foie et le poids d'une souris. En bleu, différentes souris ayant subi une hépatectomie partielle. Dans chaque ratio, le poids de chacune des souris correspond à celui lors du sacrifice.

Nous avons aussi observé qualitativement que le foie semble plus volumineux dans les points dans le temps tardifs que immédiatement suite à la chirurgie. Il est plus difficile dans ce cas d'avoir des données quantitatives, mais la figure 3.2 illustre ces observations.



Figure 3.2: Evolution visuelle de la régénération du foie

Dans l'ordre, nous avons les 6 différents points 0H, 24H, 36H, 48H, 72H et 1 semaine. Visuellement, les foies situés à droite de l'image semblent plus volumineux que les premiers sur la gauche. La coloration variable de chacun des foies n'a pas de lien avec la régénération, mais est reliée à la qualité de la perfusion avant l'excision de l'organe.

Nous avons aussi observé les cellules à l'intérieur du foie grâce à des coupes histologiques. Une observation directe des sections est utile afin de valider la qualité de l'échantillon et de la coupe, mais les photos sur une section sans coloration ne sont pas de bonne qualité (données non-montrées). Lorsque les sections ont subi une coloration H&E, il est possible de prendre des photos représentatives de l'observation (voir la figure 3.3). Dans la section 10H, des indices laissent supposer que quelques régions répondent à l'inflammation, mais aucune coloration spécifique n'a été réalisée. Dans la section 48H, il a été possible d'observer plusieurs cellules activement en mitose. Certaines cellules semblent aussi avoir récemment terminé la mitose, tandis que d'autres semblent proche de la commencer. Les points tardifs 44H, 48H et 60H montrent aussi une accumulation de vésicules lipidiques (non-montré pour les points 44H et 60H).

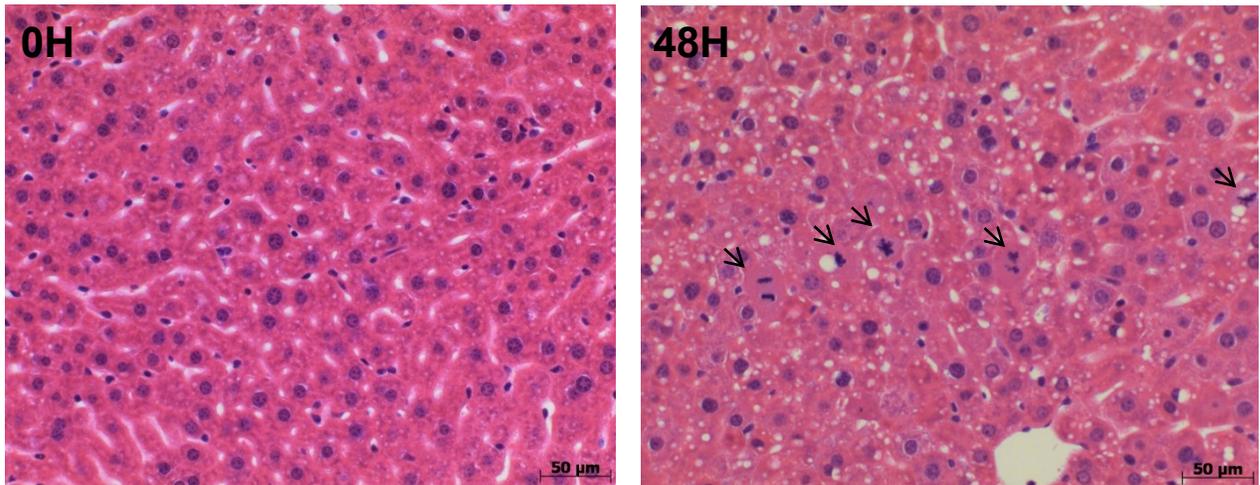


Figure 3.3 : Coloration H&E de sections de foie sans hépatectomie partielle et 48 heures après

La coloration H&E teint les noyaux des cellules en violet foncé, et le cytoplasme en rose. Les parties restées blanches peuvent être dues à des interstices, à des canaux biliaires, à des veines ou encore à des vésicules lipidiques. Contrairement à la section 0H, il est possible d'observer des cellules en division (indiquées par des flèches) dans la section 48H. Grossissement : 200X.

3.2. Définition des temps post-opératoires

Dans le but de suivre la régénération hépatique à travers la première ronde de réplication des cellules, il a fallu déterminer des points précis dans le temps après la chirurgie permettant de couvrir chacune des phases du cycle de division cellulaire. Pour ce faire, nous avons d'abord regardé la présence protéique de certaines cyclines les plus référencées dans la littérature, dont plusieurs exemples sont montrés dans la figure 3.4.

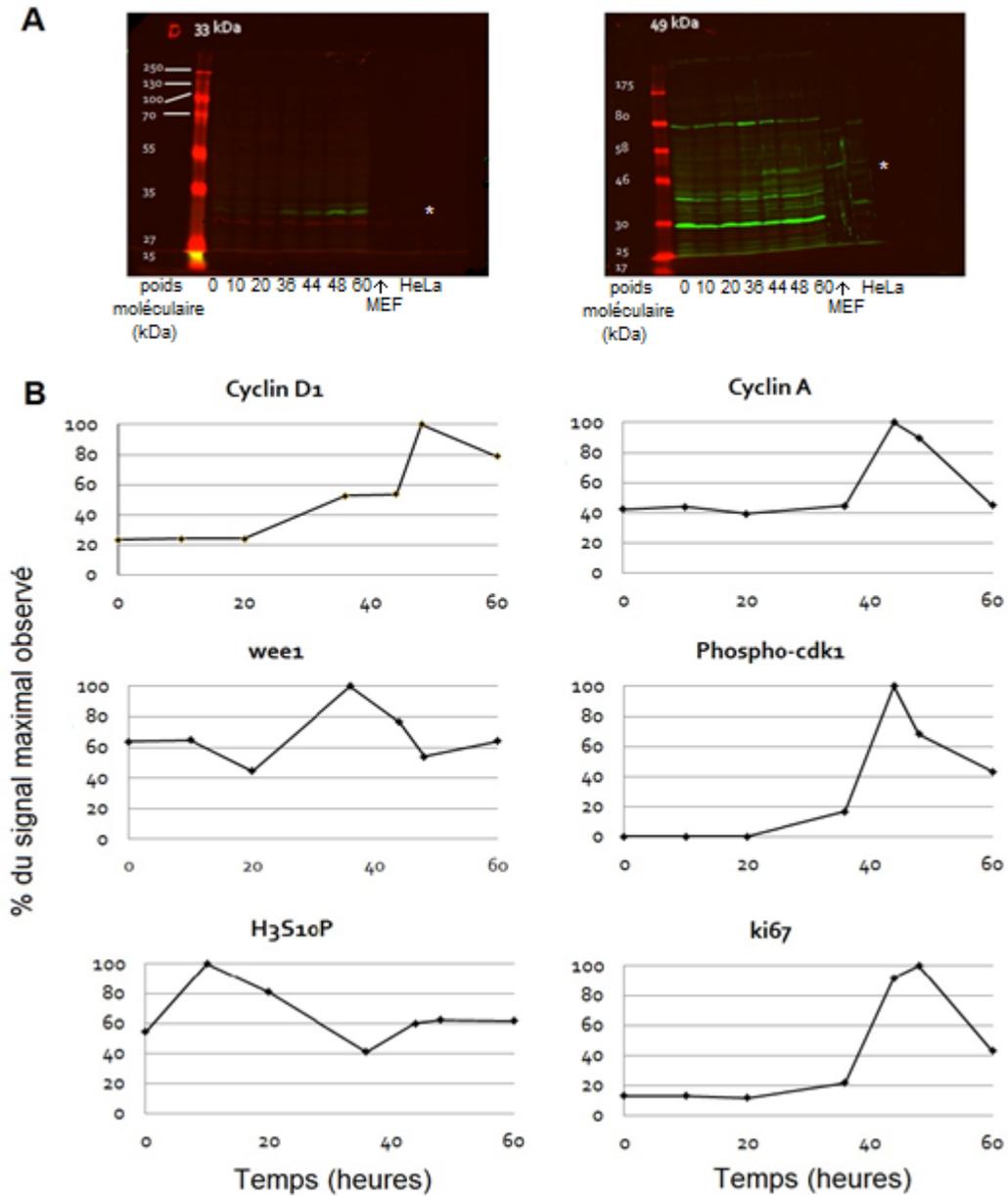


Figure 3.4 : Visualisation de plusieurs protéines par WB

En A, deux membranes types (cycline D1 à gauche et cycline A à droite) qui permettent de visualiser la présence protéique d'une cible d'intérêt par WB. Les bandes spécifiques sont identifiées par une étoile blanche. En B, représentation graphique du signal obtenu sur les membranes correspondantes. La cycline D semble apparaître tardivement (36H), mais peu avant la cycline A (44H). La protéine

Wee1 est à son maximum dans le point dans le temps qui précède le pic de la phosphorylation de CDK1 (48H). La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone 3 (H3S10P) augmente rapidement après la chirurgie, redescend puis revient à une phase plateau entre 44H et 60H. Ki67 apparaît rapidement dans les points de 44H et 48H puis diminue à 60H. D'autres protéines ont été ciblées, par exemple la cycline B et la cycline E, mais les anticorps utilisés ne nous ont pas permis d'identifier avec exactitude la protéine d'intérêt parmi un patron de bandes trop abondantes, et dont aucune ne semble correspondre au poids moléculaire de la cycline d'intérêt (données non-montrées). En ce qui concerne HCF-1, les bandes identifiées ne correspondaient pas au profil attendu, suggérant des réactions croisées de l'anticorps. Une extraction de protéines nucléaires aurait été requise pour analyser HCF-1 au travers des points dans le temps.

Les anticorps dirigés contre Ki67, contre la phosphorylation de la lysine 10 de l'histone H3 (H3S10P), contre HCF-1 et contre la cycline A ont aussi été utilisés sur des coupes histologiques en plus des extraits protéiques. Cela nous permet de discriminer différentes sous-populations cellulaires qui peuvent réagir différemment durant le processus de régénération. En accord avec les analyses par WB, Ki67 apparaît fortement dans les points 44H et 48H par rapport au point 0H (voir la figure 3.5 A et B). Cependant, la proportion de cellules positives est inférieure à ce qui a été décrit dans la littérature. Ceci peut être dû à un temps de fixation sous-optimal dans les échantillons, puisque d'autres échantillons de foies que j'ai générés ont été utilisés par Shilpi Minocha, et donnent des résultats qui concordent mieux avec ce qui a été décrit (données non-montrées). Elle a aussi analysé plusieurs coupes avec les anticorps H3S10P et HCF-1 (voir les figures 3.5 C pour h3S10P et 3.5 D et E pour HCF-1). Tel qu'attendu, plusieurs cellules sont positives pour H3S10P, qui est une modification post-traductionnelle qui augmente fortement au moment de la mitose.

