

**CARTOGRAPHIE DE NUCLÉOSOMES À DES GÈNES RÉGULÉS PAR
LE RÉCEPTEUR À LA DIOXINE (AHR)**

par

Fanny L'Héritier

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, 12 avril 2013



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-95145-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-95145-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Le 12 avril 2013

*le jury a accepté le mémoire de Madame Fanny L'Héritier
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Luc R. Gaudreau
Directeur de recherche
Département de biologie

Monsieur Benoît Leblanc
Membre
Département de biologie

Professeur Nicolas Gévry
Président rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est organisé en une structure nommée la chromatine, qui permet sa compaction dans le noyau principalement grâce à des protéines nommées les histones. Ces hauts niveaux de compaction constituent une barrière à plusieurs processus cellulaires impliquant l'ADN, tel que la transcription. Dans le laboratoire, nous nous intéressons particulièrement à la régulation de la transcription de gènes cibles de AhR, plus particulièrement des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*, dont les enzymes sont impliquées dans le métabolisme de divers polluants environnementaux.

Les travaux effectués lors de ma maîtrise sont basés sur l'hypothèse que la dynamique et le positionnement des nucléosomes vont influencer l'expression de *CYP1A1* et *CYP1B1* en réponse au TCDD. La technique de MNase-seq a permis de visualiser le positionnement putatif de nucléosomes aux promoteurs de ces deux gènes, ainsi que de comparer le positionnement de nucléosomes avant et après induction des gènes en réponse au TCDD.

À la lumière de ces résultats, peu de variations dans le positionnement de nucléosomes ont été observées aux deux gènes avant et après induction par le TCDD. Cependant, ceci n'exclut pas que des changements aient lieu, mais ils sont peut-être subtils et la technique utilisée manque de résolution pour nous permettre de les observer. Afin de vérifier les résultats de MNase-seq, nous avons utilisé d'autres techniques pour examiner le positionnement de nucléosomes à *CYP1A1* et *CYP1B1*, ainsi que la présence ou l'absence du variant d'histone H2A.Z. Des expériences de ChIPs et Mono-ChIPs ont été effectués, et les résultats obtenus à *CYP1A1* corrélaient avec ceux de MNase-seq. Cependant, ceux obtenus à *CYP1B1* ne corrélaient pas avec ceux observés en MNase-seq. En effet, on observe une perte marquée de H3 et H2A.Z aux XREs 2 et 3, ce qui suggère une perte potentielle de nucléosome(s) à cet endroit, qui n'a pas été observé avec le MNase-seq.

Les résultats générés lors de mes travaux de maîtrise procurent les premières cartes à haute résolution du positionnement de nucléosomes aux promoteurs des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*. De plus, ils renforcent davantage l'idée que des mécanismes différents sont impliqués dans la régulation de *CYP1A1* et *CYP1B1*. En effet, l'influence de la chromatine et du variant d'histone H2A.Z sur la régulation de la transcription de ces deux gènes s'exerce possiblement par des mécanismes différents, mais plus de travaux sont nécessaires pour approfondir nos connaissances sur ces mécanismes.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord sincèrement remercier mon directeur de recherche, le professeur Luc Gaudreau, d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance en me laissant réaliser des expériences sans précédent dans le laboratoire. Cette expérience m'a permis de m'épanouir autant au point de vue académique que personnel. Je tiens à remercier tout particulièrement ma famille qui m'a soutenue inconditionnellement depuis le tout début de mes études, et sans eux je ne me serais pas rendue jusqu'ici! Ils ont toujours été présents, et m'ont encouragée et rassurée pendant les moments les plus difficiles. Bien sûr, je dois aussi remercier tous les membres du laboratoire Gaudreau, passés et présents, qui ont grandement contribué à rendre cette expérience des plus agréables. J'ai eu la chance de côtoyer ces gens dynamiques et passionnés, et ce, dans un climat d'entraide et de camaraderie. Un petit clin d'œil spécial à Maud et Liette pour toutes ces heures d'activités extracurriculaires passées au gym à faire du step! Un gros merci également à toutes les personnes qui m'ont aidée à surmonter ma peur de l'informatique et qui m'ont épaulée pendant cette période : Maud Marques pour son énorme soutien et son encadrement, Alexei Nordell Markovits pour son expertise et sa patience, Mylène Brunelle pour son expérience et sa compréhension, Sébastien Rodrigue pour ses connaissances, et Rachade Hmamouchi et Pierre-Étienne Jacques pour les discussions enrichissantes.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1. La transcription génique eucaryote.....	1
1.1 Structure d'un gène codant pour une protéine.....	1
1.2 La machinerie transcriptionnelle.....	2
1.2.1 L'ARN polymérase II.....	3
1.2.2 Les facteurs généraux de transcription.....	3
1.2.3 Le Médiateur.....	4
1.2.4 Les régulateurs et corégulateurs transcriptionnels.....	5
2 Le récepteur Aryl Hydrocarbène.....	6
2.1 Mécanisme d'action.....	6
2.2 Les ligands de AhR.....	7
2.2.1 Ligands exogènes.....	7
2.2.2 Ligands endogènes.....	8
2.3 Les gènes de la famille des cytochromes P450.....	9
2.3.1 Rôle des CYP1s dans le métabolisme de l'œstrogène.....	10
2.4 Interaction croisée entre AhR et ER α	11
3 La chromatine.....	13
3.1 Mécanismes de remodelage de la chromatine.....	15
3.1.1 Complexes de remodelage ATP-dépendants.....	15
3.1.2 Les variants d'histones.....	16

3.1.2.1	Le variant H2A.Z.....	18
3.1.3	Modifications post-traductionnelles des histones.....	20
3.1.3.1	La distribution des modifications post-traductionnelles à travers le génom.....	22
4	Le positionnement de nucléosomes.....	24
4.1	L'organisation des nucléosomes aux gènes.....	24
4.2	Facteurs qui influencent le positionnement des nucléosomes.....	26
4.2.1	La préférence intrinsèque des histones pour des séquences d'ADN précises.....	26
4.2.2	Le positionnement statistique des nucléosomes.....	27
4.2.3	Les complexes de remodelage de la chromatine.....	28
4.3	Influence du variant H2A.Z sur le positionnement de nucléosomes.....	29
4.4	Positionnement de nucléosomes et régulation de l'expression génique.....	30
4.5	Techniques de positionnement de nucléosomes.....	31
5	Description du projet de recherche.....	33
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		34
2.1	Culture cellulaire et traitements.....	34
2.2	Transcription inverse et PCR quantitatif.....	34
2.3	Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	35
2.4	Digestions MNase couplé à l'immunoprécipitation de la chromatine (Mono-ChIP).....	36
2.5	Digestions MNase pour le MNase-seq.....	39
2.6	MNase-seq et analyses bio-informatiques.....	39
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....		41
3.1	Conditions expérimentales et analyses bio-informatiques.....	41
3.2	Positionnement de nucléosomes aux promoteurs de <i>CYP1A1</i> et <i>CYP1B1</i>	46
3.3	Modulation du positionnement de nucléosomes aux gènes <i>CYP1A1</i> et <i>CYP1B1</i> suite à leur induction par le TCDD.....	48

3.4 Vérification du positionnement des nucléosomes aux promoteurs de <i>CYP11A1</i> et <i>CYP11B1</i> , en présence ou en absence du variant H2A.Z.....	50
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	54
CONCLUSION.....	56
PERSPECTIVES.....	61
BIBLIOGRAPHIE.....	62

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : Adénine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AhR : Aryl hydrocarbon receptor
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
Arnt : AhR nuclear translocator
ATP : Adénosine-5'-triphosphate
C : Cytosine
ChIP : immunoprécipitation de la chromatine
CHUS : Centre Hospitalier de l'Université de Sherbrooke
CO₂ : dioxyde de carbon
CTD : Carboxy terminal domain
CYP : enzymes de la famille des cytochromes P450
DIM : 3,3'-diindolylmethane
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
E2 : estradiol
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA : acide éthylène glycole tétra-acétique
ER α : Estrogen Receptor α
FBS : Fetal bovine serum
FISH : Fluorescent In-Situ Hybridation
G : Guanine
hrs : heures
HAH : Hydrocarbones aromatiques halogénés
HATs : Histone acétyltransférase
I3C : Indole-3-carbinol
K : lysine
Kb : kilo base
L : litre
M : molaire
MCF7 : Michigan Cancer Foundation-7
mg : miligramme
min : minutes
mL : mililitre

mM : milimolaire
MNase : nucléase micrococcale de *S. aureus*
ng : nanogramme
nm : nanomètre
nM : nanomolaire
pb : paires de bases
PAH : Hydrocarbones aromatiques polycycliques
PBS : Phosphate buffred saline
PCB : Polychlorobiphényles
PCR : Polymerase chain reaction
PMSF : phenylmethanesulfonylfluoride
Pol II : ARN polymérase II
q-PCR : PCR quantitatif ou en temps réel
RT : Reverse transcription
SDS : dodécylsulfate de sodium
SRCAP : SWI2/SNF2-related CBP activator protein
T : Thymine
TBP : TATA-binding protein
TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
Tris : trishydroxyméthylaminométhane
TSS : Transcription start site
U : unité d'enzyme
XRE : Xenobiotic Response Element
°C : degrés Celsius

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Tableau 1.1 : Facteurs généraux de transcription et leurs fonctions.....	4
---	---

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau 2.1 : Amorces utilisées pour le RT-qPCR.....	35
---	----

Tableau 2.2 : Anticorps utilisés pour les expériences de ChIPs et Mono-ChIPs.....	37
--	----

Tableau 2.3 : Amorces utilisées pour les ChIPs.....	37
--	----

Tableau 2.4 : Amorces utilisées pour les Mono-ChIPs.....	38
---	----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

- Figure 1.1** : Voie de signalisation de AhR6
- Figure 1.2** : Représentation schématisée de la région 5' commune de *CYP1A1* et *CYP1A2*.....9
- Figure 1.3** : L'organisation de l'ADN à la chromatine ainsi que les différents niveaux de compaction de la chromatine.....14
- Figure 1.4** : Distribution de diverses modifications post-traductionnelles d'histones à un gène humain transcrit.....23
- Figure 1.5** : Schéma représentant la distribution consensus des nucléosomes autour des gènes chez *S.cerevisiae*.....25
- Figure 1.6** : Représentation schématisée des séquences d'ADN favorisant la formation de nucléosomes à la surface de l'octamère d'histone.....27
- Figure 1.7** : Schéma illustrant le positionnement statistique.....28

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

- Figure 3.1** : Patrons de digestions MNase de la chromatine de cellules MCF7.....41
- Figure 3.2** : Le TCDD induit l'expression de CYP1s et le recrutement de AhR dans les cellules MCF7.....43
- Figure 3.3** : Capture d'écran de graphiques généré par FastQC et SAMstat lors de la vérification de la qualité des séquences obtenues après le séquençage.....44
- Figure 3.4** : Modèle généré par le programme MACS qui estime la taille moyenne des fragments séquencés.....45

Figure 3.5 : Positionnement putatif de nucléosomes.....	46
Figure 3.6 : Comparaison du positionnement de nucléosomes entre deux conditions.....	48
Figure 3.7 : Expériences de ChIPs au promoteur de <i>CYP1A1</i>	50
Figure 3.8 : Expériences de ChIPs au promoteur de <i>CYP1B1</i>	51
Figure 3.9 : Mono-ChIPs dans la région promotrice de <i>CYP1A1</i>	52
Figure 3.10 : Mono-ChIPs dans la région promotrice de <i>CYP1B1</i>	53

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Nos cellules sont continuellement engagées dans des processus biologiques tels que : la prolifération, la différenciation, la sénescence et la mort cellulaire (apoptose, autophagie ou nécrose). C'est une régulation différentielle de l'expression des gènes contenus dans chaque cellule, combinée à un contrôle finement orchestré par des signaux intrinsèques et extrinsèques, qui rendent ces processus cellulaires possibles et si fascinants. Ce sont également des dysfonctionnements au niveau de l'expression des gènes qui peuvent mener à l'apparition de diverses maladies, telle que le cancer.

1. La transcription génique eucaryote

La transcription génique consiste à produire un brin d'ARN complémentaire à un brin matrice d'ADN. Bien qu'il existe différents types de gènes transcrits par différentes ARN polymérases chez les eucaryotes, nous nous concentrerons plus particulièrement sur les gènes codants pour des protéines qui sont transcrits par l'ARN polymérase II en ARN messager (ARNm).

1.1 Structure d'un gène codant pour une protéine

Chez les eucaryotes, les gènes codant pour des protéines sont composés d'une région codante ainsi que d'une région régulatrice. La région codante contient l'information qui sera traduite en protéine. La région promotrice, qui est une région régulatrice, est composée du promoteur basal, proximal et distal (Maston *et al.*, 2006). Le promoteur basal peut contenir, entre autres, un motif initiateur (Inr), un élément de reconnaissance de TFIIB (BRE) et un élément de

promoteur en aval (DPE). Environ 10% des gènes contiennent une boîte TATA canonique, qui sert à la liaison de TBP (voir Tableau 1.1). Il est le site d'assemblage des facteurs généraux de transcription, où se forme le complexe de pré-initiation de la transcription (PIC). Il définit le site d'initiation de la transcription (TSS), ainsi que la direction de la transcription. Le promoteur proximal, situé immédiatement en amont du promoteur basal, contient des sites de liaison pour des facteurs de transcription ainsi que des corégulateurs. Le promoteur distal, qui peut se situer jusqu'à 10 Kb du TSS, contient des éléments similaires au promoteur proximal, mais va agir sur de très longues distances, et il inclut des amplificateurs, des silenceurs, des insulateurs et des LCR (locus control regions) (Maston *et al.*, 2006).

La composition d'un promoteur eucaryote est complexe, puisqu'il peut contenir une multitude d'éléments régulateurs. Cette complexité est encore plus flagrante lorsqu'on considère que le génome humain code pour ~22,000-23,000 gènes et que chacun d'eux possède un patron d'expression unique. Ce sont justement ces éléments régulateurs présents à chaque promoteur qui, combinés, confèrent un aussi grand contrôle de la régulation de la transcription et qui augmentent de façon exponentielle les possibilités de patron d'expression unique de chaque gène (Maston *et al.*, 2006). La transcription est contrôlée par un ensemble de protéines régulatrices appelé la machinerie transcriptionnelle.

1.2 La machinerie transcriptionnelle

La machinerie transcriptionnelle eucaryote est composée de tous les effecteurs importants pour la transcription, soit : l'ARN polymérase II, les facteurs généraux de transcription, le Médiateur, et les régulateurs et corégulateurs transcriptionnels.

1.2.1 L'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II (pol II) est composée de 12 sous-unités, qui sont nommées Rpb1 à Rpb12. La plus grosse sous-unité, Rpb1, possède l'activité enzymatique catalytique du complexe. Le domaine carboxy-terminal de Rpb1, nommé CTD, est unique à cette polymérase et est composé de répétitions en tandem d'un heptapeptide dont la séquence consensus est YSPTSPS. La séquence de l'heptapeptide est extrêmement bien conservée chez les eucaryotes, mais le nombre de répétitions varie d'un organisme à l'autre, avec 26 copies chez la levure, 42 copies chez *Drosophila* et 52 copies chez l'humain (Dahmus, 1996). Il a été montré que la phosphorylation de résidus sérine du CTD constitue un point de contrôle important dans la régulation de la transcription. L'ARN pol II est donc présente sous au moins deux formes, soit hypophosphorylée et hyperphosphorylée. La forme hypophosphorylée de l'ARN pol II est associée à la formation du PIC au promoteur d'un gène, tandis que la forme hyperphosphorylée est majoritairement associée avec la phase d'élongation de l'ARNm et est retrouvée dans les régions codantes (Dahmus, 1996). La phosphorylation des sérines 2 et 5 de l'heptapeptide du CTD est d'une importance particulière. La phosphorylation de la sérine 5 par CDK7 (associé à TFIIF) suivant l'assemblage du PIC permet l'initiation de la transcription et par la suite le recrutement des enzymes guanyltransférases qui coiffent les ARNm nouvellement synthétisés. La phosphorylation de la sérine 2, par entre autres CDK9 (associé à P-TEFb), entraîne le recrutement et la liaison de différents facteurs impliqués dans la maturation de l'extrémité 3' des ARNm lors de l'élongation (Phatnani et Greenleaf, 2006).

1.2.2 Les facteurs généraux de transcription

Les facteurs généraux de transcription, soit TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIF, ont été isolés pour la première fois dans le laboratoire du professeur Robert G. Roeder dans des cellules de mammifères (Matsui *et al.*, 1980). Ces facteurs n'ont pas tous la capacité de cibler

des séquences spécifiques d'ADN et sont utilisés afin d'assister à l'ancrage et au largage de l'ARN pol II aux sites d'initiation de la transcription. La fonction de chacun est résumée dans le Tableau 1.1 ci-dessous.

Tableau 1.1 : Facteurs généraux de transcription et leurs fonctions (adapté de (Thomas et Chiang, 2006).

Facteur	Composition protéique	Fonction
TFIIA	p35 (α), p19 (β) et p21 (γ)	Stabilise la liaison de TBP à la TATA
TFIIB	p33	Stabilise le complexe TBP-TATA, sélectionne le site d'initiation de la transcription et recrute le complexe pol II/TFIIF
TFIID	TBP + TAFs (TAF1-TAF14)	Impliqué dans la sélection et liaison du site d'assemblage du PIC
TFIIE	p56 (α) et p34 (β)	Permet le recrutement de TFIIF
TFIIF	RAP30 et RAP74	Lie l'ARN pol II et stabilise le PIC
TFIIH	p89/XPB, p80/XPD, p62, p52, p44, p40/CDK7, p38/Cyclin H, p34, p32/MAT1 et p8/TFB5	Activité kinase et permet l'ouverture de la bulle de transcription au niveau du promoteur grâce à son activité hélicase

1.2.3 Le Médiateur

Le Médiateur est un complexe multiprotéique, initialement identifié chez la levure, qui joue un rôle clé dans l'activation de la transcription. C'est un coactivateur qui fait le pont entre les activateurs, la machinerie transcriptionnelle et le promoteur. Le Médiateur est recruté aux promoteurs par la liaison d'un activateur à son site de liaison de l'ADN. Chez l'humain, ce complexe est composé d'environ 30 sous-unités, mais la composition peut varier selon les sources et les méthodes de purification du complexe. Ces différentes sous-unités sont

nécessaires pour permettre l'assemblage du PIC aux séquences régulatrices, en plus de participer au recrutement d'activateurs ou de répresseurs (Malik et Roeder, 2010). Plusieurs études ont attribué au médiateur des rôles au niveau de l'initiation de la transcription et des études structurales montrent qu'il peut interagir avec le CTD de l'ARN pol II, en plus d'adopter diverses conformations selon l'activateur présent. Le Médiateur, autant chez la levure que chez les eucaryotes supérieurs, peut également induire la transcription basale *in vitro* (Conaway et Conaway, 2011).

1.2.4 Les régulateurs et corégulateurs transcriptionnels

L'ARN pol II ainsi que les facteurs généraux de transcription sont suffisants pour initier la transcription basale, mais des protéines appelées activateurs permettent d'induire la transcription de sous-groupes de gènes spécifiquement. Les activateurs sont des protéines modulaires qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine d'activation qui leur permettent d'interagir avec différentes composantes de la machinerie transcriptionnelle afin de stimuler le taux de transcription des gènes cibles. Suite à leurs liaisons au niveau de leurs séquences d'ADN spécifiques, les activateurs vont stimuler la transcription. Les répresseurs, pour leur part, vont réguler négativement la transcription de gènes. Les activateurs et les répresseurs peuvent réguler l'expression de gènes de plusieurs manières : stabiliser ou bloquer la liaison de l'ARN pol II à l'ADN; catalyser directement ou indirectement l'acétylation ou la déacétylation des histones; et recruter des coactivateurs et corépresseurs.

Les corégulateurs de la transcription sont des protéines qui interagissent avec des facteurs de transcription afin d'activer (coactivateurs) ou réprimer (corépresseurs) la transcription de gènes spécifiques. Les corégulateurs peuvent modifier la chromatine en rendant l'ADN plus ou moins accessible pour la transcription. Parmi les corégulateurs, on retrouve des enzymes qui modifient post-traductionnellement les histones, tel que des : histones acétyl transférases, histones déacétylases, histones méthyl transférases, etc. On retrouve également des enzymes

de modification de l'ADN, tel que des ADN méthyl transférase, ainsi que des enzymes de remodelage de la chromatine, tel que SWI/SNF, IWSI, RSC, etc. On retrouve également des protéines qui n'ont pas d'activité enzymatique, mais qui servent de pont entre des facteurs de transcription et d'autres corégulateurs.

2. Le récepteur Aryl Hydrocarbone

2.1 Mécanisme d'action

Le récepteur aryl hydrocarbone (AhR) est majoritairement connu comme étant un important régulateur de la réponse cellulaire face à des substances xénobiotiques. C'est un facteur de transcription appartenant à la famille basiques hélice-loop-hélice/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS)

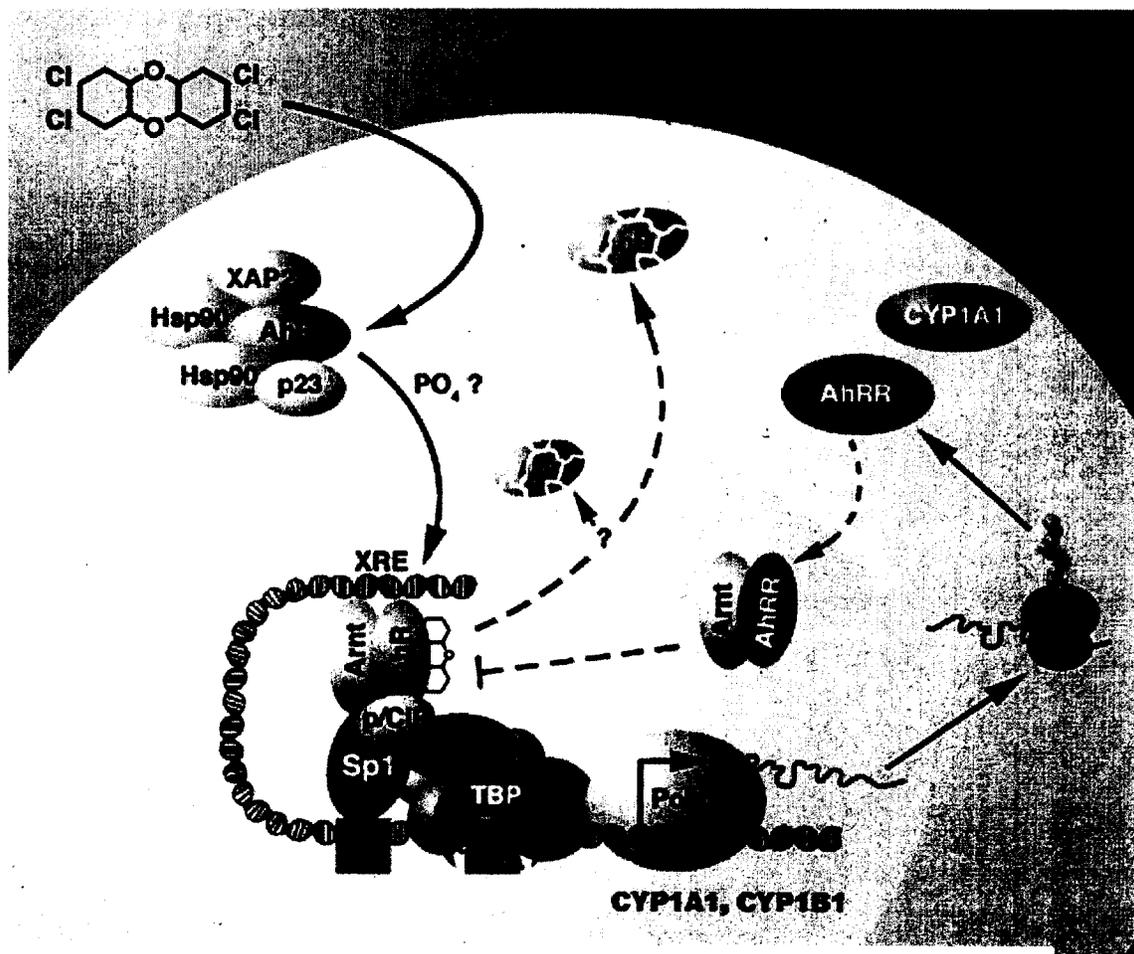


Figure 11 • Voie de signalisation de AhR (Gracieuseté de Benoît Leblanc)

(Hankinson, 1995). Il est maintenu inactif dans le cytoplasme en complexe avec les chaperonnes HSP90-XAP2-p23 (Kazlauskas *et al.*, 2001). Suite à la liaison d'un ligand, AhR est activé et est transloqué au noyau où il va se dimériser avec son partenaire Arnt (AhR nuclear translocator), celui-ci faisant également partie de la famille des bHLH/PAS (Hankinson, 1995; Mimura et Fujii-Kuriyama, 2003) (Figure 1.1). Ce complexe AhR/Arnt peut ensuite se lier spécifiquement à des séquences d'ADN régulatrices nommées XREs (xenobiotic response element), qui se caractérisent par le motif suivant : 5'-TNGCGTG-3' (Denison *et al.*, 1988). Ces XREs se retrouvent au promoteur des gènes cibles de AhR (Nebert et Gonzalez, 1987). Parmi ceux-ci figurent des enzymes de la famille 1 des cytochromes P450 (CYP), soit CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1, qui sont les plus étudiés (Kumar *et al.*, 1987) (voir la section 2.3).

2.2 Les ligands de AhR

2.2.1 Ligands exogènes

Les ligands de AhR les mieux caractérisés à ce jour se regroupent dans les classes suivantes : les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAHs), tels que le TCDD, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs) et les biphényles polychlorés (PCBs) (Poland et Glover, 1977). Tous ces produits sont presque exclusivement produits par l'activité humaine (procédés industriels et de combustion)(Marinkovic *et al.*, 2010). Le TCDD est le ligand le plus utilisé pour étudier AhR, car celui-ci induit fortement l'expression de ses gènes cibles et possède une très forte affinité pour AhR, mais c'est aussi le plus toxique de tous. Des études effectuées sur des souris dépourvues de AhR ont montré que celles-ci étaient insensibles aux effets néfastes du TCDD, ce qui implique qu'ils sont dépendant de AhR (Linden *et al.*, 2010).

Une autre source de ligands de AhR provient de notre alimentation. Plusieurs composés naturels ont été identifiés comme pouvant activer la voie de signalisation de AhR, dont les flavonoïdes, les caroténoïdes, le curcumin, etc. (Nguyen et Bradfield, 2008; Stejskalova *et al.*, 2011). Dans le laboratoire, nous utilisons également le DIM, un dérivé non toxique de l'I3C retrouvé dans les crucifères, qui a fait l'objet de plusieurs études pour ses propriétés anticancéreuses (Aggarwal et Ichikawa, 2005). Il existe également plusieurs pesticides utilisés en agriculture qui possèdent une structure similaire au TCDD. L'équipe de Kojima a vérifié *in vitro* l'activité agonistique pour AhR de 200 pesticides à l'aide de gènes rapporteurs et certains sont capables d'activer AhR (Kojima *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 2008).