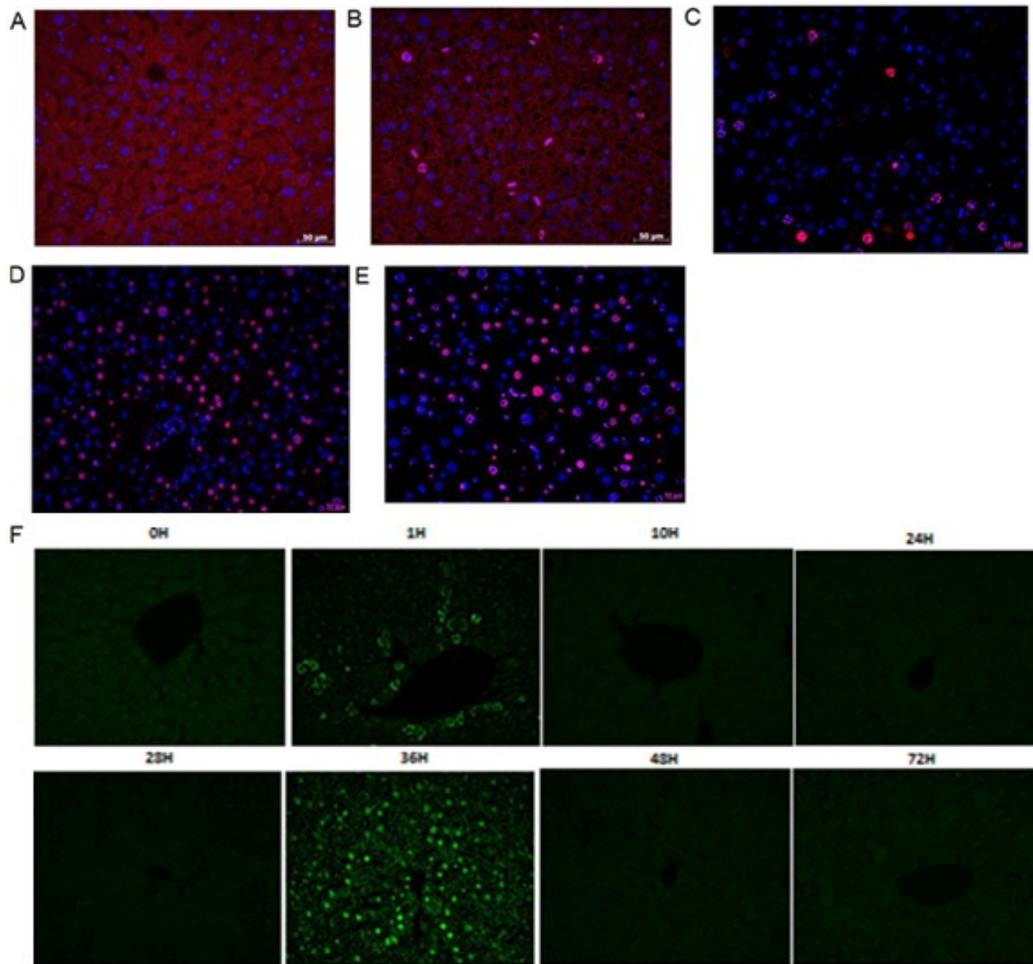


Figure 3.5 : Résultats d'immunofluorescence sur coupe histologique

En A et B, coupe histologie des points dans le temps 0H et 48H respectivement. Immunodétection de Ki67 (en rouge), et coloration du noyau (en bleu). En C, immunodétection de H3S10P (en rouge) dans le point dans le temps 48H. En D et E, coupe histologique des points 0H et 48H. Immunodétection de HCF-1 (en rouge) et coloration du noyau (en bleu). La couleur mauve est due à la colocalisation du rouge et du bleu. En F, Immunodétection de la cycline A (en vert) durant la régénération. Les photos A, B et F ont été prises sur un microscope à fluorescence, les photos C, D et E ont été prises sur un microscope confocal. Les images en C, D, E et F ont été effectuée par Shilpi Minocha, à partir de la récolte des foies.

En ce qui concerne HCF-1, le niveau basal de la protéine est déjà très élevé, et présent dans la majorité des cellules. Celui-ci ne change pas suite à l'hépatectomie, et reste présent à un haut niveau tout au long de la régénération. La colocalisation de HCF-1 et du facteur nucléaire hépatocytaire 4 alpha (HNF4 α) dans les mêmes cellules est parfaite, révélant que tous les hépatocytes expriment HCF-1 (Shilpi Minocha, communication personnelle). De plus, HCF-1 se retrouve aussi dans d'autres types cellulaires, n'exprimant pas HNF4 α .

Afin de s'assurer du moment durant lequel les cellules sont en phase S, nous avons essayé de détecter différentes cyclines sur les coupes histologiques. Par exemple, dans nos échantillons, la cycline A n'est détectable dans le noyau qu'à 36 heures après la chirurgie (voir figure 3.6 F). Cette cycline est impliquée lors de la phase S avec CDK2 afin d'initier et de compléter la réplication de l'ADN. Son second rôle est de limiter le nombre de réplication afin de n'avoir qu'une seule copie de l'original. Elle est ensuite dégradée en phase G2, remplacée par la cycline B. A une heure suite à la chirurgie, le signal est plutôt cytoplasmique, et l'induction de la cycline A est un signe de l'entrée des hépatocytes vers une phase proliférative.

3.3. Immunoprécipitation de chromatine et préparation des bibliothèques de séquençage

Nous avons dû optimiser notre protocole de ChIP-seq pour plusieurs raisons. La disponibilité du matériel de départ était restreinte, puisque chaque foie ne contient que $\frac{1}{3}$ au minimum et jusqu'à $\frac{2}{3}$ au maximum de matériel génétique de base selon les points dans le temps. De plus, selon les autorisations suisses d'expérimentation animale, il est fortement suggéré de réduire au maximum les souffrances animales

dans la mesure du possible. Nous avons donc optimisé le rendement d'ADN récolté à la fin du protocole afin de limiter le nombre de souris opérées. Trois échantillons par point dans le temps ont donc été récoltés séparément, puis les noyaux ont été réunis avant la sonication. Dans le cas du point 48 heures après la chirurgie, seul les noyaux de deux des trois échantillons ont été utilisés. Le troisième présentait un ratio du poids du foie par rapport au poids de la souris inférieur à nos attentes, ce qui augmentait la probabilité que la régénération ne s'était pas amorcée telle que souhaitée. La chromatine a ensuite été soniquée, analysée sur un gel d'agarose 1,5% contenant du bromure d'éthidium (voir la figure 3.6), puis quantifiée.

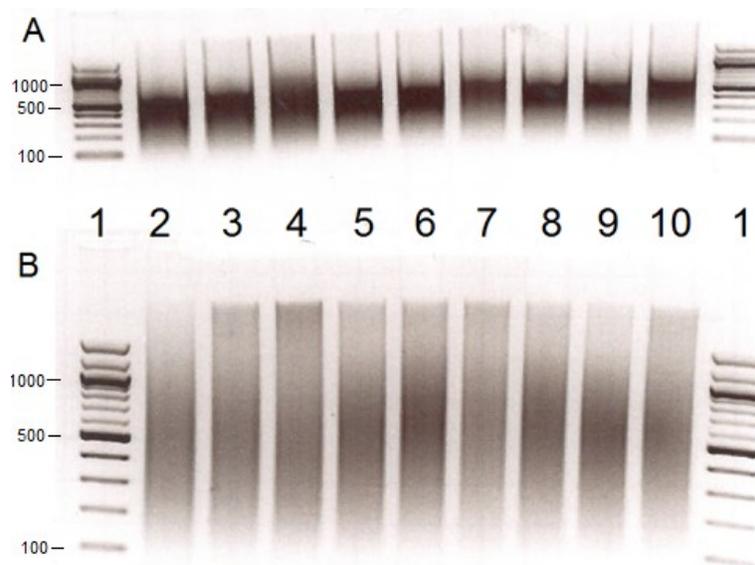


Figure 3.6 : Résultat de la fragmentation de la chromatine par sonication

Photos d'un gel d'agarose 1,5% contenant les chromatines des échantillons prises après 25 minutes (A) et 50 minutes (B) de migration à 80 V. Dans les pistes 1 : marqueur de poids moléculaire 100 pb (New England Biolabs). Les pistes 2 à 10 contiennent respectivement les chromatines des points dans le temps 0H, 1H, 10H, 20H, 28H, 36H, 44H, 48H et 60H.

Les immunoprécipitations ont ensuite été effectuées tel que mentionné précédemment (section 2.7). L'optimisation la plus importante a été effectuée au niveau de la préparation des librairies. Nous avons validé une nouvelle méthode permettant d'utiliser de 1 à 10 nanogrammes (ng) d'ADN au lieu d'un minimum de 10 ng. Cela nous a permis d'utiliser moins de chromatine de départ et d'obtenir des librairies plus uniformes qu'auparavant.

3.4. Validation des librairies de séquençages de ChIPs

Nous avons été en mesure de générer 54 librairies (9 points dans le temps par anticorps : H3K4me3, H3K36me3, pol II, pol III, HCF-1 et ADN initial). Les tailles des fragments de ces librairies n'ont pas été sélectionnées. Nous avons généré une moyenne de 225 millions de séquences (550 millions de lectures) pour l'ensemble des librairies séquencées. Les tailles des fragments dans chaque librairie variaient entre 220 pb et 2000 pb, avec une moyenne et une médiane des pics identiques, à 491 pb (voir la figure 3.7 A).

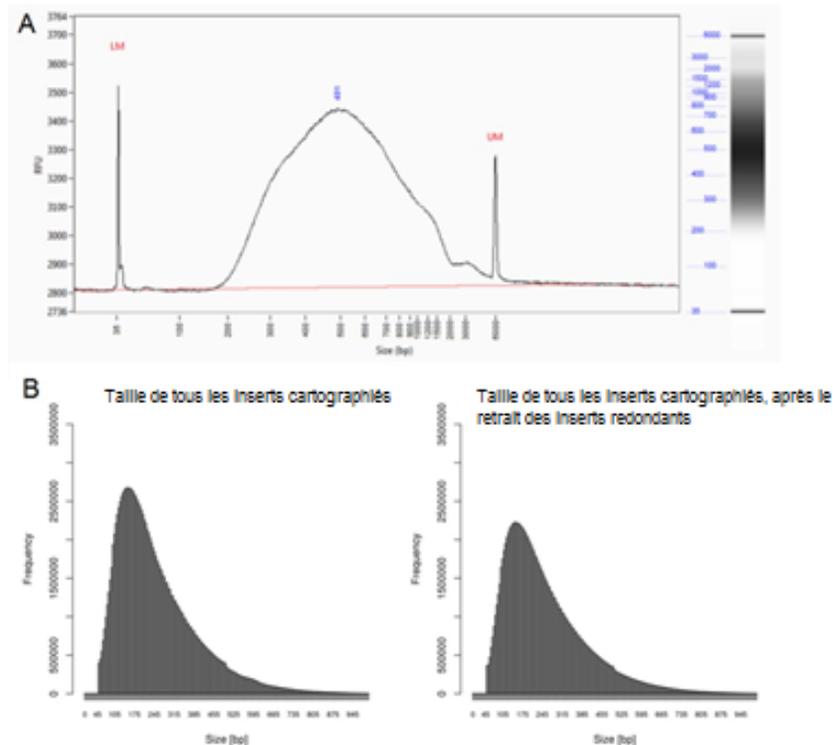


Figure 3.7 : Tailles des bibliothèques analysées par l'appareil « Fragment Analyzer » et séquençage

En A, exemple type de la courbe de distribution des tailles des bibliothèques analysées par le Fragment Analyzer. L'échelle de l'ordonnée est en valeur relative de fluorescence et celle de l'abscisse est en taille des fragments. Les pics avant et après la courbe de longueur des fragments sont les marqueurs de poids moléculaire minimum et maximum, respectivement 35 pb et 6000 pb. Sur la droite du graphique est affichée la piste de migration des fragments ayant servi au graphique. En B, exemple type de la longueur des fragments séquençés, en excluant les fragments de moins de 50 bases et de plus de 1000 bases. Les deux graphiques ont été générés en comptant de façon informatique tous les fragments correspondant à chacune des tailles (gauche) ou seulement une copie de ces fragments (droit).

Après le séquençage, la distribution de la longueur des fragments a beaucoup changé. La longueur des fragments séquencés se situait entre 50 bases (minimum technique pour les analyses) et 650 bases (voir la figure 3.7 B), avec un pic moyen à 150 bases pour l'ADN initial et les ChIPs dirigés contre la pol II, et un pic moyen à 180 bases pour les ChIPs dirigés contre les modifications post-traductionnelles des histones. Cette différence entre les pics moyens de différentes cibles n'a pas encore d'explication, mais suggère une conformation de la chromatine qui change selon les régions visés.

Le retrait des fragments redondants n'a pas modifié le profil général de la distribution des fragments. La redondance s'élève en moyenne à 15% des fragments séquencés, distribuée tel que montré en exemple sur la figure 3.8. Avec l'augmentation du nombre de séquences générées dans ce type d'expérience, la redondance usuelle que nous obtenions dans les expériences précédentes, avant la mise au point d'un protocole adapté à l'analyse de petites quantités de chromatine, était plutôt de l'ordre de 25% à plus de 40%, distribuée jusqu'à plus de 10 répétitions pour le même fragment (données non-montrées). Aucune librairie ne montre de niveau suffisamment élevé de redondance de 4 fragments et plus pour être observé dans ce type de graphique. Les fragments sont ensuite triés afin de ne conserver que ceux de bonnes qualités (voir annexe 3). Ces données nous ont donc convaincu que cette nouvelle procédure satisfait nos attentes quant à la préparation d'une librairie de fragments issus de ChIP.

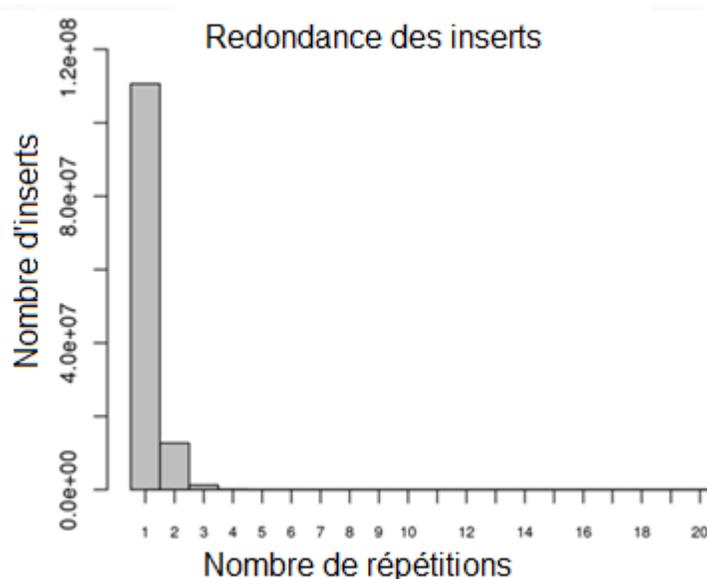


Figure 3.8 : Distribution de la redondance des fragments séquencés

Exemple type de la redondance des fragments rencontré dans les échantillons de cette expérience. Chaque barre représente le nombre de séquences uniques en ordonnée et son nombre d'exemplaire(s) en abscisse.

3.5. Visualisation des données de ChIP-seq

Nous avons utilisé un visualisateur de génome (CycliX viewer, Olivier Martin, Swiss Institute of Bioinformatics) afin de représenter les données et pouvoir explorer les changements au niveau global. De façon générale, il y a beaucoup de similitude entre les différents échantillons. Nous n'avons pas remarqué de changement majeur au niveau d'un locus entier, mais seulement au niveau de quelques pics qui peuvent apparaître ou disparaître à certains endroits. La figure 3.9 présente un exemple d'un changement sur le locus du gène MKI67, que nous avons déjà observé par WB et par IF.

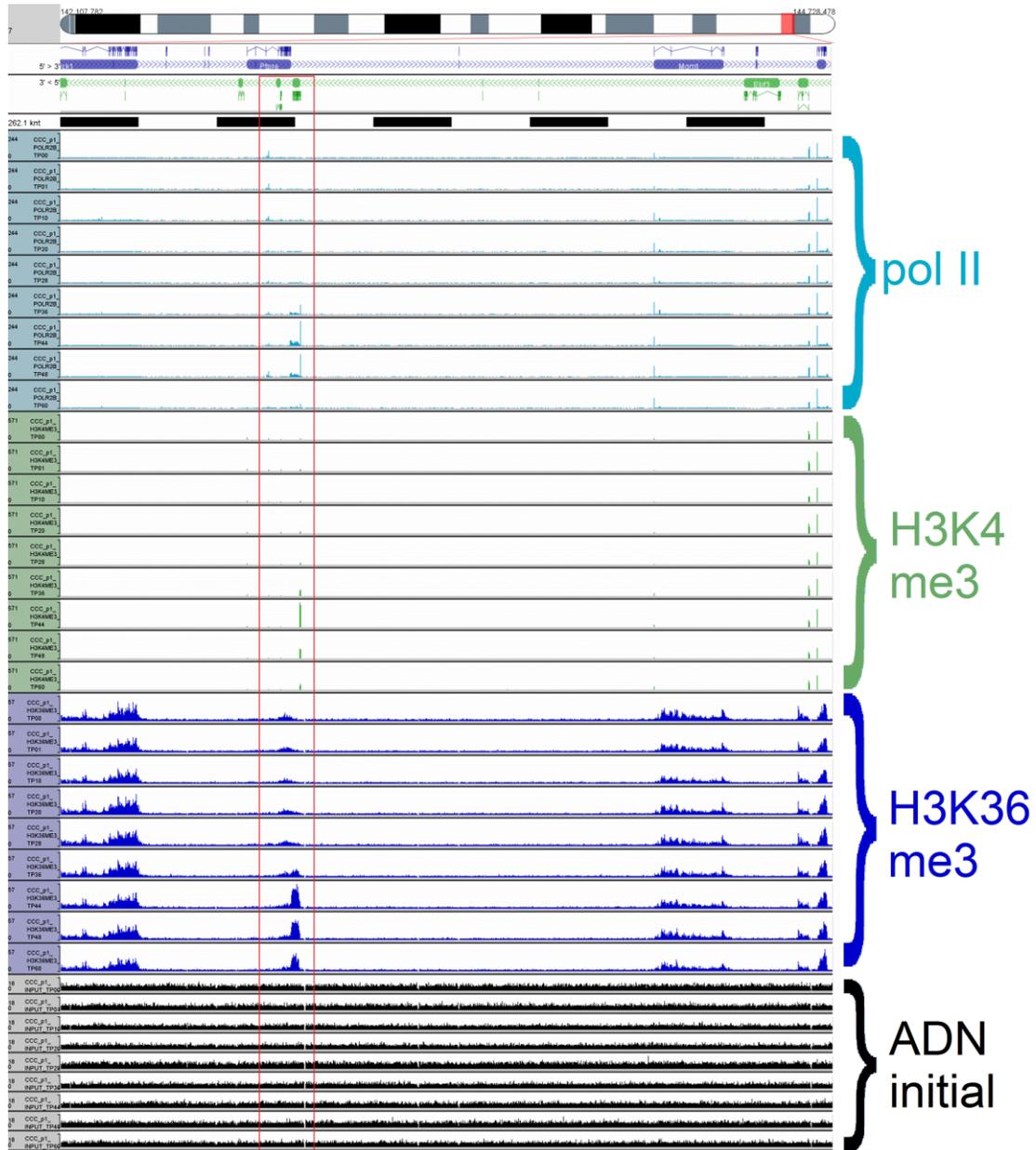


Figure 3.9 : Visualisation d'un locus autour du gène MKI67

Présentation génomique d'un locus de 2,6 millions de pb du chromosome 7 autour du gène qui produit la protéine ki67, dans l'encadré rouge. Les données sont présentées pour la pol II (turquoise), H3K4me3 (vert), H3K36me3 (bleu) et l'ADN initial (noir). L'échelle des abscisses est la même à l'intérieur de chaque ensemble et les points dans le temps sont ordonnés de façon croissante.

3.6. Analyses bio-informatiques

Les analyses bio-informatiques ont été effectuées en partenariat avec Leonor Rib, doctorante au laboratoire Herr, puisque les connaissances requises pour traiter toutes ces données dépassent largement mes compétences bio-informatiques et mon expertise. Afin d'identifier un lien entre les phases du cycle cellulaire et nos points dans le temps, nous avons examiné certains gènes. La figure 3.10 inclut 4 exemples types de gènes ayant des profils différents au cours de la régénération hépatique. Le premier exemple est représenté par CDK2. Cette protéine est connue pour ne pas varier tout au long du cycle cellulaire, sa régulation étant effectuée par l'association avec les cyclines. Dans nos données, nous observons que ce gène ne varie pas au cours de la régénération. Étant donnée sa grande implication dans le cycle cellulaire, peu d'informations sont connues quant à sa transcription au niveau basal dans des cellules non-prolifératives.

Les deuxième et troisième exemples sont représentés par les cyclines D1 et A2. Celles-ci sont connues pour ne pas être transcrites dans les cellules non-prolifératives, et être transcrites de façon transitoire durant la progression du cycle cellulaire. La différence entre les deux cyclines se trouve dans la période du cycle cellulaire à laquelle elles sont transcrites. La cycline D1 est connue pour apparaître durant la phase G1 du cycle, tandis que la cycline A2 est connue pour apparaître plus tardivement. En effet, dans nos données, nous observons une liaison de la pol II au promoteur de la cycline D1 à partir de 1 heure après la chirurgie tandis que sur le promoteur de la cycline A2, la liaison est observable à partir de 36 heures suite à la chirurgie. Le dernier exemple est représenté par JunB. Ce facteur de transcription est connu pour répondre très rapidement aux facteurs de croissance primaires. De façon intéressante, on observe que la polymérase est déjà liée au gène de façon basale. Rapidement suite à la chirurgie, les niveaux de pol II et des marques épigénétiques H3K4me3 et H3K36me3 augmentent significativement, puis reviennent à un niveau basal.

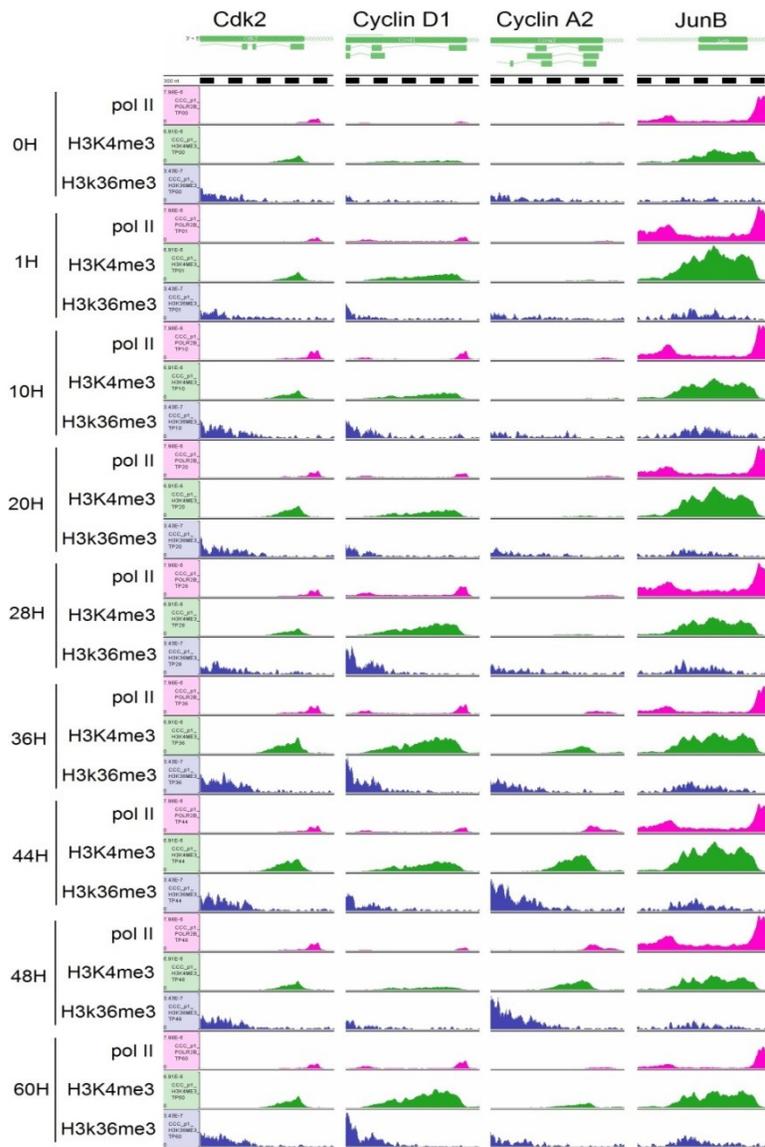


Figure 3.10 : Visualisation à l'échelle des gènes des niveaux de pol II et des marques épigénétiques H3K4me3 et H3K36me3 dans tous les points dans le temps

Représentation des séquences sur le CycliX viewer. La pol II et les marques épigénétiques H3K4me3 et H3K36me3 sont représentées en rose, vert et bleu respectivement pour chacun des points dans le temps et pour quatre gènes. Voir le texte pour plus de détail.

Parmi les transcrits annotés dont le promoteur est à plus de 1500 pb de tout autre promoteur, 9423 gènes ont été identifiés comme ayant une grande variabilité de liaison de la pol II lors de la régénération. Les lectures pour la pol II aux promoteurs de ces gènes ont été comptabilisées dans tous les points dans le temps, et un profil de liaison a été établi pour chacun de ces gènes. En utilisant une méthode de regroupement autour de la médiane, 6 « groupes » (un groupe représente un groupe classifié de manière non supervisée) ont été générés regroupant des profils similaires de liaisons de la pol II (voir la figure 3.11). Cette méthode permet de générer un nombre désiré de groupes, et le choix du nombre est fait en fonction de la meilleure similarité intra-groupe et de la plus faible similarité inter-groupe.