2.2.2 Ligands endogènes

Le rôle de AhR dans nos cellules dépasse la simple liaison et l'élimination de substances xénobiotiques. Dans le but de dévoiler une fonction endogène de AhR qui n'est pas reliée à la détoxification, les recherches pour trouver des ligands endogènes de AhR ce sont intensifiés au cours des dernières années. L'implication de AhR à été montré entre autre dans : le développement, la reproduction et le système immunitaire. Des molécules synthétisées par nos cellules ce sont avérées être capable d'activer AhR et ceux-ci incluent : des indigos, des métabolites de l'hème, des métabolites de l'acide arachidonique, des eicosanoïdes et des dérivés de tryptophane (Denison et Nagy, 2003; Nguyen et Bradfield, 2008; Stejskalova *et al.*, 2011). Une étude récente a démontré que le L-kynurenine, un catabolite du tryptophane qui est produit de manière constitutive par des cellules tumorales, active AhR et leur permet de survivre et d'échapper au système immunitaire (Opitz *et al.*, 2011).

2.3 Les gènes de la famille des Cytochromes P450

Les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (CYPs) sont des enzymes que l'on retrouve autant dans les bactéries, les plantes que les humains (Nelson *et al.*, 1996), ce qui laisse supposer que leurs fonctions sont cruciales pour avoir été conservées au cours de l'évolution. Ces enzymes sont impliquées dans le métabolisme oxydatif d'hormones stéroïdiennes, acides gras, prostaglandines, métabolites de plantes, etc. (Ortiz de Motellano, 1995). Elles sont également impliquées dans le métabolisme de divers médicaments et plusieurs polluants environnementaux, tel que les dioxines et les pesticides. Le métabolisme de ces diverses substances peut être divisé en deux étapes, soit les réactions de phase I, qui ajoutent un atome d'oxygène au substrat, et celles de phase II, qui utilisent cet oxygène comme site de métabolisation subséquent (Hankinson, 1995). Or, les CYPs représentent environ 70-80% de toutes les enzymes responsables des réactions de la phase I (Evans, 1999). Chez les mammifères, il existe 18 familles de gènes CYPs. Les membres de la famille *CYP1* (*CYP1A1*, *CYP1A2* et *CYP1B1*), qui sont régulés par AhR, font l'objet de beaucoup d'études depuis les dernières années et seront d'intérêt primordial pour la suite de ce mémoire. *CYP1A2* est exprimé de manière constitutive dans le foie et métabolise principalement les amines hydrophiles. L'expression de *CYP1A1* n'est pas constitutive et peut être induite dans divers tissus et organes extrahépatiques, tel que le sein (Kimura *et al.*, 1986). Les loci des gènes

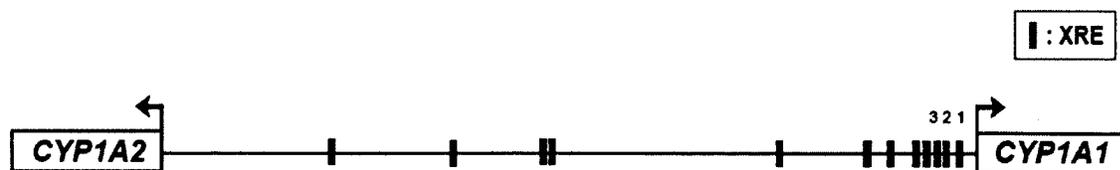


Figure 1.2 : Représentation schématisée de la région 5' commune de *CYP1A1* et *CYP1A2*.

CYP1A1 et *CYP1A2* sont situés sur le chromosome 15q22 chez l'humain (Jaiswal *et al.*, 1987) et les deux gènes sont situés à 23 kb l'un de l'autre, orientés en direction opposée avec une région 5' commune (Corchero *et al.*, 2001) (Figure 1.2). *CYP1A1* possède au moins 12 XREs

connus dans cette région 5' (Kubota et al., 1991), mais le XRE-3 semble le plus important lors de l'activation transcriptionnelle du gène induite par AhR. Le locus du gène *CYP1B1* chez l'humain est situé sur le chromosome 2p21-22 et son expression est élevée dans divers tissus extrahépatiques, notamment dans le sein, les ovaires et l'utérus. De plus, *CYP1B1* possède 9 XREs dans sa région 5' (Tang et al., 1996), ainsi que deux motifs de liaison du récepteur à l'estrogène (ERE), qui permettent son expression en présence d'œstradiol (Tsuchiya et al., 2004).

2.3.1 Rôle des CYP1s dans le métabolisme de l'œstrogène.

Dans des cellules épithéliales de la glande mammaire ainsi que des cellules tumorales du sein, des niveaux d'ARNm de *CYP1A1* et *CYP1B1* sont détectables (Spink et al., 1998). De façon intéressante, en plus de leurs fonctions détoxifiantes, ces deux enzymes sont aussi impliquées dans le métabolisme de certaines hormones stéroïdiennes, tel que le 17β -œstradiol (E_2) (Tsuchiya et al., 2005). *CYP1A1* convertit majoritairement l' E_2 en 2-hydroxyœstradiol (2-OHE₂), tandis que *CYP1B1* le convertit majoritairement en 4-hydroxyœstradiol (4-OHE₂) (Martucci et Fishman, 1993; Spink et al., 1998; Tsuchiya et al., 2005). Or, le 4-OHE₂ est un des métabolites de l' E_2 le plus génotoxique, car il génère des radicaux libres et induit des dommages à l'ADN (Liehr and Ricci, 1996), ce qui fait de *CYP1B1* un marqueur potentiel de développement tumoral mammaire chez l'humain (Murray et al., 1997). Au contraire, le 2-OHE₂ est non-carcinogène et aurait plutôt des effets d'inhibiteurs de croissance tumorale. Suite à ces observations, il a été proposé que le ratio entre les enzymes *CYP1A1/CYP1B1* et les métabolites 2-OHE₂/4-OHE₂ pouvait avoir un rôle dans l'initiation du cancer du sein (Coumoul et al., 2001).

2.4 Interaction croisée entre AhR et ER α

Plusieurs études ont montré des interactions croisées entre AhR et plusieurs voies de signalisation, incluant : NF- κ B (Kim *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 1999), Nrf2 (Hayes *et al.*, 2009), Rb/E2F (Puga *et al.*, 2000), et Sp1 (Wang *et al.*, 1999), ainsi que des récepteurs nucléaires tel que le récepteur aux androgènes (Ohtake *et al.*, 2007), et les récepteurs aux estrogènes (ER α et ER β) (Beischlag et Perdew, 2005; Matthews *et al.*, 2005; Ohtake *et al.*, 2007; Ohtake *et al.*, 2003; Wormke *et al.*, 2003).

ER α est un facteur de transcription à doigts de zinc qui fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, plus particulièrement des récepteurs stéroïdiens. Tout comme AhR, ER α peut être activé suite à la liaison d'un ligand, principalement l'E₂, puis va être transloqué au noyau pour lier des séquences d'ADN spécifiques, appelées ERE (estrogen responsive elements) lui permettant de réguler l'expression de ses gènes cibles. La majorité des travaux effectués sur les interactions entre AhR et ER α portent sur la répression de l'expression des gènes cibles de ER α par AhR, et au moins trois mécanismes ont été proposés pour l'expliquer. Premièrement, AhR et ER α interagissent avec plusieurs facteurs de transcription et coactivateurs communs afin de moduler l'activation transcriptionnelle (Kobayashi *et al.*, 1997; Kumar et Perdew, 1999; Kumar *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 1999). Conséquemment, lors de l'activation simultanée des deux voies de signalisation, AhR et ER α sont en compétition pour le recrutement des mêmes coactivateurs aux promoteurs de leurs gènes cibles. Deuxièmement, AhR peut réprimer l'expression de certains gènes cibles de ER α en se liant aux XREs présents dans leurs promoteurs (Krishnan *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2001), appelés des iXRE (inhibitory XRE) (Duan *et al.*, 1999; Gillesby *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 2001). Troisièmement, l'activation de AhR augmente la dégradation de ER α par la voie de l'ubiquitine-protéasome (Harris *et al.*, 1990; Wormke *et al.*, 2003). De plus, AhR peut entraîner la dégradation de ER α en s'associant à un complexe E3 ubiquitine ligase (Ohtake *et al.*, 2007).

L'étude du rôle de ER α dans la régulation de l'expression des gènes cibles de AhR est beaucoup moins étudiée et présente de nombreuses contradictions entre les laboratoires. Plusieurs équipes, incluant notre laboratoire, observent l'induction de l'expression de *CYP1A1* par le TCDD, et une diminution de cette induction lors de co-traitements avec le TCDD et l'E₂ (Beischlag et Perdew, 2005; Kharat et Saatcioglu, 1996; Kietz *et al.*, 2009). Cependant, d'autres équipes ont observé au contraire que la présence des deux ligands augmente l'expression de *CYP1A1* (Matthews *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2000). Dans notre laboratoire, un mécanisme impliquant le variant d'histone H2A.Z (voir la section 3.1.2.1) et l'ADN méthyltransférase Dnmt3b a été proposé afin d'expliquer comment ER α réprime l'expression de *CYP1A1* (Marques *et al.*, 2013, en révision). Ce mécanisme montre que H2A.Z est essentiel à l'induction de *CYP1A1* uniquement dans des cellules exprimant ER α . En effet, dans ces cellules la déplétion de H2A.Z engendre une augmentation de la méthylation de l'ADN au promoteur de *CYP1A1*, ce qui affecte ces niveaux d'induction après traitement au TCDD. Des études précédentes ont montré que H2A.Z est antagoniste à la méthylation de l'ADN, ce qui supporte le mécanisme observé à *CYP1A1* (Zilberman *et al.*, 2008). De plus, en présence d'E₂ et TCDD, ER α entraîne le recrutement de Dnmt3b au promoteur de *CYP1A1*, induisant ainsi la méthylation de l'ADN au XRE-3. L'inhibition de la méthylation de l'ADN conduit à une perte de la répression de l'induction de *CYP1A1* par ER α .

De façon intéressante, la présence des deux ligands n'a pas d'influence sur les niveaux d'expression de *CYP1B1*, donc ER α réprime spécifiquement l'expression de *CYP1A1*. De plus, la présence de H2A.Z à la chromatine est essentielle pour l'induction de *CYP1A1*, mais seulement dans les cellules exprimant ER α , alors que la présence de H2A.Z est toujours importante pour l'expression de *CYP1B1*, peu importe le statut de ER α . Donc le variant H2A.Z semble avoir un rôle important dans l'expression de *CYP1B1*, qui est différent de son rôle à *CYP1A1*.

3 La chromatine

Chez les eucaryotes, l'ADN est organisé dans le noyau en une structure compacte complexe qu'on appelle la chromatine. Elle est le plus souvent composée de nucléosomes, qui eux sont composés de petites protéines (11-16 kDa) chargées positivement que l'on nomme les histones. Les nucléosomes sont formés d'octamères d'histones (deux copies de H2A, H2B, H3 et H4), autour desquelles 147 paires de bases d'ADN sont enroulées (McGhee et Felsenfeld, 1980; Thatcher et Gorovsky, 1994). L'ADN, qui fait ~ 1.65 tour autour de l'octamère d'histone, est donc partiellement accessible aux diverses protéines régulatrices, mais peut devenir plus accessible si le nucléosome est déplacé ou carrément enlevé. Il existe une cinquième histone canonique, l'histone de liaison H1, qui ne fait pas partie du nucléosome. Elle se lie proche ou directement au point d'entrée/sortie de l'ADN enroulé autour du nucléosome, ce qui stabilise la structure (Thomas, 1999). Malgré le fait que les histones n'aient pas d'homologie de séquence entre elles, leurs extrémités C-terminales possèdent une structure particulière commune qui est le motif 'histone-fold'. Ce motif, composé de trois hélices alpha, permet l'assemblage en hétérodimères des histones H3-H4 et H2A-H2B. Les extrémités N-terminales des histones font protrusion à l'extérieur du nucléosome. Elles servent de site de reconnaissance à des corégulateurs transcriptionnels, et peuvent aussi être sujettes à des modifications post-traductionnelles. Ce dernier point sera discuté plus en détail dans la section 3.1.3.

La formation de nucléosomes est la première étape d'un processus qui permet à l'ADN d'être replié en une structure beaucoup plus compacte. Il existe plusieurs niveaux de compaction de la chromatine, qui sont illustrés dans la Figure 1.3. Au premier niveau de compaction, donc sous ça forme la moins condensée, l'ADN est enroulé autour d'histones en une structure appelée collier de perles. Cette structure est à son tour compactée, avec l'aide de l'histone H1, sous la forme d'une fibre de 30nm de diamètre, qui peut elle-même être encore plus condensée

jusqu'à la structure visible la plus condensée, le chromosome métaphasique. Lors de l'interphase, la chromatine est organisée en territoires fonctionnels, soit l'euchromatine, qui apparaît décondensé lors de l'interphase et contient les gènes actifs, et l'hétérochromatine, plus dense qui ne change généralement pas d'état de compaction lors de la progression du cycle cellulaire et qui contient très peu de gènes actifs.

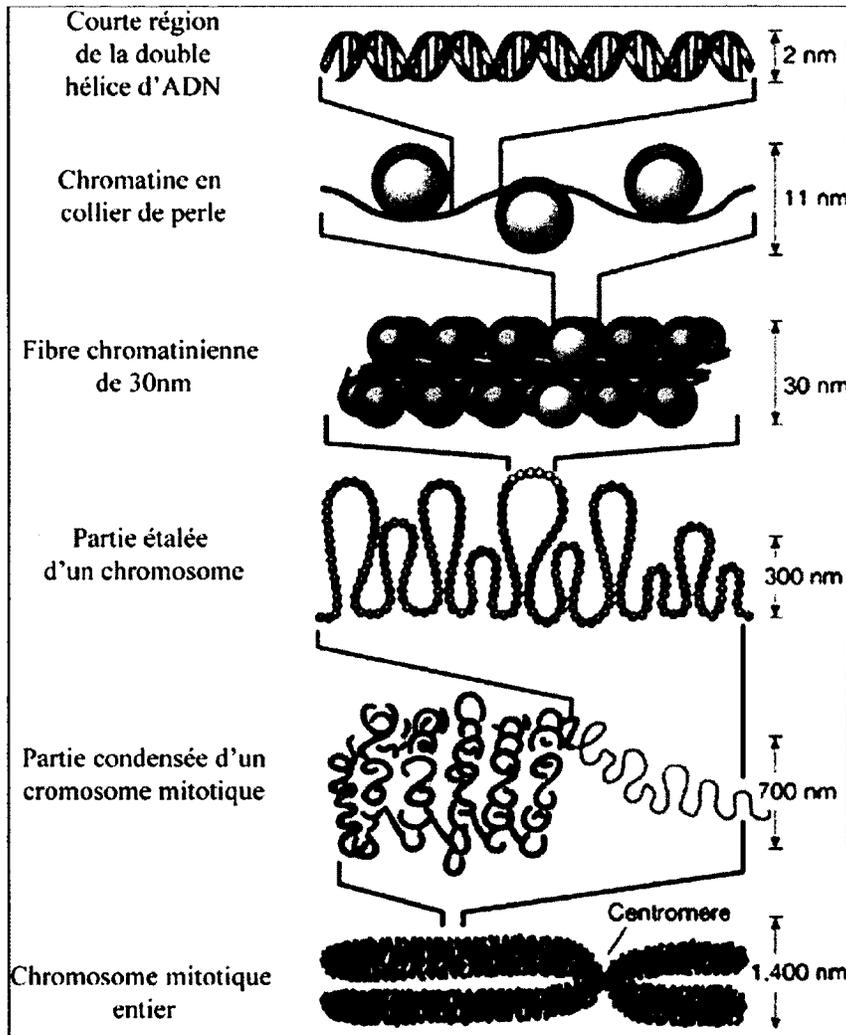


Figure 1.3 : L'organisation de l'ADN à la chromatine ainsi que les différents niveaux de compaction de la chromatine (Felsenfeld and Groudine, 2003).

3.1 Mécanismes de remodelage de la chromatine

La structure de la chromatine est dynamique puisqu'elle peut passer de l'état compacté à plus relâché à des endroits précis, ce qui contrôle finement l'expression des gènes. Les hauts niveaux de compaction de la chromatine bloquent la plupart des processus cellulaires impliquant l'ADN, que ce soit au niveau de la transcription, de la réplication, de la recombinaison ou de la réparation. Afin de remédier à ces effets négatifs, des stratégies ont été développées par nos cellules afin de remodeler la chromatine. Ces mécanismes de remodelage de la chromatine incluent : l'utilisation de complexes qui hydrolysent l'ATP pour déplacer mécaniquement les nucléosomes (Eberharter et Becker, 2004); le changement de la composition du nucléosome par l'incorporation de variants d'histones (Kamakaka et Biggins, 2005); et des modifications post-traductionnelles des histones (Kouzarides, 2007). Ces mécanismes peuvent fonctionner indépendamment les uns des autres ou conjointement afin de permettre le remodelage de la chromatine, dans le but de réguler la transcription le plus efficacement possible.

3.1.1 Complexes de remodelage ATP-dépendant

La découverte de l'existence de complexes de remodelage de la chromatine date du début des années 1990 (Hirschhorn *et al.*, 1992). Ces complexes de remodelage utilisent tous l'hydrolyse de l'ATP afin d'altérer la structure, la position ou même la composition des nucléosomes. Ils possèdent tous au moins une protéine contenant un domaine ATPase très conservé, qui appartient à la famille des hélicases DEAD/DEAH-box. On peut les classer en quatre familles : SWI/SNF (Switch/Sucrose NonFermentable), ISWI (imitation SWI), CHD (chromo-helicase/ATPase DNA binding) et INO80/SWR1 (inositol requiring 80 / SWI/SNF related protein).

Parmi les membres de la famille SWI/SNF, qui comprend les protéines BRM et BRG1, certains contiennent à leur extrémité C-terminale un bromodomaine capable de lier les queues d'histones acétylées. Le rôle principal des remodeleurs de cette famille est de désorganiser puis réorganiser le positionnement des nucléosomes afin de promouvoir l'accessibilité à divers facteurs de transcription et réguler positivement la transcription (Martens et Winston, 2003). Les protéines de la famille ISWI possèdent un domaine ATPase qui contient un domaine SANT et SLIDE à son extrémité C-terminale, qui semble impliqué dans la liaison des queues d'histones et l'ADN (Clapier et Cairns, 2009). Contrairement aux familles SWI/SNF et INO80/SWR1, ces remodeleurs semblent réguler négativement la transcription. Les protéines de la famille CHD possèdent un domaine ATPase qui contient deux chromodomaines à son extrémité N-terminale, qui servent à la reconnaissance de queues d'histones méthylées (Clapier et Cairns, 2009). C'est la famille dont la fonction est la moins bien connue. Les protéines de la famille INO80/SWR1, qui comprend les complexes INO80, SWR1, SRCAP et p400, sont uniques, car elles possèdent un domaine ATPase séparé en deux. Le complexe INO80 a un rôle plus large que les autres complexes puisqu'il participe entre autres à l'activation de la transcription et la réparation de l'ADN (Shen *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2008). Chez l'humain, les complexes p400 et SRCAP modifient la composition des nucléosomes grâce à l'hydrolyse de l'ATP afin de remplacer l'histone H2A par le variant H2A.Z aux nucléosomes dans les régions promotrices (voir la section 2.1.2.1) (Li *et al.*, 2005; Raisner *et al.*, 2005).

3.1.2 Les variants d'histones

Pourquoi nos cellules ont-elles développé des variants d'histones, surtout si l'on considère que certains ont été extrêmement bien conservés au cours de l'évolution entre les espèces? Les histones canoniques sont synthétisées uniquement lors de la réplication, puisque le besoin en histones pour compacter l'ADN nouvellement synthétisé est le plus important à ce stade. Or, la cellule a mis à sa disposition des variants d'histones, qui eux sont synthétisées tout au long

du cycle cellulaire (Kamakaka et Biggins, 2005). Ces variants auraient donc un rôle moins structurel que les histones canoniques. La majorité des gènes codant pour ses variants ont une expression finement régulée au niveau temporel ainsi qu'une expression spécifique selon le type cellulaire (Rogakou et Sekeri-Pataryas, 1999). Certains variants ont leurs propres complexes de remodelage qui permettent leur déposition à la chromatine, ainsi qu'une localisation généralement bien spécifique dans le génome. Elles vont venir modifier les propriétés des nucléosomes qui s'y trouvent et procurer des propriétés uniques à la chromatine qui les contient. Ces variants d'histones jouent différents rôles majeurs dans divers mécanismes impliquant la chromatine, et les plus connus sont mentionnés ci-dessous.

À part H4, toutes les histones canoniques ont des variants connus, et c'est H2A qui en possède le plus grand nombre. L'histone H3 possède deux variants majeurs, soit H3.3 et centromérique H3 (CenH3). La présence de H3.3 à la chromatine corrèle avec les régions transcriptionnellement actives des chromosomes (Ahmad et Henikoff, 2002). CenH3 est essentiel puisqu'il se lie aux centromères et joue un rôle dans la formation des kinétochores, qui permettent la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. L'histone H2A, quant à elle, possède quatre variants majeurs : MacroH2A, H2A-Bbd, H2A.X et H2A.Z. MacroH2A, qui fait presque trois fois la taille de H2A, est retrouvé préférentiellement au chromosome X inactif dans les cellules de mammifères femelles, et il y joue un rôle au niveau du maintien de l'hétérochromatine (Costanzi et Pehrson, 1998). H2A-Bbd (Barr body-deficient), quant à lui, est exclu du chromosome X inactif, et on le retrouve sur le chromosome X actif et les chromosomes autosomaux (Chadwick et Willard, 2001). H2A.X est distribué de manière relativement uniforme à travers le génome. Suite à des cassures d'ADN double brin, le variant H2A.X dans les nucléosomes de part et d'autre de la cassure est phosphorylé (Rogakou et Sekeri-Pataryas, 1999), ce qui coïncide avec le recrutement de protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (Paull *et al.*, 2000). La section qui suit porte davantage sur le variant H2A.Z, puisqu'il est d'intérêt pour la suite de ce mémoire.

3.1.2.1 Le variant H2A.Z

H2A.Z est un variant de l'histone canonique H2A, très bien conservé parmi diverses espèces au cours de l'évolution. C'est une protéine essentielle chez certains organismes dont *Drosophila melanogaster* (Clarkson *et al.*, 1999; van Daal et Elgin, 1992), *Mus musculus* (Faast *et al.*, 2001), *Tetrahymena thermophila* (Liu *et al.*, 1996) et *Xenopus laevis* (Iouzalén *et al.*, 1996). Ce variant n'est cependant pas essentiel à la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais sa déplétion entraîne toutefois un ralentissement de croissance ainsi que des défauts dans l'activation des gènes (Adam *et al.*, 2001; Santisteban *et al.*, 2000).

Les différentes protéines de H2A.Z retrouvées chez différents eucaryotes supérieurs montrent un degré de conservation de l'ordre de 90%, alors que l'homologie entre les séquences en acides aminés de H2A et H2A.Z n'est que de 60% (Zlatanova et Thakar, 2008). La substitution du résidu Glu104 chez H2A pour Gly106 chez H2A.Z entraîne une perte de trois liens hydrogène, ce qui pourrait entraîner une déstabilisation de l'interaction entre H3 et H2A.Z (Suto *et al.*, 2000). De plus, le dimère H2A.Z/H2B possède une région acide allongée à la surface du nucléosome, ce qui permettrait le recrutement de protéines spécifiques ou le contact avec des nucléosomes adjacents (Jensen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Lorsque comparée à un nucléosome contenant H2A, la présence de H2A.Z dans un nucléosome aurait soit un effet stabilisateur (Fan *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004; Thambirajah *et al.*, 2006) ou déstabilisateur (Abbott *et al.*, 2001; Placek *et al.*, 2005; Suto *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer en partie par l'état de la chromatine et/ou les modifications post-traductionnelles des queues des histones présentes. Un exemple de cela est l'effet combinatoire de H2A.Z et H3.3 dans le même nucléosome, qui est moins stable que des nucléosomes qui contiennent l'un ou l'autre des deux variants (Jin et Felsenfeld, 2007; Jin *et al.*, 2009). Un octamère peut contenir soit des homodimères H2A.Z-H2B/H2A.Z-H2B ou un hétérodimère H2A-H2B/H2A.Z-H2B. Des études ont montré que ces deux formes pouvaient exister dans la chromatine *in vivo*, avec une distribution relative

évaluée à 35% et 65% de chaque forme respectivement (Luk *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2010). Ceci pourrait également venir influencer la stabilité des nucléosomes et partiellement expliquer la discordance mentionnée ci-haut.

Tel que mentionné précédemment, chez l'humain ce sont les complexes p400 et SRCAP qui sont responsables de l'incorporation spécifique de H2A.Z à la chromatine (Gevry *et al.*, 2007; Ruhl *et al.*, 2006). Plus récemment, il a été montré que le complexe de remodelage INO80 permet de remplacer un dimère H2A.Z-H2B par un dimère H2A-H2B dans un nucléosome chez la levure (Papamichos-Chronakis *et al.*, 2011), mais il reste à déterminer si c'est également le cas chez les eucaryotes supérieurs.

Il a été montré que H2A.Z joue un rôle au niveau de : la transcription génique (Santisteban *et al.*, 2000); la ségrégation des chromosomes (Rangasamy *et al.*, 2003); la réparation de l'ADN (Kalocsay *et al.*, 2009); comme barrière à l'étalement de l'hétérochromatine (Meneghini *et al.*, 2003); et dans la progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire (Dhillon *et al.*, 2006). De plus, H2A.Z, peut avoir des rôles autant positifs que négatifs en transcription (Gevry *et al.*, 2007; Gevry *et al.*, 2009).