Pour chaque gène, une normalisation a été effectuée afin que la moyenne des points du profil soit égal à 0, afin d'observer la variance. La liaison de la pol II sur le promoteur de chaque gène est représentée sur la figure 3.11. Les groupes ont été ordonnés de façon temporelle, ceux ayant plus de signal pour la pol II dans les premiers points dans le temps sont situés dans le haut de la carte des liaisons (heatmap) tandis que ceux ayant plus de signal vers les points dans le temps tardifs sont situés dans le bas de la heatmap.

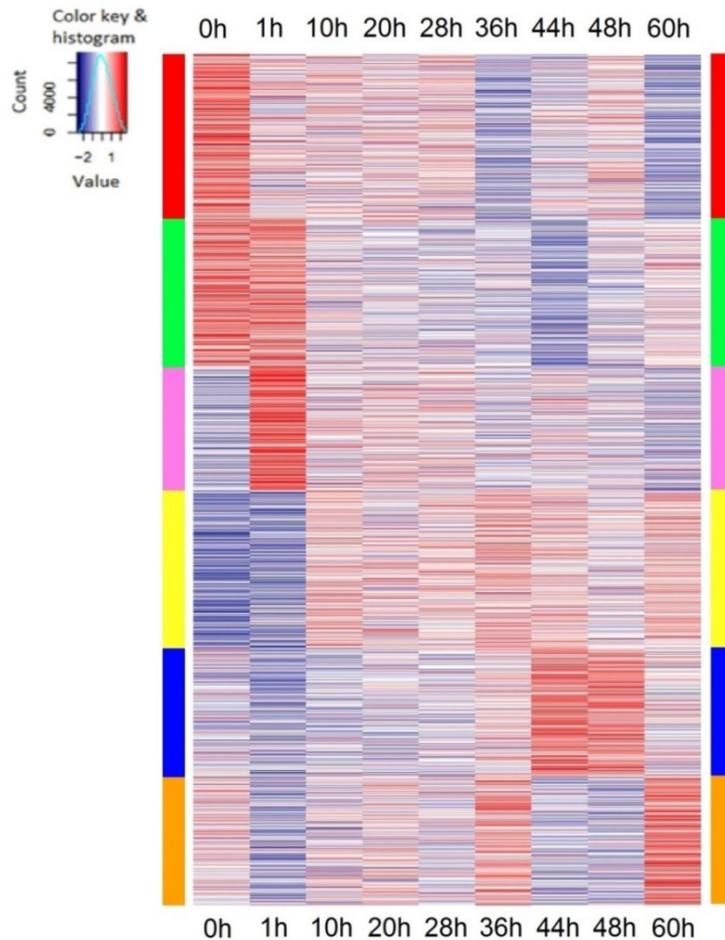


Figure 3.11 : Cartographie du profil des 9423 gènes identifiés partitionnés en 6 groupes

Chaque groupe a été associé à une couleur (comme montré à gauche et à droite). Pour chacun des gènes, un code de couleur (bleu, blanc et rouge, respectivement du score le plus bas au score le plus élevé) a été associé en fonction du niveau de polymérase II comptabilisé sur le promoteur. Nous retrouvons donc 6 différents profils : les gènes transcrits de façon basale qui s'éteignent rapidement (en rouge), les gènes transcrits de façon basale qui s'éteignent lentement (en vert), les gènes non transcrits répondant rapidement suite à la chirurgie (en mauve), les gènes non transcrits répondant tardivement lors de la régénération (en jaune), les gènes impliquées dans la fin de la première ronde de réplication (en bleu) et finalement, les gènes impliqués avant et après la fin de la première ronde de réplication (en orange).

Tel qu'attendu, CDK2 n'est référencié dans aucun groupe, puisque la liaison de la pol II sur son promoteur ne varie pas de façon significative. La cycline A2 se situe dans le groupe bleu, qui est enrichi pour les gènes impliqués dans la phase M. La cycline D1 se situe dans le groupe vert, tandis que junB se situe dans le groupe jaune. Le résultat pour la cycline D1 était attendu, dans le sens où elle ne devrait être à son minimum d'expression en phase G2 et M. En ce qui concerne JunB, protéine connu pour la réponse au stress, on s'attendait à la retrouver dans le groupe violet ou jaune, puisque ce sont les deux groupes qui sont activés le plus rapidement.

Pour chacun de ces groupes, un profil général a été généré, afin de mieux visualiser chacun des groupes (voir la figure 3.12). Chaque courbe représente l'écart de la moyenne de tous les gènes pour un même groupe. Une analyse ontologique des gènes enrichis (GO analysis) révèle les fonctions pour lesquels chaque groupe est enrichi (voir la figure 3.12). Beaucoup de fonctions similaires ont été retrouvées dans chacun des groupes et la fonction associée à chaque profil a été simplifiée dans le but d'une meilleure compréhension. La fonction associée à chacun des groupes est biologiquement très significative ($p < 10^{-5}$) et concorde avec les analyses précédentes. Par exemple, le profil bleu rassemble une multitude de gènes ayant une fonction en rapport avec la phase M du cycle cellulaire, et le pic d'expression se situe à 44 et 48 heures, c'est-à-dire au moment où nous avons le plus d'évidence pour l'occurrence de cette phase. Grâce à différentes analyses, nous croyons donc que ce modèle nous donne des résultats statistiquement significatifs et désirons reproduire ces expériences.

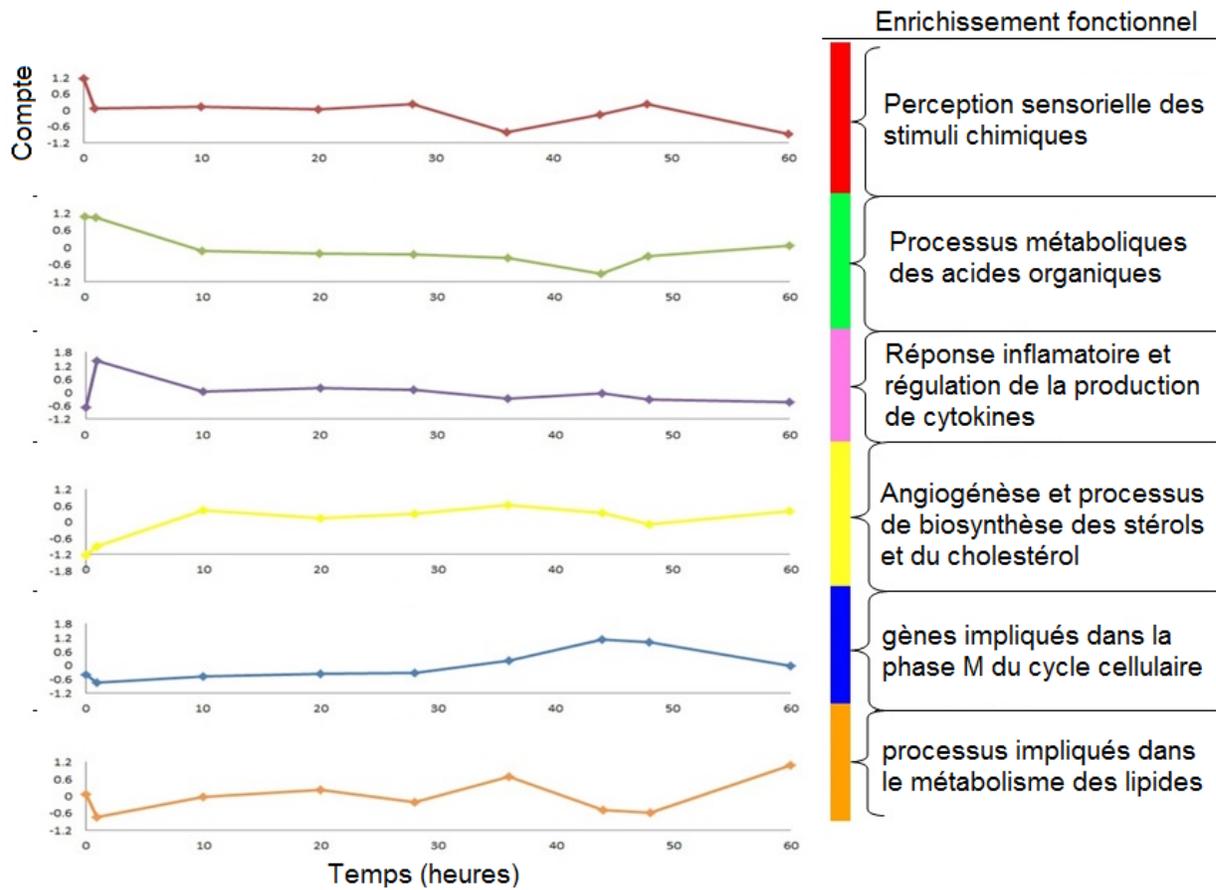


Figure 3.12 : Graphique des profils de chacun des groupes et la fonction primaire associée

Chacun des profils est centré sur la moyenne, afin de montrer la variance. Le profil est ajusté à l'échelle du temps post-chirurgical (axe des abscisses). Le compte (axe des ordonnées) est la valeur logarithmique en base 2 du ratio de la moyenne centrée et de la déviation standard.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'étude des patrons (patterns) à l'échelle génomique de la transcription génique durant la progression du cycle de division cellulaire d'hépatocytes synchronisés suite à une hépatectomie partielle a été commencée dans le cadre de mon projet de maîtrise. Cependant, il s'agit d'un projet d'une grande ampleur, et requérant des connaissances poussées en informatique afin de traiter la grande quantité de données générée par les séquençages haut-débit. Cette partie bio-informatique est aussi le projet de doctorat de Leonor Rib, étudiante dans le laboratoire Herr.

Nous avons réussi à établir un système fonctionnel nous permettant de suivre la transcription dans un tissu en régénération. Nous avons validé de plusieurs façons que la régénération se produisait en accord avec la littérature. En effet, les souris dont l'opération se déroulait bien ne montraient pas de signe de douleur et récupéraient rapidement leur mobilité. Cependant, pour quelques souris, certains facteurs nous ont indiqué que la régénération ne s'effectuait pas tel que prévu, lorsque celles-ci ne retrouvaient pas la mobilité, ou perdaient plus de 15% de leur masse. Dans ces rares cas, les souris correspondantes ont été sacrifiées avant le terme de l'expérience, et il était possible d'observer des signes de nécrose au foie, contrairement à ce qu'on observe sur la figure 3.2.

Notre profil de régénération (figure 3.1) correspond aux données de la littérature (Zou et al., 2012). En effet, sur les 3 premiers jours de régénération du foie, il était attendu que le ratio du poids du foie sur le poids de la souris augmente entre 1% et 2%. Dans

les cas où la régénération ne se produisait pas, ce ratio restait stable sur les deux premiers jours, au moment du sacrifice prématuré des souris (données non montrées). Au cours de l'expérience, nous avons décidé que le cycle nutritionnel des souris devait suivre le cycle jour / nuit, où la nourriture n'est disponible que durant la phase la plus active des souris. Cette décision a été prise dans le cadre du projet CycliX, pour être en concordance avec les études du cycle circadien. En effet, un tel cycle nutritionnel pousse le cycle circadien à osciller de manière plus robuste chez les souris. L'observation directe des foies en cours de régénération (figure 3.2) nous a confirmé que le paramètre du ratio foie / souris était juste.

Grâce aux colorations H&E sur coupe histologie, nous avons remarqué que les signes d'inflammation apparaissaient rapidement (point 10H), mais il n'a pas été possible de remarquer ces signes dans aucun autre échantillon (données non montrées). L'hépatectomie partielle, bien pratiquée, est connue pour ne pas provoquer de nécrose aux tissus non touchés, ni de grande vague d'inflammation. Dans le point 48H, nous avons pu observer directement des hépatocytes en mitose. Étant donné que la coupe histologique représente un cliché instantané de ce qui se passe dans le foie, plusieurs indices nous poussent à croire que le nombre de cellules en prolifération est plus important que le nombre de noyau en mitose (voir la figure 3.3). De plus, l'accumulation de vésicules lipidiques dans les points dans le temps tardif est un autre indice de la régénération, puisque ce phénomène semble couplé à la réplication des hépatocytes dans ce modèle. De plus, le cycle nutritionnel utilisé est connu pour accentuer ce phénomène (Zou et al., 2012 ; Mitchell et Willenbring, 2008).