L'étude de la distribution de H2A.Z à l'échelle du génome a été réalisée dans plusieurs organismes, mais surtout chez *S. cerevisiae* et plus récemment chez l'humain. Chez la levure, H2A.Z est distribué à travers tout le génome, mais est enrichi au promoteur des gènes, tant actif qu'inactif (Albert *et al.*, 2007; Guillemette *et al.*, 2005; Raisner *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). On retrouve ce variant dans deux nucléosomes bien précis, soit un en amont et un en aval du site d'initiation de la transcription (TSS) (Raisner *et al.*, 2005; Talbert et Henikoff, 2010). Ces nucléosomes flanquent la région dépourvue de nucléosome (NFR), ce qui supporte le rôle de H2A.Z dans la régulation de la transcription des gènes. Chez l'humain, le même enrichissement est observé en amont et en aval du TSS (Barski *et al.*, 2007), mais les niveaux semblent plutôt corrélés avec l'activité transcriptionnelle des gènes et la présence d'ARN pol

II (Hardy *et al.*, 2009; Schones *et al.*, 2008). Ce variant est également associé à d'autres régions du génome, tel que des sites de liaisons de la protéine CTCF (CCCTC-binding factor) (Millau et Gaudreau, 2011; Zlatanova et Thakar, 2008). La localisation bien caractérisée de H2A.Z aux TSSs de gènes actifs et aux amplificateurs corrèle avec la présence de H3K4 méthylé. H2A.Z s'associe également à des promoteurs régulés par le complexe Polycomb, plus précisément ceux où l'on retrouve PRC2 (Polycomb repressive complex 2) (Creyghton *et al.*, 2008). Une étude a récemment clarifié les marques associées avec la présence de H2A.Z, montrant qu'il est présent aux promoteurs ciblés par PRC2 enrichies pour H3K27me3, mais uniquement si du H3K4me3 est également présent (Ku *et al.*, 2012).

3.1.3 Modifications post-traductionnelles des histones

Les queues des histones sont sujettes à une grande variété de modifications post-traductionnelles, et huit modifications distinctes sont connues, impliquant plus de 60 sites de modifications différents sur les histones canoniques (Kouzarides, 2007). Cette vaste quantité de modifications procure un potentiel énorme pour moduler les réponses cellulaires. La majorité des modifications se produisent sur les queues N-terminales des histones, mais le cœur des histones ainsi que les queues C-terminales peuvent également être modifiées. En plus de réguler la structure de la chromatine, ces marques vont permettre le recrutement de régulateurs transcriptionnels et de complexes de remodelage de la chromatine (Bannister et Kouzarides, 2011). Les modifications covalentes les mieux caractérisées sont : la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation. Ces modifications sont effectuées sur des résidus précis pour chaque histone et sont généralement catalysées par des enzymes spécifiques de manière réversible.

La méthylation des histones, qui n'affecte pas la charge des résidus des histones, s'effectue sur les lysines, qui peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées, et les arginines, qui peuvent être

mono- et di-méthylées. Les histones méthyltransférases (HMTs) catalysent le transfert d'un groupement méthyle sur les lysines et arginines des histones. Ces enzymes sont généralement spécifiques pour les résidus modifiés ainsi que pour le degré de modification (mono-, di- et triméthylés). Elles possèdent toutes un domaine d'activité enzymatique SET, à l'exception de Dot1 (Bannister et Kouzarides, 2011). Pendant plusieurs années, la méthylation des histones était perçue comme une marque stable et irréversible. En 2004, la première lysine déméthylase catalysant l'enlèvement de groupements méthyles a été identifiée : LSD1 (Shi *et al.*, 2004). Une autre classe de lysines déméthylases contenant un domaine jumonji a été découverte en 2006 (Tsukada *et al.*, 2006). Plusieurs autres histones déméthylases ont été identifiées depuis, et elles contiennent toutes un domaine catalytique jumonji, à l'exception de LSD1. Comme les méthyltransférases, les déméthylases ont une spécificité pour leurs résidus cibles ainsi que pour les niveaux de déméthylation (Bannister et Kouzarides, 2011).

L'acétylation des lysines est extrêmement dynamique et régulée par l'action de deux familles d'enzymes, soit les histones acétyltransférases (HATs) et les histones déacétylases (HDACs). Les HATs sont les enzymes qui catalysent l'ajout d'un groupement acétyle sur des résidus lysines des histones, ce qui neutralise la charge positive des lysines. Ces enzymes sont séparées en trois familles selon leurs homologies de séquences et leurs structures conformationnelles : GNAT, CBP/p300 et MYST (Bannister et Kouzarides, 2011). Ces enzymes sont généralement associées à de gros complexes multiprotéiques, et les divers composants de ses complexes jouent des rôles importants au niveau du recrutement d'activateurs et de coactivateurs, mais aussi de l'activité et spécificité des substrats ciblés. Les HDACs eux reversent l'acétylation des lysines. Il existe quatre classes de HDACs, soit I, II, III et IV. En restaurant les charges positives des lysines, ceci entraîne potentiellement la stabilisation de la structure de la chromatine, ce qui supporte le rôle de ces enzymes en tant que corépresseurs transcriptionnels.

La phosphorylation s'effectue majoritairement sur les résidus sérines et thréonines des histones, quoiqu'elle puisse aussi avoir lieu sur des tyrosines et des histidines. Les niveaux de cette modification sont régulés par des kinases et des phosphatases, qui ajoutent et enlèvent cette modification respectivement (Bannister et Kouzarides, 2011). L'ajout d'un groupement phosphate entraîne l'addition d'une charge négative considérable à l'histone, ce qui va influencer la structure de la chromatine.

Dans un contexte de transcription, les modifications peuvent être associées avec l'activation ou la répression. En réalité, il est plus difficile de catégoriser les modifications dans l'une ou l'autre de ses deux classes, puisqu'il est probable qu'elles aient le potentiel d'activer ou réprimer la transcription, tout dépendamment du contexte. Par exemple, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 a un effet positif sur la transcription lorsque présente dans les régions codantes, mais un effet négatif lorsque présente dans les régions promotrices (Vakoc *et al.*, 2005). La méthylation des histones est une marque qui est autant associé à l'activation de la transcription, comme lorsque présente à H3K4, H3K36 et H3K79, qu'à la répression de la transcription, lorsque présente à H3K9, H3K27 et H4K20. L'acétylation des histones est presque toujours associée à l'activation de la transcription. En ce qui a trait à la phosphorylation de résidus sur les queues des histones, une association avec la transcription reste encore à être déterminée, car peu de travaux ont été effectués sur cette marque et l'expression génique. La phosphorylation des histones semble toutefois être impliquée dans la condensation de la chromatine lors de la mitose et méiose (Banerjee et Chakravarti, 2011).

3.1.3.1 La distribution des modifications post-traductionnelles à travers le génome

Il est possible de séparer l'environnement chromatinien en deux régions fonctionnelles différentes, soit l'hétérochromatine, qui est compact et transcriptionnellement peu active, et l'euchromatine, qui est transcriptionnellement active. Or chacune d'elle possède ses propres

4 Le positionnement de nucléosomes

La présomption initiale que les nucléosomes avaient pour seule fonction de compresser l'ADN à l'intérieur du noyau s'est avérée simpliste. Les nucléosomes ne sont pas statiques, mais bien dynamiques et ils adoptent différents positionnements en fonction du contexte cellulaire où ils se situent (Kamakaka et Biggins, 2005). En effet, différents gènes sont actifs dans différents tissus et à des moments distincts, ce qui va influencer le positionnement des nucléosomes à ces gènes. Tel que mentionné précédemment, les nucléosomes constituent une barrière à la liaison d'autres protéines, et leur présence est généralement associée à une inhibition de la transcription. Clarifier les mécanismes qui dictent le positionnement des nucléosomes est d'une importance capitale pour approfondir nos connaissances sur la localisation des nucléosomes, tant aux gènes actifs qu'inactifs. Le but est de mieux comprendre les mécanismes de régulation transcriptionnels dans un contexte de chromatine.

4.1 L'organisation des nucléosomes aux gènes

Les cartes de positionnement de nucléosomes à l'échelle de génomes entiers, effectuées chez divers organismes, nous ont procuré un aperçu considérable de l'organisation des nucléosomes aux gènes. Les profils de nucléosomes obtenus montrent que beaucoup de promoteurs, d'amplificateurs et de sites de terminaison de la transcription sont en réalité plus pauvres en nucléosomes que les régions avoisinantes. La majorité de ces travaux ont été réalisés chez *S. cerevisiae* et son génome nous procure l'exemple le plus clair d'un patron d'organisation consensus des nucléosomes par rapport à la structure des gènes, ce qui est illustré à la Figure 1.5. On observe un premier nucléosome situé juste en amont du TSS, désigné -1, qui peut moduler l'accessibilité de différents éléments de régulation à cette région. Juste après ce trouve fréquemment une région dépourvue en nucléosome (NFR) directement en amont du TSS. Le NFR est caractéristique de l'organisation des promoteurs retrouvés chez la majorité

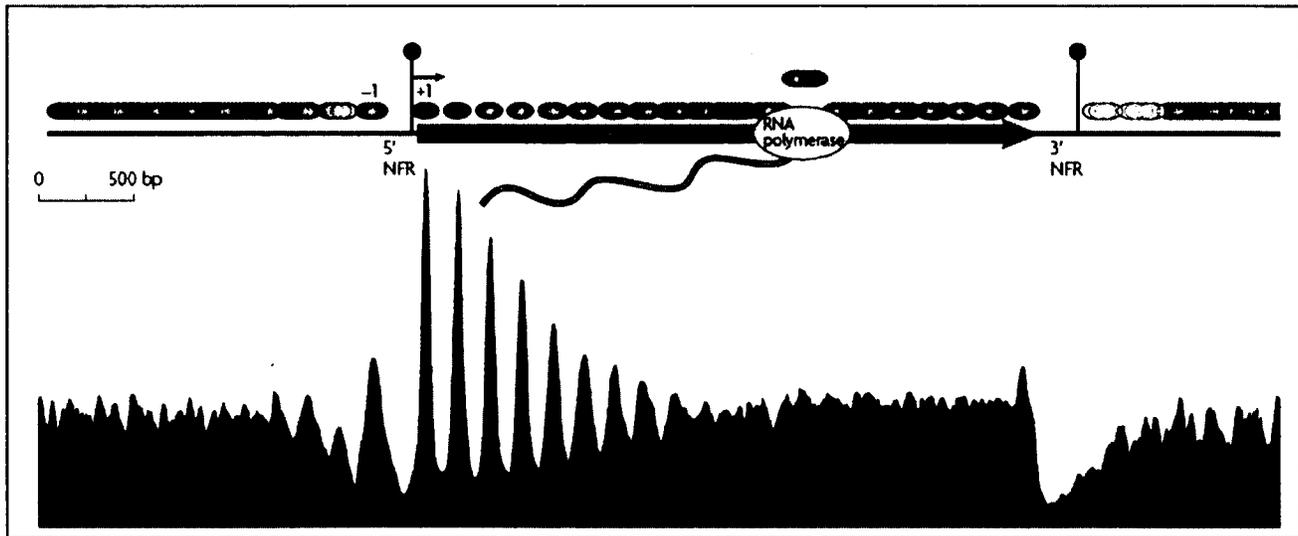


Figure 1.5 : Schéma représentant la distribution consensus des nucléosomes autour des gènes chez *S. cerevisiae* (Jiang et Pugh, 2009).

des organismes étudiés jusqu'à présent, incluant l'humain où l'on observe majoritairement des NFR au niveau des promoteurs actifs (Iyer, 2012). Ces NFR font en moyenne ~150 pb et jouent un rôle important dans la transcription en permettant la liaison de complexes protéiques à l'ADN, tel que la machinerie transcriptionnelle. Cependant, certains promoteurs semblent contenir des nucléosomes plus fragiles ou instables, caractérisés par une forte sensibilité à la MNase, qui en fait seraient retrouvés dans certaines des régions initialement identifiées comme dépourvues de nucléosomes (Xi *et al.*, 2011). Immédiatement après le NFR et le TSS, on retrouve un nucléosome désigné +1, qui possède le positionnement le plus précis comparativement aux autres nucléosomes. Le nucléosome +1 renferme souvent des variants (H2A.Z et H3.3), ainsi que des modifications post-traductionnelles d'histones (acétylation et méthylation), qui pourraient faciliter son éviction pour permettre l'assemblage du PIC lors de l'initiation de la transcription (Iyer, 2012). Les séquences en amont et en aval du TSS sont généralement occupées par des nucléosomes bien positionnés, qui perdent graduellement leur positionnement en phase plus on s'éloigne du TSS (voir la section 4.2.2). Évidemment, ce sont des généralités qui ne s'appliquent pas à tous les promoteurs, puisque par exemple certains n'ont pas de NFR (Mavrich *et al.*, 2008a). Pourtant, à la lumière de ces observations, il est

évident que l'organisation des nucléosomes n'est pas aléatoire, mais plutôt ordonnée et potentiellement orchestrée par des mécanismes qui sont présentés dans la section suivante.

4.2 Facteurs qui influencent le positionnement des nucléosomes

Il existe plusieurs facteurs qui contribuent potentiellement au positionnement des nucléosomes *in vivo*, tel que : des préférences pour des séquences d'ADN, le positionnement statistique, les complexes de remodelage de la chromatine, la compétition avec des protéines liant l'ADN, et le repliement des hauts niveaux de compaction de la chromatine (Sadeh et Allis, 2011). Les facteurs les plus étudiés sont présentés dans les sections qui suivent.

4.2.1 La préférence intrinsèque des histones pour des séquences d'ADN précises

Le positionnement des nucléosomes est au moins partiellement encodé par le génome, puisque certaines séquences d'ADN favorisent plus la formation de nucléosomes que d'autres. Les longues séquences poly(dA:dT) défavorisent fortement la formation de nucléosomes, tandis que les séquences CG riches ont souvent un haut contenu en nucléosomes (Field *et al.*, 2008; Kaplan *et al.*, 2009). Les séquences identifiées comme favorisant la formation de nucléosomes contiennent les dinucléotides AA, TT et AT répétés à chaque 10 pb, décalées de 5 pb par une autre répétition de dinucléotides GC (Jiang et Pugh, 2009). Cette composition de séquence et cette périodicité possèdent une courbature de l'ADN intrinsèque qui faciliterait l'enroulement de l'ADN autour du nucléosome. Les dinucléotides AA, TT et AT sont favorisés lorsque le sillon mineur de l'ADN fait face à la surface du nucléosome, tandis que les dinucléotides GC sont favorisés lorsque le sillon mineur de l'ADN fait face à l'extérieur du nucléosome, tel que présenté à la Figure 1.6.

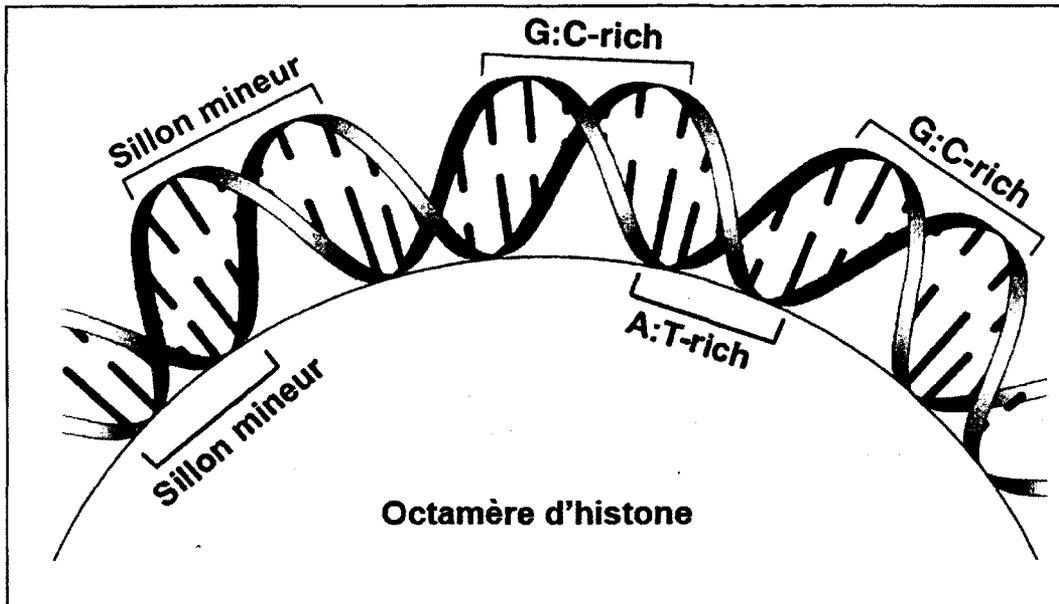


Figure 1.6 : Représentation schématisée des séquences d'ADN favorisant la formation de nucléosomes à la surface de l'octamère d'histone.

4.2.2 Le positionnement statistique des nucléosomes

Un modèle fréquemment utilisé pour expliquer comment les nucléosomes se positionnent en phase se nomme le positionnement statistique (Fedor *et al.*, 1988). Ce modèle est basé sur le positionnement précis d'un nucléosome par un élément barrière, qui force le positionnement de tous les nucléosomes suivants dans un arrangement en phase. Cet empilement serré restreindrait le mouvement des nucléosomes, d'où l'obtention de nucléosomes positionnés en phase. La position des nucléosomes deviendrait de moins en moins précise plus on s'éloigne de l'élément barrière. Ce modèle est illustré à la Figure 1.7.

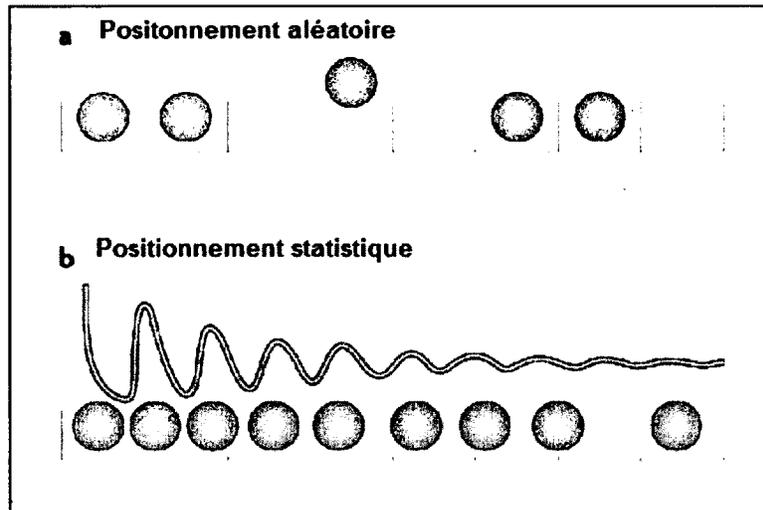


Figure 1.7 : Schéma illustrant le positionnement statistique (adapté de (Jiang et Pugh, 2009)). En a), on observe le positionnement de nucléosomes, tel qu'attendu s'il était entièrement aléatoire. En b), on observe le positionnement de nucléosomes en phase suite à l'effet d'un élément barrière à gauche, tel qu'attendu si les nucléosomes adoptent un positionnement statistique.

4.2.3 Les complexes de remodelage de la chromatine

Une différence frappante entre les profils de positionnement de nucléosomes effectué *in vitro* et *in vivo* est l'absence de distribution de nucléosomes en phase autour des NFR *in vitro*. Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant pourraient expliquer cette différence. Certains de ces complexes peuvent être recrutés afin de déplacer des nucléosomes et possiblement participer à la formation des NFR observés aux promoteurs des gènes. Une équipe a voulu comparer les patrons de nucléosomes assemblés *in vitro* à ceux obtenus *in vivo*. Ils ont montré que l'ajout d'ATP et d'extraits cellulaires totaux aux nucléosomes assemblés *in vitro* entraîne un patron de positionnement des nucléosomes fort similaire à celui *in vivo*, ce qui n'est pas le cas si des extraits cellulaires totaux sont uniquement utilisés (Zhang *et al.*, 2011). Ils favorisent l'implication de complexes de remodelage dépendant de l'ATP pour

expliquer ces observations, sans toutefois exclure la possibilité que des kinases soient également impliquées. Une autre équipe a montré que la délétion de ISW1, ISW2 et CHD1 combinés ou seulement ISW1 et CHD1 combinés résultait en une diminution significative des nucléosomes en phase en amont du promoteur, sans affecter le nucléosome +1 (Gkikopoulos *et al.*, 2011). Donc l'activité des remodeleurs ATP-dépendant de la chromatine semble bel et bien avoir un rôle dans le positionnement en phase des nucléosomes *in vivo*, mais déterminer le(s)quel(s) de ces complexes intervient et dans quel contexte reste encore à être élucidé.

4.3 Influence du variant H2A.Z sur le positionnement de nucléosomes

Des travaux précédents dans le laboratoire, dans deux organismes différents, ont montré l'implication du variant H2A.Z dans le positionnement de nucléosomes. Chez la levure au promoteur du gène *GALI*, la déplétion de H2A.Z induit un déplacement spécifique d'un nucléosome (NucC) (Guillemette *et al.*, 2005). Or, il était déjà connu que la déplétion de H2A.Z entraînait une diminution de l'induction de *GALI* (Adam *et al.*, 2001). Ces résultats montrent que H2A.Z est enrichi aux promoteurs de gènes inactifs, où il modulerait le positionnement de nucléosomes clés à des sites de régulation afin de permettre l'induction de gènes, tel que *GALI*. Dans une lignée cellulaire d'adénocarcinome de la glande mammaire humaine (MCF7), l'incorporation de H2A.Z au promoteur du gène *TFF1* permet aux nucléosomes (NucE et NucT) d'adopter un positionnement préférentiel sur l'ADN (Gevry *et al.*, 2009). En effet, la déplétion de H2A.Z empêche la stabilisation des nucléosomes NucE et NucT suite à l'induction de *TFF1*, ce qui nuit au recrutement de ER α et de ses partenaires au promoteur et empêche l'activation du gène. Ces travaux constituent donc deux exemples précis de l'influence de H2A.Z sur la structure de la chromatine. Évidemment, le repositionnement de nucléosomes engendré par la présence de H2A.Z peut avoir un effet positif sur la transcription, comme à *TFF1*, mais il est envisageable qu'un effet transcriptionnel négatif en résulte, cependant aucun exemple n'a encore été caractérisé (Marques *et al.*, 2010).

4.4 Positionnement de nucléosomes et régulation de l'expression génique

Afin de mieux comprendre le rôle de la chromatine dans son ensemble, il est essentiel de comprendre comment le positionnement de nucléosomes influence les processus cellulaires tels que la transcription. Un exemple clair du positionnement de nucléosomes et de la régulation transcriptionnelle a été observé chez la levure au promoteur du gène *PHO5* (*PHO5pr*). En conditions de fortes concentrations de phosphate, *PHO5pr* est réprimé et les nucléosomes sont bien positionnés en phase jusqu'au NFR. Le NFR est constitutif (indépendant du statut transcriptionnel du gène) et contient un site de liaison de l'activateur Pho4 (Svaren et Horz, 1997). Suite à l'activation du gène, les nucléosomes -1 à -4 sont évincés du promoteur, rendant accessible un autre site de liaison de Pho4, ce qui permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle à la boîte TATA.

Chez la levure, les gènes contenant une boîte TATA, plus souvent associés aux gènes inductibles, et ceux dépourvus de boîte TATA, plus souvent associés aux gènes constitutifs, ont un contenu en nucléosomes qui est différent. En effet, les gènes contenant une boîte TATA sont généralement plus occupés en nucléosomes (Bai et Morozov, 2010; Radman-Livaja et Rando, 2010). Les nucléosomes recouvrent la boîte TATA et le TSS, donc il n'y a pas de NFR, ce qui rend la boîte TATA inaccessible à la liaison de la protéine TBP, bloque le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Imbalzano *et al.*, 1994) et garde les niveaux de transcription faibles.

Les nucléosomes sont classiquement considérés comme des barrières à la liaison de facteurs sur l'ADN, et c'est le cas pour la majorité des facteurs de transcription. En effet, la plupart des motifs fonctionnels où se lient les facteurs de transcription *in vivo* sont situés dans des régions plus pauvres en nucléosomes, tels qu'aux NFR (Yuan *et al.*, 2005). Cependant, il y a toujours des exceptions, et les conséquences peuvent être fort intéressantes dans un contexte de

régulation génique. Par exemple, au promoteur de l'interféron β chez l'humain, un nucléosome positionné sur la boîte TATA est déplacé en aval suite à la liaison séquentielle de trois facteurs de transcription différents (Lomvardas et Thanos, 2002). La liaison d'un seul de ces facteurs de transcription au promoteur est insuffisante pour activer le gène, puisque chacun a un rôle dans le recrutement de différents facteurs nécessaire au déplacement du nucléosome. De plus, des travaux viennent remettre en question les évidences que la présence de nucléosomes bloque la transcription. Au promoteur du gène *U6* chez l'humain, la présence d'un nucléosome entre deux sites de liaison pour Oct1 et SNAPc rapproche physiquement ces deux sites en enroulant l'ADN entre les deux. Ceci facilite l'interaction physique entre les deux facteurs de transcription, ce qui est nécessaire à l'initiation de la transcription du gène (Zhao *et al.*, 2001). Donc, la présence de nucléosomes aux promoteurs ne ferait pas que simplement bloquer des sites de liaison de facteurs de transcription; les mécanismes semblent beaucoup plus complexes qu'initialement décrits. À la lumière de ces résultats, il est évident que plus d'études sont nécessaires afin de mieux évaluer le rôle des nucléosomes et de leurs positionnements sur la régulation de l'expression génique.

4.5 Techniques de positionnement de nucléosomes

Il existe depuis longtemps différentes techniques qui permettent de déterminer le positionnement de nucléosomes à des séquences d'ADN précises. Ces techniques varient de hautes résolutions (ex : MNase-seq et LM-PCR) à moyennes et faibles résolutions (ex : 'indirect end-labelling' et Mono-ChIP). Des études pionnières utilisant des puces à ADN avec des sondes se chevauchant ont procuré une vision globale à l'échelle de génome entier du positionnement des nucléosomes, renouant ainsi l'intérêt de la cartographie des nucléosomes dans la communauté scientifique. Une carte des nucléosomes sur le génome entier de la levure a été obtenue avec cette technique à une résolution de 4 pb (Lee *et al.*, 2007). Cette avancée fut possible grâce à une augmentation de la densité des sondes retrouvées sur les puces à ADN utilisées. La même année, des travaux d'immunoprécipitation de la chromatine de H2A.Z

couplée au séquençage à haut débit (ChIP-seq) ont été effectués, procurant pour la première fois une carte des nucléosomes contenant H2A.Z à très haute résolution sur l'ensemble du génome de la levure (Albert *et al.*, 2007). Ces travaux ont permis d'identifier des centaines de milliers de nucléosomes individuels contenant H2A.Z (Jiang et Pugh, 2009). Avec le développement et le perfectionnement de ces nouvelles techniques de séquençage à haut débit, les travaux portant sur le positionnement des nucléosomes ont connu un essor spectaculaire. Ils ont permis à ce jour de positionner les nucléosomes à l'échelle de génome entier chez : *S. cerevisiae* (Field *et al.*, 2008; Mavrich *et al.*, 2008a; Yuan *et al.*, 2005) , *S. pombe* (Lantermann *et al.*, 2010), *D. melanogaster* (Mavrich *et al.*, 2008b), *C. elegans* (Johnson *et al.*, 2006; Valouev *et al.*, 2008) et l'humain (Barski *et al.*, 2007; Kaplan *et al.*, 2009; Schones *et al.*, 2008; Shivaswamy *et al.*, 2008). Certaines modifications post-traductionnelles, ainsi que d'autres variants d'histones, ont également été cartographiés et la liste continue de s'accroître, majoritairement attribuable à la diminution des coûts du séquençage à haut débit. Ces techniques couplées au séquençage ont permis d'approfondir d'avantages notre compréhension du paysage chromatinien. La digestion de la chromatine par la MNase est également utilisée depuis longtemps pour étudier la structure de la chromatine, car elle permet d'analyser la position, l'occupation, la composition et les modifications de nucléosomes. Cette enzyme est une endo-exonucléase produite par *S. aureus* qui clive de manière non spécifique l'ADN qui n'est pas protégé par un nucléosome. Cette approche peut être combinée à des analyses sur puces à ADN (MNase-chip), et plus récemment couplée à du séquençage à haut débit (MNase-seq). Le MNase-seq sera abordé dans les parties suivantes du mémoire, puisque cette technique à été réalisé lors de mes travaux de maîtrise.