Dans le cadre de l'élaboration du projet pour le consortium CycliX et pour les demandes d'autorisation d'expériences sur les souris, certains points dans le temps ont été définis de manière empirique selon les données disponibles de la littérature

(Matsuo et al., 2003). Les analyses par WB nous ont confirmé que ces points correspondaient à ce que nous désirions observer, mais nous en avons ajouté afin de mieux suivre les différents patrons de transcription des gènes. Tel que montré par la figure 3.4, l'apparition protéique séquentielle des cyclines D1 et cycline A2/A3 se produit dans l'ordre attendu. La cycline A1 n'étant exprimée que dans les cellules germinales, nous pouvons supposer que l'anticorps, désigné anti-cycline A par le fournisseur, n'a ciblé que les cyclines A2 et A3 dans nos échantillons. Aussi, tel qu'attendu, la protéine Wee1 semble augmenter et diminuer de façon cyclique avec le cycle circadien. De plus, son pic maximum se produit quelques heures avant le pic maximum de la phosphorylation de Cdk1. Puisque Cdk1 est une cible de Wee1 pour coupler ce cycle avec le cycle cellulaire, nous avons été enthousiastes à la vue de ces résultats. De plus, la phosphorylation de Cdk1 est connue pour arrêter la progression du cycle cellulaire en phase G2, avant la transition G2/M. Comme cette phosphorylation redescend dans les points 48H et 60H, nous croyons que ce point de contrôle est passé après 48H, et que les cellules entrent en mitose à ce moment-là. Un autre indice qui confirme notre réflexion est le marqueur H3S10P, qui est connu pour augmenter fortement en cas de réponse au stress, mais aussi lorsque la mitose se prépare et se produit. Finalement, Ki67 semble apparaître tardivement comparativement à nos espérances, mais les points 44H, 48H et 60H correspondent à ce qui s'est passé dans l'étude de Zou et al., 2012. Le point dans le temps 36H ne montre pas d'augmentation de cette protéine, contrairement à l'étude citée.

L'analyse d'immunodétection sur coupe histologique nous a confirmé visuellement ce que nous avons remarqué par WB en ce qui concerne Ki67 et H3S10P (voir la figure 3.5 A à C). En ce qui concerne HCF-1, nous avons remarqué qu'il est présent de façon ubiquitaire dans une vaste majorité de cellules, que ce soit avant ou après la chirurgie. Sur un autre projet de la docteure Shilpi Minocha, le retrait de cette protéine spécifiquement au foie par recombinaison semble induire une défaillance rapide du foie, et une mort prématuré des souris 10 jours suivant la recombinaison

(communication personnelle). Ces données indiquent qu'en plus de son important rôle dans le cycle cellulaire, HCF-1 joue probablement un rôle dans la fonction normale du foie.

La taille des fragments soniqués, telle que montrée dans la figure 3.6, correspond à ce que nous obtenons usuellement sur d'autres projets. La majorité des fragments est concentrée autour de 500 pb, et il ne reste plus de très longs fragments, que l'on peut quelquefois remarquer grâce à une bande plus forte dans le haut du gel. Cette analyse est confirmée par une analyse au Fragment Analyzer, qui est beaucoup plus précise et quantitative (figure 3.7 A).

Usuellement dans les expériences de ChIP-seq, les fragments à séquencer sont sélectionnés selon leur taille afin d'obtenir une résolution élevée. Des études précédentes au laboratoire nous ont suggéré d'utiliser la technologie de séquençage dite « paired-end », qui permet de sélectionner les fragments de différentes tailles de façon bio-informatique pour différentes analyses (Leonor Rib, Nicolas Guex et Winship Herr, communication personnelle). Nous avons donc généré des bibliothèques ayant la plus large distribution de fragments et les limites du séquenceur ont créé un effet de sélection entre 50 bases et ~650 bases (voir la figure 3.7 B). En effet, les fragments doivent créer un pont sur une puce d'hybridation afin d'être amplifiés. Plus le fragment est long, plus cette étape est difficile. Cette technologie nous permettra, dans nos analyses futures, de sélectionner informatiquement des fourchettes de tailles de fragments, afin de déterminer si on peut observer des différences de profils entre les différentes tailles. Les pics moyens de taille de fragments entre les différents ensembles d'échantillons (pol II, H3K4me3, H3K36me3 et ADN initial) diffèrent de 30 pb. Puisque l'analyse de ces données n'est qu'à ses débuts, nous n'avons pas encore d'hypothèse pour expliquer cette différence de 30 pb entre les pics moyen de

la pol II / ADN initial (150 pb) et des histones contenant les deux modifications épigénétiques H3K4me3 et H3K36me3 (180 pb).

La technique de préparation des bibliothèques couplée au séquençage « paired-end » nous a permis de diminuer la redondance rencontrée dans des expériences similaires précédentes et ainsi d'améliorer la quantité de lectures retenues pour les analyses et la qualité des données (voir la figure 3.8 et l'annexe 3). Afin d'obtenir des différences significatives entre les pics et le bruit de fond, un grand nombre de fragments doit être généré. La redondance diminue le nombre de fragments dans l'analyse, puisque ceux-ci ne sont pas pris en compte car ils peuvent être un effet de l'amplification de la bibliothèque par PCR.

En observant les gènes sur un visualisateur de génome à partir des marqueurs utilisés, nous pouvons obtenir beaucoup d'information. En effet, on peut visualiser directement le compte des fragments sur les loci, et identifier des régions ou des gènes variables, tel que sur la figure 3.9 avec le gène MKI67. Certaines régions montrent aussi une variabilité, mais aucun gène n'y est annoté, laissant la place à de futures analyses. Avec cette technique, il est aussi possible d'examiner précisément des gènes d'intérêt, tels que sur la figure 3.10. De cette façon, nous tentons de vérifier la transcription des gènes connus pour être cycliques dans le cycle cellulaire. Les cyclines D1, A et B1 sont très détaillées dans la littérature à ce propos, et nous ont d'ores et déjà permis d'associer certaines phases avec certains de nos points dans le temps. Dans d'autres cas, tel que dans le cas du gène JunB, la liaison de la pol II ne varie pas beaucoup au promoteur, mais augmente dans le corps du gène. De plus, les marques épigénétiques varient beaucoup au cours du processus de régénération, indiquant une transcription hautement variable durant les 60 heures post-hépatectomies étudiées. Les données sur ces types de gènes associés à des réponses immédiates, ainsi que l'absence de la transcription de la cycline D1 nous

laissent penser que le point 1H n'est pas encore associé avec le cycle cellulaire, mais plutôt associé à la réponse inflammatoire suite à la chirurgie.

Le regroupement des gènes au profil de transcription similaire nous a fourni une qualité des profils au-delà de nos attentes (voir la figure 3.11). En effet, grâce à l'analyse ontologique des gènes de chaque groupe, nous avons relié ces profils à des fonctions biologiques concordantes avec le phénomène observé (voir la figure 3.12). Il s'avère que la perception des stimuli chimiques par le foie est diminuée suite à son ablation partielle. Les stimuli chimiques comprennent tous les signaux envoyés par l'organisme afin de réguler le métabolisme. Cela nous laisse supposer que moins d'une heure après la chirurgie, le foie se concentre à réparer les dommages produits. Ensuite, les processus métaboliques sont diminués entre 1 heure et 10 heures tandis que la réponse inflammatoire se met en place pour une régénération efficace. Après 10 heures suite à la chirurgie, l'angiogénèse et la production de stérol sont mises en place, en accord avec la production de matériel tissulaire. Confirmant nos analyses précédentes, le groupe indiqué en bleu dans la figure 3.11 est grandement enrichi pour les gènes reliés au cycle cellulaire, principalement pour la mitose. Finalement, la transcription des gènes impliquée dans le métabolisme des lipides augmente juste avant et juste après les phases G2 et M. Ceci est en accord avec l'accumulation de lipides hépatiques observée par coloration sur coupe histologie. Biologiquement, ce phénomène peut être relié à l'accumulation énergétique nécessaire au foie pour poursuivre sa régénération, et/ou la demande augmentée des cellules pour des lipides entrant dans la composition des membranes cellulaires lors des divisions.

Finalement, nous sommes en mesure de suggérer un modèle afin de relier dans le temps les phases du cycle cellulaire durant la première ronde de réplication avec la régénération hépatique (voir la figure 4.1).

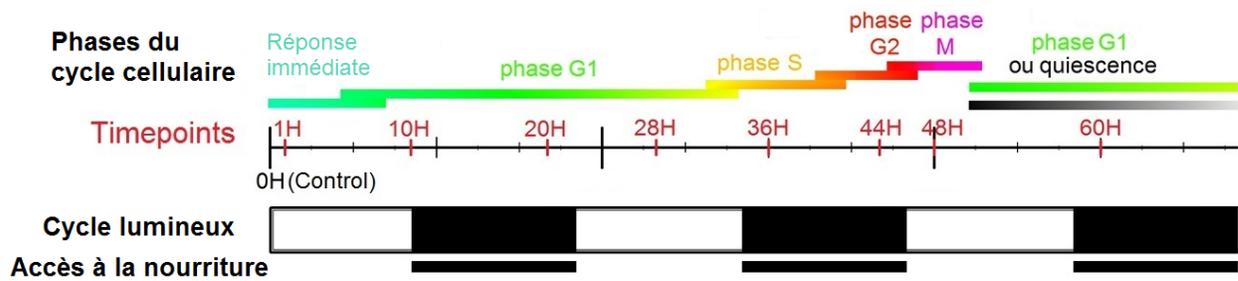


Figure 4.1 : modèle proposé du lien entre les phases du cycle de division cellulaire durant la première ronde de réplication en fonction du temps suivant une hépatectomie partielle

Les phases du cycle cellulaire sont proposées à l'échelle du temps. La gradation des couleurs démontre une transition évolutive d'une phase vers une autre, plutôt qu'une transition nette telle que souvent proposée sur différents schémas. Les conditions expérimentales par rapport aux cycles circadien et nutritionnel sont affichées sous la ligne temporelle, puisque ceux-ci peuvent avoir une influence sur l'occurrence et la longueur de chaque phase du cycle cellulaire. La nourriture est disponible lorsque la barre noire est affichée.

À la lueur des résultats obtenus, nous pensons que suite à une phase initiale de réponse immédiate au dommage, la phase G1 est mise en place entre 1 heure et 10 heures après l'intervention chirurgicale. Celle-ci dure très longtemps comparativement à celle observée chez des cellules en prolifération active, dont la phase G1 est transitoire entre la mitose et la phase S. La transition vers la phase S se produit entre 28 heures et 36 heures suite à la chirurgie, et elle-même ne dure qu'un court laps de temps, autour de 36 heures après l'intervention. La phase G2 se met ensuite en place peu avant 44 heures post-chirurgical pour ne durer que quelques heures, et transiter vers la mitose. La mitose et la cytokinèse sont connues pour durer peu de temps, et nous avons de fortes indications suggérant qu'elles se produisent dans une courte période autour de 48 heures post-chirurgical. À 60 heures post-hépatectomie, aucun signe ne montre que certaines cellules sont encore en mitose.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ma maîtrise dans le laboratoire du professeur Herr, j'ai réussi à établir et valider un modèle d'étude du cycle cellulaire, soit la régénération hépatique chez la souris. Nous avons pu étudier l'évolution de la première ronde de réplication de ce cycle et établir un lien entre chaque phase et la période à laquelle elle survient. Nous avons été en mesure de valider des résultats tirés de la littérature afin d'avoir des résultats finaux robustes et dignes de confiance.

Nous avons identifié 9423 gènes dont la transcription est hautement variable dans l'un au l'autre des points dans le temps. À partir de ces données, nous avons réussi à établir six différents profils en regroupant les gènes de façon informatique et non supervisé, en évitant le biais de choisir soi-même les types de profil, ou certains gènes entrant dans un profil particulier. Nous avons réussi à identifier des classes fonctionnelles pour chacun de ces profils. Ces classes de processus biologiques peuvent permettre des hypothèses quant aux différentes fonctions que le foie relègue, conserve ou décuple de façon transitoire afin de mener à terme sa régénération sans mettre en danger tout l'organisme.

Ces résultats sont très prometteurs pour la suite des analyses. Dans un premier temps, les résultats vont nous permettre de décrire les phases du cycle cellulaire au niveau de l'état génomique des cellules. Nous pourrons aussi comparer nos résultats à ceux obtenus lors d'une étude du cycle diurne. Par exemple dans cette étude, il a été constaté que l'activation de la transcription des gènes se traduisait par une augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II sur les promoteurs suivie, avec

un délai d'environ 1 heure, par un maximum de triméthylation de l'histone 3 sur la lysine 4. Il sera intéressant de déterminer si les mêmes phénomènes peuvent être observés pendant le cycle cellulaire et si l'apparition des marques d'histones et leur disparition, suivent la même cinétique par rapport à l'occupation par l'ARN polymérase II que lors du cycle circadien.

Il reste encore quelques expériences et beaucoup de travail bio-informatique à accomplir afin d'identifier d'autres profils ainsi que des catégories de gènes. D'autres expériences reliées à ce projet sont déjà prévues, telles que l'analyse de l'ARN par la technologie nCounter de Nanostring et par puce d'expression génique. La première technologie nous permettra d'établir des comptes absolus des molécules d'ARN pour une grande variété de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et dans le cycle circadien, tandis que la seconde nous permettra de relier les profils de transcription à des profils d'expression. De nouvelles cibles de ChIP sont aussi à l'étude afin d'apporter de nouvelles données dans ce modèle.

Un nouveau projet est aussi en cours, en lien avec les hépatectomies partielles et la présence de HCF-1 dans le foie. Avec la docteure Shilpi Minocha, nous prévoyons d'étudier l'implication de HCF-1 grâce à des souris KO-conditionnelles pour ce gène dont la stimulation de la recombinaison est sous le contrôle du promoteur de l'albumine inductible par le tamoxifène. Nous désirons étudier la fonction basale de HCF-1 dans le foie, ainsi que sa fonction lors de la régénération hépatique.

ANNEXES

Liste des annexes

Annexe 1 : poster présenté lors du symposium international « Chromatin Changes in Differentiation and Malignancies , au Pays-Bas.....	71
Annexe 2 : Protocole de CHIP utilisé dans le cadre de cette étude	72
Annexe 3 : Résultats du processus de triage et d'analyse des fragments séquencés	78

Annexe 1 : poster présenté lors du symposium international « Chromatin Changes in Differentiation and Malignancies , au Pays-Bas.



Genome-wide patterns of gene transcription during synchronized hepatocyte cell-division cycle progression following 2/3 hepatectomy

Dominic Villeneuve¹, Leonor Rib^{1,2}, Eugenia Migliavacca^{1,2}, Viviane Praz^{1,2}, Nouria Hernandez¹, Nicolas Guex¹, Winship Herr¹ and the CyclIX consortium

¹ Center for Integrative Genomic, University of Lausanne, Switzerland; ² Swiss Institute of Bioinformatics, Switzerland

Introduction

Goal: To study the chromatin and epigenetic changes that occur after the induction of cell-division on non proliferative cells in a native tissue

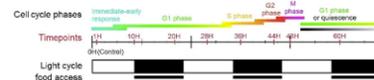
Approach: We have performed 2/3 hepatectomy on mice and have collected 8 time points distributed over 2.5 days during which the first round of regeneration occurs. We then used the ChIP-seq technique to identify transcriptional changes across the whole genome.

We explore the progression of changes in:

- RNA polymerase II (RNA pol II) binding level on genes and promoters
- H3K4me3 level on promoters
- H3K36me3 level on gene bodies

1. Hepatectomy

- C57BL/6J male mice between 10 and 14 weeks old
- 12H light period with food access during dark period only
- Hepatectomy consisted of removal of the left lateral lobe and the median lobe (~70% of total liver). See figure on the right
- We have chosen time points according to different cell cycle phases (see figure below), in accordance with the literature and consistent with our western blot and immunostaining analyses (not shown)



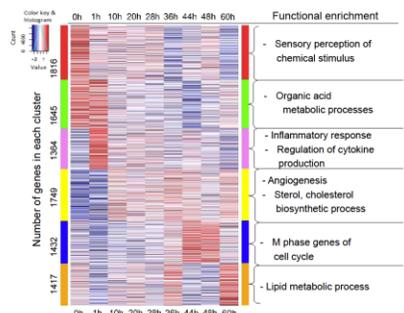
1.1 ChIP-Seq

Samples were analysed by ChIP-seq for RNA pol II, H3K4me3 and H3K36me3 and sequenced with paired-end technology

Experimental method

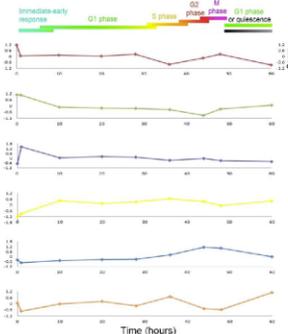
Results

2. Clustering of variably pol II-occupied genes



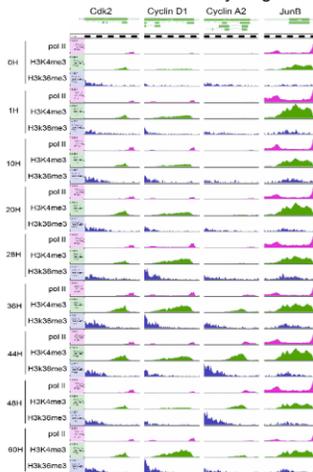
A clustering using "Partitioning Around Medoids (PAM) method" was performed on the 9,423 most variable transcripts whose promoter is at least 1.5Kb apart from any other promoter. Six groups of genes with different RNA pol II occupancy patterns in the promoter across time points are shown. Interestingly, there is a concordance between the time point at which the RNA pol II occupies the gene and the gene's function.

3. Expression profiles



We summarize the results shown in Figure 3 by displaying the centered average scores of each cluster of genes identified. Across all timepoints, scores (log₂ ratio mean centered and divided by standard deviation) vary between 1.4 and -0.9 on Y axis and timepoints are on scale on X axis. Each line shows the changes in the average score of one group of genes.

4. Visualization of 4 cell-cycle genes



Snapshot of the chromatin states before partial hepatectomy (0h) and after partial hepatectomy (other timepoints) in the promoters of cell cycle genes: Cdk2, Ccn1, Ccn2 and JunB. The Cyclins (Ccn) and Cyclin Dependent Kinases (Cdk) have key roles in the regulation of the cell cycle, as other Cdk's, Cdk2 is being transcribed during the cell cycle and will be bound by its partner cyclin to regulate specific aspects of the cell cycle progression. Ccn1 regulates the G1/S phase passage and Ccn2 is essential for the control of the cell cycle and promotes both G1/S and G2/M transitions. In the display, only the central 50 bp of the inserts are shown.

Conclusion

- We have validated our approach to induce cell proliferation in livers and to perform ChIP-seq with a low amount of starting material (resected livers)
- Epigenetic changes help us to identify actively transcribed genes, thus linking gene expression to chromatin state
- We have identified 9423 genes that transiently change transcription level following 2/3 hepatectomy. We observe 6 different binding patterns according to pol II level on promoters for those gene, and these patterns are functionally enriched for specific biological processes

Acknowledgement



High Performance Computing Center
All the computations were performed at the Vital-IT (<http://www.vital.it.ch>) Center for high-performance computing of the Swiss Institute of Bioinformatics.

Annexe 2 : Protocole de ChIP utilisé dans le cadre de cette étude

Modified from Nicolas Bonhoure
by Dominic Villeneuve for CycliX Cell Cycle

Chromatin IP using mouse livers

Day 1, part 1

Chromatin preparation

*Prepare ultra-centrifuge at 4°C.

1. Wash mouse livers with cold 1xPBS and homogenize them in 4 ml per liver of 1 xPBS including 1% formaldehyde (solution at RT). Homogenization is done with an automatic homogenizer by moving the tube up and down for approximately 1 min or until the tissue is completely dissolved in the buffer.
2. Keep the homogenate for 10 min at room temperature. At this point, let the tube at RT for the remaining time.
3. Stop the cross-linking reaction by adding 25 ml of **ice-cold 2.2 M sucrose** and vigorous mixing by inverting the tubes. Make sure the homogenate and the sucrose buffer are well mixed, otherwise the cushion separation after centrifugation might be affected.
4. Layer the homogenate on top of a 10 ml cushion of **ice-cold 2.05 M sucrose** and centrifuge for 1 hour at 24,000 rpm (100,000g) at 4 °C in a Beckmann SW28 (SW32ti) rotor.

*prepare tabletop centrifuge at 4°C.

5. Discard the supernatant by aspirating the different cushions. To eliminate sucrose traces, wash the walls of the tube with a syringe containing distilled H₂O, being careful to avoid the nuclei pellet. Dry the walls with a sheet of chemi-wipe paper wrapped around a glass pipette.
6. Resuspended the nuclei in 2 X 700 µl of **ice-cold buffer A** and transfer to 1.5 ml eppendorf tubes. Quick spin (30 sec at 2,000rpm in a tabletop centrifuge) and remove supernatant. Resuspend in 500 ul of **Freezing buffer** (20% glycerol, 20 mM HEPES pH 7.6, 0.2 mM EDTA, 2 mM DTT, 100 mM KCl), snap freeze in liquid nitrogen and store at -70°C.

Day 1, part 2

7. Thaw nuclei samples, centrifuge 1 min. at 2000 rpm in a table top centrifuge and remove supernatant. Wash the pellet with 700 ml of **ice-cold buffer A**.
8. Centrifuge 1 min. at 2000 rpm, remove supernatant, resuspend the pellet in 1.2 ml of NLB and let on ice during 10 min. Add 0.72 ml of IP dilution buffer (IPDB), transfer to a 5 ml tube and sonicate chromatin 12 x (10" ON, 20" OFF), 50% amplitude and always keep on ice.
9. Using these conditions, the DNA is sheared to approximately 300-1000 bp fragments. Transfer the sheared chromatin to 2 ml microcentrifuge tubes and centrifuge at 13000 rpm for 5 minutes at 4°C.
10. Transfer the supernatant to a 15 ml Falcon and add 4.1 ml of IPDB to each tube to bring the ratio of NLB:IPDB to 1:4. You should have approximately 6 ml of sample.
11. Preclear chromatin by adding 100 µl of preimmune serum and incubate for 1 hour at 4°C on a rotating wheel. Add 200 µl of the homogeneous protein A-agarose suspension (100 µl of the bed volume) and incubate for 3 hours (to overnight) at 4°C on a rotating wheel.
12. Centrifuge the beads at 3000 rpm for 2 minutes at 4°C. Use the supernatant to set up the chromatin immunoprecipitation.

IP condition: : 57 ug chromatin + 3 ug human chromatin (5%) in 1200 µL (adjust with IPDB^{mod}). Add antibody and incubate O/N on rotating wheel at 4°C.

USE 5% of chromatin to set up an INPUT control and store at -20°C.

*IPDB^{mod} is made by mixing 1 part of NLB to 4 parts of IPDB.

Day 2

IP washes and Elution

13. Centrifuge the samples at 13000 rpm for 5 minutes at 4°C.
Transfer the samples to new 1.5 ml microcentrifuge tubes and add 40 µl of the homogenous protein A-agarose suspension (20µl of the bed volume). Incubate for at least 3 hours at 4°C with rotation.
14. Centrifuge the protein A-agarose beads at 3000 rpm for 20 seconds at 4°C. Remove the supernatant and wash the pellet twice with 950 µl of IP wash buffer 1 (IPWB1). For each wash, vortex briefly and centrifuge at 3000 rpm for 2 minutes at 4°C. Leave the tubes undisturbed for a minute before removing the supernatant.
15. Wash the pellet similarly, once with 950 µl of IP wash buffer 2 (IPWB2) and twice with 950 µl of TE pH 8.0.
16. Elute the immune complexes (DNA-protein-antibody) from the beads by adding 2 x 125 µl of IP elution buffer (IPEB). Vortex briefly and centrifuge at 4500 rpm for 2 minutes. Repeat this step and combine both elutions in the same tube.
17. Add 0.2µl of RNase A (10mg/ml stock) and 27 µl of 5M NaCl (final concentration of 0.3M) to each sample. **Also add 0.1 µl of RNase A (10mg/ml stock) and 16.2 µl of 5M NaCl to the input sample .** Incubate the samples at 65°C for 6 hours.
18. Add 4,5 µl of proteinase K (20 mg/ml stock) and incubate overnight at 45°C.