5 Description du projet de recherche

Notre laboratoire s'intéresse à la régulation de la transcription de gènes cibles de AhR, plus particulièrement des gènes de la famille *CYP1*, *CYP1A1* et *CYP1B1*. Nous avons observé que la déplétion de H2A.Z affecte l'induction de ces deux gènes après traitement au TCDD (Marques *et al.*, 2013, en révision). Des études précédentes réalisées dans le laboratoire ont pu montrer que l'absence de H2A.Z était capable d'influencer l'expression des gènes en modifiant le positionnement de nucléosomes aux promoteurs de ces gènes (Gevry *et al.*, 2009; Guillemette *et al.*, 2005). À partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que la dynamique des nucléosomes, influencée par la présence ou l'absence du variant H2A.Z, va avoir une incidence sur l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* en réponse au TCDD. Trois objectifs ont été fixés pour l'élaboration de mon projet de maîtrise. Le premier objectif consistait à cartographier le positionnement putatif des nucléosomes au promoteur de *CYP1A1* et *CYP1B1*, et le deuxième objectif consistait à vérifier si l'induction de ces gènes entraîne des changements dans le positionnement des nucléosomes. Le troisième objectif consistait à vérifier le positionnement de nucléosomes à *CYP1A1* et *CYP1B1* en présence ou en absence du variant H2A.Z. Les travaux présentés ci-dessous avaient pour but de faire avancer nos connaissances sur la relation entre la régulation de l'expression des gènes et le positionnement des nucléosomes aux gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* en réponse au TCDD.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture Cellulaire et traitements

Les cellules MCF7 utilisées provenaient de deux sources : du chercheur Benoît Paquette au CHUS et de ATCC (American Type Culture Collection). Ce sont des cellules adhérentes provenant d'un adénocarcinome de cellules épithéliales de la glande mammaire, qui expriment de manière endogène le récepteur AhR ainsi que ER α . Les cellules ont été maintenues en culture dans du milieu DMEM (Wisent) supplémenté avec 1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen) et 10% FBS (VWR), à 37°C dans un environnement humidifié contenant 5% de CO₂. Les cellules ont été traitées avec 10 nM de TCDD pendant 6 hrs pour le MNase-seq, pendant 90 min et 6 hrs pour les expériences de ChIPs et 90 min seulement pour les mono-ChIPs, en utilisant le DMSO comme contrôle négatif.

2.2 Transcription inverse et PCR quantitatif

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit GenElute (Sigma). La réverse transcription a été effectuée sur 600ng d'ARN avec l'enzyme M-MLV reverse transcriptase (Promega). Les amorces utilisées pour mesurer les niveaux d'ARNm des gènes d'intérêts lors du PCR quantitatif sont énumérées ci-dessous. 36B4 a été utilisé comme contrôle interne pour la normalisation des données.

Tableau 2.1 : Amorces utilisées pour le RT-qPCR

36B4 Fwd	5' ATCTGCTGCATCTGCTTG 3'
36B4 Rev	5' CGACCTGGAAGTCCAACACTAC 3'
CYP1A1 Fwd	5' TGAACCCCAGGGTACAGAGA 3'
CYP1A1 Rev	5' GGCCTCCATATAGGGCAGAT 3'
CYP1B1 Fwd	5' AACGTACCGGCCACTATCAC 3'
CYP1B1 Rev	5' CCACGACCTGATCCAATTCT 3'

2.3 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les cellules sont pontées avec 1% de formaldéhyde pendant 10 min à température ambiante puis la réaction est arrêtée par l'ajout de glycine (125 mM final). Elles sont ensuite lavées deux fois au PBS 1X froid, transférées dans un tube Eppendorf, et centrifugées à 4°C. Les cellules sont resuspendues dans du tampon I (0.25% Triton, 10mM EDTA pH 8, 0.5mM EGTA pH 8, 10mM Hepes pH6.5, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteurs de protéases), incubées 10 min sur glace et centrifugées à 4°C. Les cellules sont resuspendues dans du tampon II (200mM NaCl, 1mM EDTA pH 8, 0.5mM EGTA pH 8, 10mM Hepes pH6.5, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteurs de protéases) et centrifugées à 4°C. Le culot de cellules est ensuite lysé avec du tampon de lyse (1% SDS, 10mM EDTA pH 8, 50mM Tris-HCl pH 8, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteurs de protéases), passé 5 fois à la seringue et incubées à 4°C pendant 1h avec agitation. Les échantillons sont soniqués 8 x 10 secs à une intensité de 65% avec une pause de 3 min sur glace entre chaque sonication. Les échantillons sont centrifugés à 4°C, 3 µL est prélevé pour vérifier la fragmentation de l'ADN, et le surnageant est dosé avec un spectrophotomètre. L'immunoprécipitation (IP) est effectuée sur 350 µg d'ADN, et 5% (17.5 µg) est prélevé pour chaque traitement et placé à 4°C. Le volume de chaque échantillon a été complété avec du tampon de dilution de IP (0.01% SDS, 1.1% Triton, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl pH 8, 167mM NaCl, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteurs de protéases) afin d'avoir 1mL final d'ADN pour chaque IP. Les échantillons ont été pré-incubés avec 40 µL de

billes A-agarose (dilué à 50% dans du tampon de dilution d'IP et supplémentée de 10mg/mL de sperme de saumon) et du BSA (1mg/mL final) pendant au moins 2h à 4°C avec agitation. Les échantillons ont ensuite été centrifugés et le surnageant a été distribué à coup de 1mL dans des eppendorfs. Les anticorps ont été ajoutés dans chaque eppendorf, sauf pour le contrôle sans anticorps, et incubé pendant toute la nuit 4°C avec agitation. Les anticorps utilisés lors de l'immunoprécipitation sont listés dans le Tableau 2.2. Le lendemain, 40 µL de billes A-agarose sont ajoutés par IP et incubés pendant 4h à 4°C avec agitation. Une série de lavages des billes ont été faits : 2 lavages avec du TSE-150 (0.1% SDS, 1% Triton, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl), 2 lavages avec du TSE-300 (0.1% SDS, 1% Triton, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 300mM NaCl), et 2 lavages avec du TE 1X (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA). Entre chaque lavage, les échantillons ont été incubés 5min à 4°C avec agitation, centrifugés à température ambiante puis le surnageant retiré. Ensuite, 200 µL de solution d'éluion (1% SDS, 0.1M NaHCO₃) ont été ajoutés aux billes ainsi que dans les 5% récoltés, puis ils ont été incubés pendant 20 min à 65°C avec agitation. Les surnageants ont été récupérés et incubés à 65°C toute la nuit. Les échantillons ont ensuite été traités à la RNase A pendant 1h à 37°C, puis à la protéinase K pendant 2h à 50°C. L'ADN des échantillons a été purifié avec le kit de purification de PCR QIAquick (QIAGEN) selon leur protocole.

2.4 Digestions MNase couplé à l'immunoprécipitation de la chromatine (Mono-ChIP)

Les cellules sont pontées au formaldéhyde et récoltées comme décrit à la section précédente. Elles sont lavées avec du tampon I et II comme pour un CHIP. Le culot est resuspendu dans du tampon de digestion (50mM Tris-HCl pH 8, 1mM CaCl₂, 0.2% Triton, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteurs de protéases), puis digéré avec 150-170 U de MNase à 37°C pendant 5 minutes. La digestion est arrêtée en ajoutant un volume de tampon d'arrêt (10mM Tris-HCl pH 8, 5mM EDTA, 0,5% SDS, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteur de protéases). Les échantillons sont soniqués 1X 10 secondes à amplitude 60, centrifugés et un aliquot est prélevé pour vérifier la

digestion MNase. Toutes les étapes suivantes sont identiques à celles décrites à la section précédente. Les anticorps utilisés lors de l'immunoprécipitation sont listés dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Anticorps utilisés pour les expériences de ChIPs et Mono-ChIPs

AhR	(H-211) sc-5579, Santa Cruz Biotechnologies
H2A.Z	contre un peptide d'H2A.Z en C-terminal (CSLIGKKGQKKT)
H3	b1791, Abcam

Tableau 2.3 : Amorces utilisées pour les ChIPs

CYP1A1_115 Fwd	5' GGATTATTTTCTGGCCTGGAC 3'
CYP1A1_115 Rev	5' TATTTGCGTGCCTAGCTCAA 3'
CYP1A1_116 Fwd	5' AGCCACACGCAGACCTAGAC 3'
CYP1A1_116 Rev	5' GGTGGAGGGGAGAGGAACTGT 3'
CYP1A1_XRE-1 Fwd	5' CTTCGTGTCGTGCCACAG 3'
CYP1A1_XRE-1 Rev	5' AGGGTCTAGGTCTGCGTGTG 3'
CYP1A1_118 bis Fwd	5' CGGTCCTTCTCACGCAAC 3'
CYP1A1_118 bis Rev	5' CTCTAGGGGGCAGAGGTCAG 3'
CYP1A1_1A1-2 Fwd	5' CAGCACTAAGGCGATCCTAGA 3'
CYP1A1_1A1-2 Rev	5' GATTGAAGGATCGGAATGGA 3'
CYP1A1_120 Fwd	5' CCGAGTCCTGGTAGGCTGTA 3'
CYP1A1_120 Rev	5' AGAGAGGGTACGGGAAGCTC 3'
CYP1A1_TATA Fwd	5' CGTACAAGCCCGCCTATAAA 3'
CYP1A1_TATA Rev	5' CTGGGATCACAAGGATCAGG 3'
CYP1B1_XRE-2 Fwd	5' ATGACTGGAGCCGACTTTCC 3'
CYP1B1_XRE-2 Rev	5' GGCGAAC TTTATCGGGTTG 3'
CYP1B1_TATA Fwd	5' GACCCCCAGTCTCAATCTCA 3'
CYP1B1_TATA Rev	5' AGTCTCTTGGCGTCGTCAGT 3'

Tableau 2.4 : Amorces utilisées pour les Mono-ChIPs

CYP1B1 mono A Fwd	5' CAGCGCCCGGGATATGA 3'
CYP1B1 mono A Rev	5' CGGGTTGAAGTTTCTGCTGT 3'
CYP1B1 mono B Fwd	5' TGGAGCCGACTTTCCAGA 3'
CYP1B1 mono B Rev	5' CGGAGAGTGGCAGGAGGA 3'
CYP1B1 mono C bis Fwd	5' CTGCGCCAACGGCTTCCAT 3'
CYP1B1 mono C bis Rev	5' CTGAGATTTCCCGCGTAGAG 3'
CYP1B1 mono D Fwd	5' GGCCTCTACGCGGGAAAT 3'
CYP1B1 mono D Rev	5' GCGGCGAGATCAGGAATC 3'
CYP1B1 mono E Fwd	5' TGTGCCCAAGCACTGTCTG 3'
CYP1B1 mono E Rev	5' CCACCTCAGTGGAGGCTCT 3'
CYP1B1 mono F Fwd	5' CTCCACTGAGGTGGCAATTT 3'
CYP1B1 mono F Rev	5' CCCGGAAAGCCAGTGTAGT 3'
CYP1A1 mono A Fwd	5' GGTCCCTTCTCACGCAACG 3'
CYP1A1 mono A Rev	5' CCTACCCCCGGCTAGCTT 3'
CYP1A1 mono C Fwd	5' TGCTCTGCCAATCAAAGCAC 3'
CYP1A1 mono C Rev	5' CGCTCACTAGCGGCTCCT 3'
CYP1A1 mono D Fwd	5' CGCGTTGCAATCAGCACT 3'
CYP1A1 mono D Rev	5' GAGGTTTCGCGCCTCTTGA 3'
CYP1A1 mono E Fwd	5' GCGAGGAGCCGCTAGTGA 3'
CYP1A1 mono E Rev	5' TGGACCTGTCCCCCAGAG 3'
CYP1A1 mono F Fwd	5' TCTGGGGGACAGGTCCAG 3'
CYP1A1 mono F Rev	5' CCTCCTTCCCGGGGTTAC 3'
CYP1A1 mono G Fwd	5' TAACCCCCGGAAGGAGGT 3'
CYP1A1 mono G Rev	5' TTTGCACCCACTGGAACG 3'
CYP1A1 mono H Fwd	5' TGCCGAGTCCTGGTAGGC 3'
CYP1A1 mono H Rev	5'GCCCCAAGAGAGGGTACG 3'
CYP1A1 mono I Fwd	5' CGTTCAGTGGGTGCAAA 3'
CYP1A1 mono I Rev	5'CAGAACCCAGCCGAGGAG 3'
CYP1A1 mono J bis Fwd	5' GTACCCTCTTTCGGGCTGT 3'
CYP1A1 mono J bis Rev	5' ACACCTGGAAGTCCCAATTC 3'
CYP1A1 mono K Fwd	5' GGTCTGCACTGCCCTTG 3'
CYP1A1 mono K Rev	5' GGTGGGCAAGAACCCACT 3'

2.5 Digestions MNase pour le MNase-seq

Les cellules sont pontées avec le formaldéhyde et récoltées comme décrit dans les sections précédentes. Elles sont resuspendues dans une solution d'homogénéisation froide (0.3M Sucrose, 2mM Mg(OAc)₂, 3mM CaCl₂, 1% Triton, 10mM Hepes pH 7.9, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteur de protéase). L'homogénéisation des cellules est réalisée sur glace à l'aide d'un Dounce au moyen de 40 va-et-vient du piston. Les noyaux sont récupérés en centrifugeant à 4°C les cellules sur une solution de séparation (25% Glycérol, 5mM Mg(OAc)₂, 0.1mM EDTA, 10mM Hepes pH 7.4, 1X PMSF, 1X cocktail d'inhibiteur de protéases). Le culot de noyau est resuspendu dans du tampon de digestion MNase (10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM CaCl₂, 2.5mM MgCl₂, 1X PMSF), puis digéré avec 170U de MNase (Calbiochem, cat# 492899) pendant 5 minutes à 37°C. La digestion est arrêtée sur glace en ajoutant 1 volume de la solution d'arrêt (2% SDS, 0.2mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 50mM Tris-HCl pH 8). Après traitement à la RNase A (BioShop) et Protéinase K (BioShop), deux extractions au phénol/chloroforme pH 8 (Fisher) puis une au chloroforme (Fisher) sont effectuées. L'ADN est précipité à l'éthanol et le culot resuspendu dans de l'eau. Les fragments d'ADN sont séparés sur un gel d'agarose 2% et les bandes d'intérêts sont découpées et purifiées avec un kit d'extraction de gel QIAquick (QIAGEN). Les échantillons sont ensuite dosés au NanoDrop.