Day 3

Use the NucleoSpin kit from Macherey-Nagel that we routinely use in the lab for gel purification of DNA. However, for these samples it is important to use a special binding buffer (**NTB – cat n.740595**) compatible with samples containing SDS.

19. Adjust DNA binding condition: Mix 1 volume of sample with 5 volumes of **Buffer NTB** and 1 volume of isopropanol
20. Place a **NucleoSpin® Extract II Column** into a CollectionTube (2 mL) and load the sample.
Centrifuge for **30 sec.** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube
21. Wash silica membrane
Add **700 µL Buffer NT3** to the NucleoSpin® Extract II Column. Centrifuge for **30 sec.** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.
22. Dry silica membrane
Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** to remove **Buffer NT3** completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.
23. Elute DNA
Place the NucleoSpin® Extract II Column into a **new** 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add **15 µL Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18–25 °C) for **1 min**. Centrifuge for **30 sec.** at **11,000 x g**.
Repeat this step to have a final volume of 30 µL.

Input is already diluted 20 fold compare to the ChIP sample.

24. Electrophorese 10 µl of input on a 1% agarose 1XTBE gel to check DNA size. You can try and quantitate DNA yield using Qubit spectrophotometer. Store samples at -20°C.

Buffers and Solutions

Final concentration	Stock	Volume for 500ml
2.2M sucrose		weight 376,5g of sucrose
150 mM glycine	2,5M glycine	30,1ml
10 mM HEPES pH 7.6	1M HEPES pH 7.6	5ml
15 mM KCl	2M KCl	3,75ml
2 mM EDTA	0,5M EDTA pH 8	2ml
0.15 mM spermine	1M spermine	75ul
0.5 mM spermidine	1M spermidine	250ul
0.5 mM DTT	1M DTT	250ul
0.5 mM PMSF	200mM PMSF	1ml

Weight 376,5g of sucrose and dissolve in 180ml of **warm** distilled water. Once the sucrose is dissolved, add glycine, Hepes, KCl and EDTA and bring the volume to 500ml. Add spermine, spermidine, DTT and PMSF just before use.

Final concentration	Stock	Volume for 500ml
2.05M sucrose		weight 350,8g of sucrose
125 mM glycine	2,5M glycine	25ml
10% glycerol	100% glycerol	50ml
10 mM HEPES pH 7.6	1M HEPES pH 7.6	5ml
15 mM KCl	2M KCl	3,75ml
2 mM EDTA	0,5M EDTA pH 8	2ml
0.15 mM spermine	1M spermine	75ul
0.5 mM spermidine	1M spermidine	250ul
0.5 mM DTT	1M DTT	250ul
0.5 mM PMSF	200mM PMSF	1ml

Weight 350,8g of sucrose and dissolve in 200ml of distilled **warm** water. Once the sucrose is dissolved, add glycine, glycerol, Hepes, KCl and EDTA and bring the volume to 500ml. Add spermine, spermidine, DTT and PMSF just before use.

Final concentration	Stock	Volume for 500ml
buffer A		
20 mM Tris, pH 7.5	1M Tris, pH 7.5	10ml
150 mM NaCl,	5M NaCl,	15ml
2 mM EDTA	0,5M EDTA	2ml

Add PMSF 1mM just before use.

cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.2% NP40, 10mM sodium butyrate, 50 µg/ml PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 0.15 mM, spermine, 0.5 mM spermidine)

nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS, 10mM sodium butyrate, 50 µg/ml PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 0.15 mM, spermine, 0.5 mM spermidine)

IP dilution buffer (IPDB) (20mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.01% SDS, 10mM sodium butyrate, 50 µg/ml PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 0.15 mM, spermine, 0.5 mM spermidine)

IP wash buffer 1 (IPWB1) (20 mM Tris-HCl pH 8.1, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS)

IP wash buffer 2 (IPWB2) (10 mM Tris-HCL pH 8.1, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% deoxycholic acid)

IP elution buffer (IPEB) (100 mM NaHCO₃, 1% SDS)

Annexe 3 : Résultats du processus de triage et d'analyse des fragments séquencés

sample	Timepoint post hepatectomy [h]	antibody	# raw reads	# raw inserts	% of mapped reads onto mm9 (PF)	# mapped inserts onto mm9	% of mapped reads onto hg19 (PF)	# mapped inserts onto hg19
DV104	0	RPB2	534'134'938	267'067'469	82.84	221'238'691.3	9.31	24'863'981.4
DV105	1	RPB2	543'097'520	271'548'760	82.94	225'222'541.5	9.28	25'199'724.9
DV106	10	RPB2	577'612'364	288'806'182	83.81	242'048'461.1	9.1	26'281'362.6
DV107	20	RPB2	541'560'138	270'780'069	83.53	226'182'591.6	9.61	26'021'964.6
DV108	28	RPB2	594'468'950	297'234'475	83.65	248'636'638.3	8.47	25'175'760.0
DV109	36	RPB2	574'558'156	287'279'078	83.32	239'360'927.8	10.47	30'078'119.5
DV110	44	RPB2	537'278'408	268'639'204	84.21	226'221'073.7	10.01	26'890'784.3
DV111	48	RPB2	536'082'914	268'041'457	84.43	226'307'402.1	9.98	26'750'537.4
DV112	60	RPB2	512'285'502	256'142'751	84.05	215'287'982.2	9.67	24'769'004.0
DV113	0	H3K36me3	465'594'434	232'797'217	78.05	181'698'227.9	20.21	47'048'317.6
DV114	1	H3K36me3	391'269'546	195'634'773	80.75	157'975'079.2	18.86	36'896'718.2
DV115	10	H3K36me3	330'921'908	165'460'954	84.37	139'599'406.9	18.57	30'726'099.2
DV116	20	H3K36me3	425'659'110	212'829'555	81.19	172'796'315.7	18.09	38'500'866.5
DV117	28	H3K36me3	421'120'714	210'560'357	81.39	171'375'074.6	17.68	37'227'071.1
DV118	36	H3K36me3	442'933'102	221'466'551	82.17	181'979'065.0	17.42	38'579'473.2
DV119	44	H3K36me3	410'111'000	205'055'500	80.1	164'249'455.5	19.84	40'683'011.2
DV120	48	H3K36me3	414'778'408	207'389'204	80.93	167'840'082.8	18.91	39'217'298.5
DV121	60	H3K36me3	439'751'318	219'875'659	81.36	178'890'836.2	17.64	38'786'066.2
DV122	0	H3K4me3	477'275'040	238'637'520	79.78	190'385'013.5	12.53	29'901'281.3
DV123	1	H3K4me3	436'929'114	218'464'557	79.51	173'701'169.3	8.33	18'198'097.6
DV124	10	H3K4me3	429'221'266	214'610'633	81.49	174'886'204.8	12.01	25'774'737.0
DV125	20	H3K4me3	398'899'504	199'449'752	80.42	160'397'490.6	15.09	30'096'967.6
DV126	28	H3K4me3	426'123'816	213'061'908	80.75	172'047'490.7	12.91	27'506'292.3
DV127	36	H3K4me3	474'183'376	237'091'688	81.61	193'490'526.6	13.82	32'766'071.3
DV128	44	H3K4me3	460'349'900	230'174'950	80.57	185'451'957.2	15.5	35'677'117.3
DV129	48	H3K4me3	443'125'216	221'562'608	80.89	179'221'993.6	12.74	28'227'076.3
DV130	60	H3K4me3	445'502'128	222'751'064	80.9	180'205'610.8	14.24	31'719'751.5
DV131	0	Input	402'498'272	201'249'136	81.22	163'454'548.3	10.61	21'352'533.3
DV132	1	Input	394'665'506	197'332'753	80.58	159'010'732.4	9.94	19'614'875.6
DV133	10	Input	334'584'934	167'292'467	81.52	136'376'819.1	12.96	21'681'103.7
DV134	20	Input	329'009'972	164'504'986	81.24	133'643'850.6	12.2	20'069'608.3
DV135	28	Input	486'900'888	243'450'444	80.34	195'588'086.7	8.92	21'715'779.6
DV136	36	Input	378'030'002	189'015'001	80.79	152'705'219.3	12.03	22'738'504.6
DV137	44	Input	372'554'722	186'277'361	82.14	153'008'224.3	12.25	22'818'976.7
DV138	48	Input	403'059'044	201'529'522	81.54	164'327'172.2	10.6	21'362'129.3
DV139	60	Input	371'704'718	185'852'359	81.29	151'079'382.6	11.93	22'172'186.4

sample	Timepoint post hepatectomy [h]	antibody	Mouse data						
			# inserts uniquely mapped, good sequencing quality, proper read size & [50, 1000] bp long	% inserts uniquely mapped, good sequencing quality, proper read size & [50, 1000] bp long	# inserts with good quality, proper insert size but out of [50, 1000] bp	# inserts sequenced only once	% inserts sequenced only once	# one-copy of inserts used for analysis	% one-copy of inserts used for analysis
DV104	0	RPB2	183979837	69	68'204	130'491'615	71	153611973	83
DV105	1	RPB2	182223333	67	48'706	?	#VALUE!	147790584	81
DV106	10	RPB2	199532917	69	52'401	122'129'461	61	155232254	78
DV107	20	RPB2	191195422	71	51'215	118'116'917	62	149558897	78
DV108	28	RPB2	203710639	69	51'924	115'644'574	57	152844133	75
DV109	36	RPB2	197882589	69	51'759	116'183'598	59	150985483	76
DV110	44	RPB2	188852593	70	61'378	123'899'693	66	152236871	81
DV111	48	RPB2	189153064	71	61'155	130'254'886	69	156142612	83
DV112	60	RPB2	180583751	71	67'188	131'293'030	73	152851805	85
DV113	0	H3K36me3	152989357	66	101'417	122'653'756	80	136306823	89
DV114	1	H3K36me3	132083220	68	115'228	108'406'413	82	119022389	90
DV115	10	H3K36me3	115425561	70	195'939	98'699'249	86	106243139	92
DV116	20	H3K36me3	146617299	69	105'524	119'583'869	82	131815213	90
DV117	28	H3K36me3	144597274	69	135'558	117'181'997	81	129517721	90
DV118	36	H3K36me3	152914581	69	140'548	123'566'782	81	136837490	89
DV119	44	H3K36me3	137413805	67	157'418	114'290'328	83	124751201	91
DV120	48	H3K36me3	140942743	68	116'985	117'940'575	84	128333704	91
DV121	60	H3K36me3	150582523	68	125'616	120'803'673	80	134201017	89
DV122	0	H3K4me3	159923507	67	68'081	118'310'825	74	135957993	85
DV123	1	H3K4me3	160542843	73	53'839	115'390'088	72	134648202	84
DV124	10	H3K4me3	147216760	69	64'894	119'265'396	81	130938277	89
DV125	20	H3K4me3	135577951	68	71'610	92'659'021	68	111091428	82
DV126	28	H3K4me3	144195507	68	78'797	110'639'568	77	124826798	87
DV127	36	H3K4me3	161669291	68	77'656	99'111'575	61	125785932	78
DV128	44	H3K4me3	154774769	67	112'072	85'121'761	55	114610407	74
DV129	48	H3K4me3	150451760	68	102'776	92'032'201	61	116898279	78
DV130	60	H3K4me3	151704754	68	96'148	98'099'176	65	121187644	80
DV131	0	Input	136255657	68	88'297	102'159'693	75	116478160	85
DV132	1	Input	134610994	68	88'292	103'473'045	77	116426528	86
DV133	10	Input	110751190	66	177'376	89'868'486	81	98446632	89
DV134	20	Input	110264671	67	157'632	90'710'908	82	98728434	90
DV135	28	Input	163103524	67	147'031	119'371'032	73	137674719	84
DV136	36	Input	123853739	66	213'061	92'688'320	75	105824188	85
DV137	44	Input	125649208	67	226'959	99'412'074	79	110524689	88
DV138	48	Input	136324458	68	130'134	107'973'241	79	119777663	88
DV139	60	Input	124008364	67	197'361	97'203'322	78	108318802	87

sample	Timepoint post hepatectomy [h]	antibody	Human data						
			# inserts uniquely mapped, good sequencing quality, proper read size & [50, 1000] bp long	% inserts uniquely mapped, good sequencing quality, proper read size & [50, 1000] bp long	# inserts with good quality, proper insert size but out of [50, 1000] bp	# inserts sequenced only once	% inserts sequenced only once	# one-copy of inserts used for analysis	% one-copy of inserts used for analysis
DV104	0	RPB2	8'687'991	3	6'030	5'941'491	68	7532576	87
DV105	1	RPB2	9'600'976	4	5'112	6'102'327	64	7873804	82
DV106	10	RPB2	9'644'054	3	5'692	5'715'106	59	7650046	79
DV107	20	RPB2	10'735'619	4	6'096	6'342'760	59	8508143	79
DV108	28	RPB2	9'352'502	3	5'768	5'055'281	54	7094214	76
DV109	36	RPB2	12'047'833	4	7'173	6'762'210	56	9312633	77
DV110	44	RPB2	9'905'851	4	9'188	6'169'365	62	8046836	81
DV111	48	RPB2	9'691'835	4	8'085	6'359'577	66	8072928	83
DV112	60	RPB2	7'880'491	3	5'927	5'510'403	70	6771733	86
DV113	0	H3K36me3	27'609'752	12	43'210	21'308'263	90	24911356	90
DV114	1	H3K36me3	18'378'396	9	31'503	14'528'967	79	16777584	91
DV115	10	H3K36me3	10'874'639	7	39'202	9'021'439	83	10166199	93
DV116	20	H3K36me3	20'052'558	9	32'129	15'722'909	78	18230959	91
DV117	28	H3K36me3	18'702'578	9	32'276	14'544'898	78	16935080	91
DV118	36	H3K36me3	18'832'653	9	30'801	14'586'520	77	17018438	90
DV119	44	H3K36me3	21'408'826	10	47'400	17'095'673	80	19636217	92
DV120	48	H3K36me3	20'012'160	10	37'597	16'076'542	80	18414732	92
DV121	60	H3K36me3	19'530'525	9	31'366	15'050'763	77	17601484	90
DV122	0	H3K4me3	13'021'374	5	7'538	9'390'507	72	11360807	87
DV123	1	H3K4me3	14'392'408	7	5'489	10'011'278	70	12334903	86
DV124	10	H3K4me3	9'483'542	4	6'439	7'521'308	79	8656144	91
DV125	20	H3K4me3	13'817'963	7	11'434	9'182'891	66	11587278	84
DV126	28	H3K4me3	10'482'421	5	8'315	7'862'262	75	9312977	89
DV127	36	H3K4me3	13'947'285	6	8'495	8'314'139	60	11090948	80
DV128	44	H3K4me3	17'235'995	7	15'483	9'191'810	53	13013309	76
DV129	48	H3K4me3	11'272'149	5	12'440	6'781'920	60	9000568	80
DV130	60	H3K4me3	14'350'354	6	13'971	9'099'398	63	11749232	82
DV131	0	Input	4'612'014	2	5'537	3'363'370	73	4017089	87
DV132	1	Input	5'569'136	3	6'681	4'179'833	75	4919507	88
DV133	10	Input	3'974'486	2	11'737	3'158'292	79	3610674	91
DV134	20	Input	4'135'575	3	10'175	3'323'706	80	3777764	91
DV135	28	Input	6'132'893	3	8'687	4'358'928	71	5275658	86
DV136	36	Input	5'187'449	3	12'055	3'780'092	73	4517001	87
DV137	44	Input	4'825'054	3	11'812	3'701'262	77	4308209	89
DV138	48	Input	4'280'868	2	6'878	3'293'283	77	3827250	89
DV139	60	Input	4'413'901	2	9'942	3'364'484	76	3928793	89

BIBLIOGRAPHIE

Acker, J., de Graaff, M., Cheynel, I., Khazak, V., Kedingler, C. et Vigneron, M. (1997). Interactions between the human RNA polymerase II subunits. *J Biol Chem.* 272(27), 16815-16821.

Arias, I., Wolkoff, A., Boyer, J., Shafritz, D., Fausto, N., Alter, H. et Cohen, D. (2009). *The liver: biology and pathobiology.* (Chichester : John Wiley & Son Ltd).

Bell, O., Tiwari, V. K., Thomä, N. H. et Schübeler, D. (2011). Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat Rev Genet.* 12(8), 554-564.

Borggreffe, T., Davis, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., et Kornberg, R.D. (2002). A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J Biol Chem* 277, 44202–44207.

Brower, C.S., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Kamura, T., Pause, A., Stearman, R., Klausner, R.D., Malik, S., Lane, W.S., Sorokina, I. et al. (2002). Mammalian mediator subunit mMED8 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cul2 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10353–10358.

Canella, D., Bernasconi, D., Gilardi, F., LeMartelot, G., Migliavacca, E., Praz, V., Cousin, P., Delorenzi, M., Hernandez, N. et le Consortium CycliX. (2012). A multiplicity of factors contributes to selective RNA polymerase III occupancy of a subset of RNA polymerase III genes in mouse liver. *Genome Res.* 22(4), 666-680.

Canella, D., Praz, V., Reina, J.H., Cousin, P. et Hernandez, N. (2010). Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells. *Genome Res.* 20, 710-721.

Charlton, M., Krishnan, A., Viker, K., Sanderson, S., Cazanave, S., McConico, A., Masuoko, H. et Gores, G. (2011). Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 301, G825–G834.

Court, F.G., Wemyss-Holden, S.A., Dennison, A.R. et Maddern, G.J. (2002). The mystery of liver regeneration. *Br J Surg.* 89(9), 1089-1095.

Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. et Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet.* 23(12), 614-622.

Duncan, A.W. et Soto-Gutierrez, A. (2013). Liver repopulation and regeneration: new approaches to old questions. *Curr Opin Organ Transplant*. 18(2), 197–202.

Egloff, S., Dienstbier, M. et Murphy, S. (2012). Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends genet*. 28(7), 333–341.

Fausto, N., Campbell, J.S. et Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45-S53.

Fu, L. et Lee, C.C. (2003). The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer* 3, 350-361.

Grunstein, M. (1992). Histones as regulators of genes. *Sci Am* 267, 68-74B.

Hernandez, N. (2001). Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *J. Biol. Chem*. 276, 26733-26736.

Higgins, G.M. et Anderson, R.M. (1931). Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol* 12, 186-202.

Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M, Parker, R. et Jensen T. H. (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413, 538-542.

Hsin, J. P. et Manley J. L. (2012).The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev*. 26, 2119-2137.

Hu, P., Wu, S., Sun, Y., Yuan, C.C., Kobayashi, R., Myers, M.P. et Hernandez, N. (2002). Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol Cell Biol*. 22, 8044-8055.

Huang, W., Ramsey, K.M., Marcheiva, B. et Bass, J. (2011). Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest*. 121(6), 2133-2141.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431(7011), 931-945.

James Faresse, N., Canella, D., Praz, V., Michaud, J., Romascano, D. et Hernandez, N. (2012). Genomic study of RNA polymerase II and III SNAPc-bound promoters reveals a gene transcribed by both enzymes and a broad use of common activators. *PLoS Genet*. 8(11), e1003028.

Julien, E. et Herr, W. (2003). Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *EMBO J.* 22(10), 2360-2369.

Khorasanizadeh S., (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116(2), 259-272.

Ko, C.H. et Takahashi, J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet.* 15(2), R271-277.

Kozak, L.P. (2012). The effects of early under-nutrition on the development of wBAT and obesity. *Adipocyte* 1:4, 265–270.

Lacoste, N. et Côté, J. (2003). Le code épigénétique des histones. *Med Sci (Paris)* 19(10), 955-959.

Latham, J. A., et Dent, S.Y. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1017-1024.

Le Martelot, G., Canella, D., Symul, L., Migliavacca, E., Gilardi, F., Liechti, R., Martin, O., Harshman, K., Delorenzi, M., Desvergne, B. et al. (2012). Genome-wide RNA polymerase II profiles and RNA accumulation reveal kinetics of transcription and associated epigenetic changes during diurnal cycles. *PLoS Biol.* 10(11), e1001442.

Lorch, Y., Beve, J., Gustafsson, C.M., Myers, L.C., et Kornberg, R.D. (2000). Mediator-nucleosome interaction. *Mol Cell* 6, 197–201.

Martin, C. et Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11, 838-849.

Maston, G.A., Evans, S.K. et Green, M.R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7, 29–59.

Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F. et Okamura, H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo*. *Science* 302(5643), 255-259.

Metzger, E., et Schule, R. (2007). The expanding world of histone lysine demethylases. *Nat Struct Mol Biol* 14, 252-254.

Michalopoulos, G.K. (2010). Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 176(1), 2-13.

Mitchell, C. et Willenbring, H. (2008). A reproducible and well-tolerated method for 2/3 hepatectomy in mice. *Nature protocols* 3(7), 1167-1170.

Morgan, D. (2007). *The cell cycle: principles of control*. (London : New Science Press Ltd.).

Mouzaki, M. et Allard, J.P. (2012). The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*, 46(6), 457-467.

Myer, V. E. et Young, R. A. (1998). RNA Polymerase II Holoenzymes and Subcomplexes. *J. Biol. Chem.* 273, 27757-27760.

Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F. et Schibler, U. (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts; cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119, 693-705.

Nevzorova, Y.A.; Tschaharganeh, D., Gassler, N., Geng, Y., Weiskirchen, R., Sicinski, P., Trautwein, C. et Liedtke, C. (2009). Aberrant cell cycle progression and endoreplication in regenerating livers of mice that lack a single e-type cyclin. *Gastroenterology* 137, 691-703.

Olins, D.E. et Olins, A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 809-814.

Orioli, A., Pascali, C., Quartararo, J., Diebel, K. W., Praz, V., Romascano, D., Percudani, R., van Dyk, L. F., Hernandez, N., Teichmann, M., et al. (2011). Widespread occurrence of non-canonical transcription termination by human RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res.* 39(13), 5499–5512.

Schibler, U. (2003). Liver regeneration clocks on. *Science* 302(5643), 234-235.

Schramm, L. et Hernandez, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 16, 2593–2620.

Sims III, R. J., Belotserkovskaya R. et Reinberg D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev.* 18, 2437-2468.

Strahl, B.D. et Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403(6765), 41-45.

Takahashi, J.S., Turek, F.W. et Moore, R.Y. (2001). *Handbook of behavioral neurobiology* 12 Circadian clocks. (New York : Kluwer Academic / Plenum Publishers).

Thomas, M.C. et Chiang, C.M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 41, 105-178.

Turner, B.M. (2005). Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol* 72,110-112.

Tyagi, S., Chabes, A.L., Wysocka, J. et Herr, W. (2007). E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell*. 27(1), 107-119.

Welsh, K.L., Yoo, S.H., Liu, A.C., Takahashi, JS. et Kay, S.A. (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol* 14, 2289-2295.

Werner, M., Thuriaux, P. et Soutourina, J. (2009). Structure-function analysis of RNA polymerases I and III. *Curr Opin Struct Biol* 6, 740-745.

Wheater, P.R., Young, B., et Heath, J.W. (2001). *Histologie fonctionnelle*. (Bruxelle : De Boeck & Larcier).

Wouters, K., van Gorp, P.J., Bieghs, V., Gijbels, M.J., Duimel, H., Lutjohann, D., Kerksiek, A., van Kruchten, R., Maeda, N., Staels, B. et al. (2008). Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48, 474–486.

Wysocka, J., Myers, M.P., Laherty, C.D., Eisenman, R.N. et Herr, W. (2003). Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev*. 17(7), 896-911.

Young, M.W., et Kay, S.A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nature Rev. Genet*. 2, 702–715.

Zargar, Z. et Tyagi, S. (2012). Role of host cell factor-1 in cell cycle regulation. *Transcription* 4, 187-192.

Zou, Y., Bao, Q., Kumar, S., Hu, M., Wang, G.Y. et Dai, G. (2012). Four waves of hepatocyte proliferation linked with three waves of hepatic fat accumulation during partial hepatectomy-induced liver regeneration. *PLoS ONE* 7(2), e30675.