2.6 MNase-seq et analyses bio-informatiques

Des digestions à la MNase ont été effectuées sur des cellules MCF7 en conditions non-traitées (DMSO) et traitées avec 10nM de TCDD pendant 6 hrs, et optimisées pour l'obtention de fragments d'ADN de la taille d'un mononucléosome (~80% de mono et ~20% de dinucléosomes afin d'éviter la surdigestion). Ces ADN ont été purifiés sur gel tel que mentionné ci-haut, puis envoyé en duplicatas au Centre d'Innovation de Génome Québec, où

ils ont effectué une vérification de la qualité des ADN sur un Bioanalyzer (Agilent) ainsi que les librairies d'ADN pour le séquençage avec un kit d'Illumina (TruSeq gDNA Illumina). Des lectures de 50 bases en format lecture simple ont été séquencées avec une plateforme Illumina Hi-Seq2000.

La première étape de l'analyse des données a été de vérifier la qualité des séquences obtenues avec le logiciel FastQC (Babraham Institute). Les séquences ont ensuite été alignées sur le génome humain (hg18) avec BWA (Burrows-Wheeler Alignment tool) (Li et Durbin, 2009). La qualité de l'alignement sur le génome a été vérifiée à l'aide de l'outil SAMStat (Lassmann *et al.*, 2011), qui fournit un score de qualité (MAPQ) permettant d'évaluer la fidélité de l'alignement sur le génome de référence. Les données ayant un MAPQ score inférieur à 20, ce qui correspond à une probabilité de 99% qu'une base soit précisément alignée, ont été enlevées avec SAMtools (Li *et al.*, 2009). Les 4 premières paires de bases des lectures de séquençage obtenues pour chaque échantillon ont été enlevées avec FASXT-Toolkit, dû à leurs mauvais alignements sur le génome comparativement aux autres paires de bases. En combinant les duplicatas, tout juste ~200 millions pour les non-traités et ~300 millions de séquences pour les échantillons traités au TCDD ont été obtenus après le triage de contrôle de qualité. Ensuite, les données correspondant à mes gènes d'intérêts ont été extraites avec SAMtools (sur une région de 48 kb pour *CYP1A1*, qui inclut *CYP1A2*, et 35 kb pour *CYP1B1*). L'outil MACS (Zhang *et al.*, 2008) a été utilisé afin de déterminer la distance moyenne entre les fragments qui s'hybridaient sur le brin positif et ceux sur le brin négatif de l'ADN. Finalement, le logiciel DANPOS (Chen *et al.*, 2012) a été utilisé pour déterminer le positionnement des nucléosomes aux gènes d'intérêts et pour comparer le positionnement dans les deux conditions expérimentales.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Conditions expérimentales et analyses bio-informatiques

Dans le but de cartographier le positionnement de nucléosomes à des gènes cibles de AhR en réponse au TCDD dans les MCF7, il a fallu déterminer la concentration de MNase et le temps de traitement permettant d'obtenir majoritairement des mononucléosomes (~150pb). Pour ce faire, j'ai effectué une titration de l'enzyme avec différents temps de digestion accompagné d'un contrôle négatif d'ADN non-digéré, puis j'ai visualisé les patrons de digestion sur gel d'agarose (Figure 3.1).

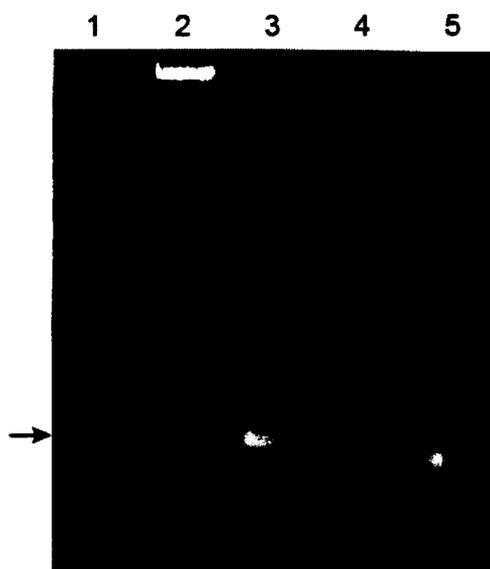


Figure 3.1 : Patrons de digestion MNase de la chromatine de cellules MCF7.

Un marqueur de poids moléculaire est présent dans la piste 1, la flèche indiquant la marque de 150 pb. Dans la piste 2, on retrouve de l'ADN non-digéré (contrôle négatif) et dans les pistes 3,4 et 5 différents temps de digestion à la MNase.

Ensuite, j'ai voulu vérifier que mon système expérimental répondait de manière attendue suite aux traitements au TCDD. J'ai effectué des essais de RT-qPCR afin de mesurer l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* en réponse à des traitements au TCDD pendant 6 hrs. On observe que ces deux gènes sont induits dans ces conditions, comparativement aux contrôles négatifs non-traités et DMSO (Figure 3.2 A, B). J'ai également effectué des ChIPs de la protéine AhR afin de vérifier que celle-ci est bien recrutée aux XREs après des traitements au TCDD pendant 6 hrs. On observe que l'activateur AhR est bien recruté aux XREs aux promoteurs de *CYP1A1* et *CYP1B1* pour promouvoir leur induction en réponse au TCDD comparativement au DMSO (Figure 3.2 C, D). Donc, j'ai conservé ces conditions expérimentales pour la suite de mes expériences.

L'ADN de cellules MCF7 digéré correspondant à des mononucléosomes a été purifié et séquencé en duplicatas pour mes deux conditions de traitements, et les résultats de séquençage à haut débit ont été analysés avec des outils bio-informatiques. Les trois premières étapes de l'analyse bio-informatique (voir la section 2.6) sont standard pour à peu près tous les types de résultats de séquençage à haut débit. Ceux-ci permettent de vérifier la qualité des résultats obtenus et ainsi déterminer si les données sont de qualité suffisante pour continuer l'analyse. Lors de la vérification de la qualité des lectures de séquençage et de leurs scores d'alignement sur le génome, des 50 bases séquencées pour chacun des échantillons, les 4 premières bases ont attiré notre attention. En effet, le graphique représentant le contenu de la séquence à chaque base généré par FastQC a permis de constater que la première base était un A dans ~80% des séquences et un G en deuxième place dans plus de 50% des séquences (Figure 3.3 A). Ceci n'est pas attendu, puisqu'en théorie on s'attendrait plutôt à voir 25% de chaque base présente à travers tous les fragments d'ADN séquencés. De plus, l'analyse de la qualité de l'alignement des séquences sur le génome humain réalisé avec le logiciel SAMstat nous a permis d'observer que la qualité moyenne de l'alignement des 4 premières bases des lectures de séquençage obtenues était inférieure et elles s'alignaient moins bien sur le génome que les bases suivantes (Figure 3.2 B). Or, avec la technologie de séquençage par synthèse Illumina, les premières bases des lectures séquencées sont sensées être les plus fiables et avoir la

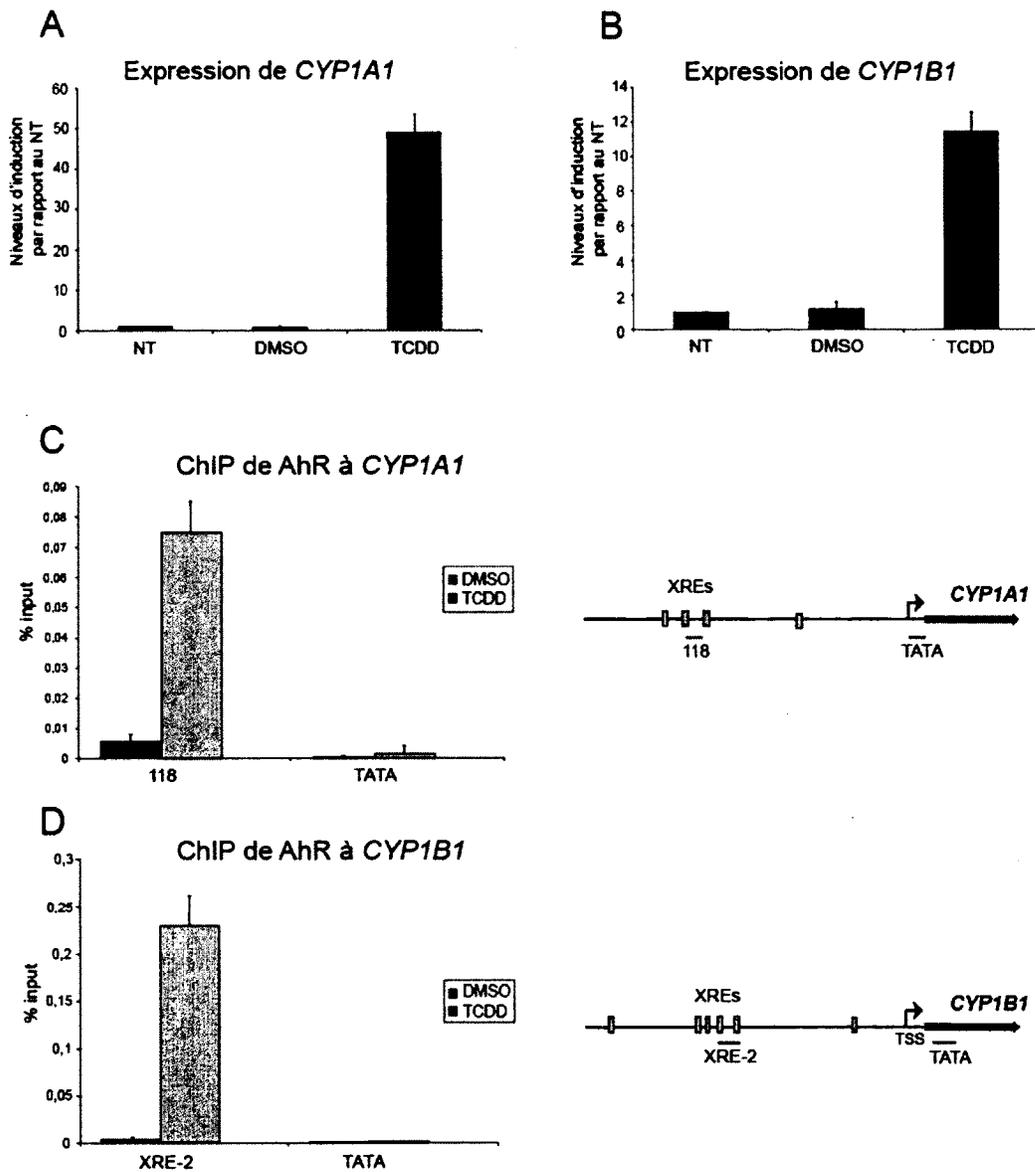


Figure 3.2 : Le TCDD induit l'expression de *CYP1s* et le recrutement de AhR dans les cellules MCF7. Les niveaux d'expression d'ARNm de *CYP1A1* (A) et *CYP1B1* (B) ont été quantifiés dans les cellules MCF7 non-traitées, traitées au DMSO ou 10nM TCDD pendant 6h. ChIP de AhR à *CYP1A1* (C) et *CYP1B1* (D) dans les cellules MCF7 traitées au DMSO ou 10nM TCDD pendant 6h, et à droite la représentation schématisée de l'emplacement des amorces utilisées.

meilleure qualité, et plus on s'éloigne du début du fragment, plus on perd cette qualité. Pour poursuivre l'analyse des données, j'ai décidé de retirer les 4 premières bases de toutes les lectures de séquençage obtenues. Ceci restaure à ~25% le contenu de la séquence à chaque base et améliore la qualité par paire de base des fragments séquencés (Figure 3.3 C et D). Donc des fragments de 46 pb ont été utilisés pour les analyses suivantes. Ensuite, j'ai utilisé l'outil MACS pour estimer la taille moyenne des fragments séquencés (d) basé sur la distribution des distances entre les lectures de séquençage sur les brins positifs et négatifs.

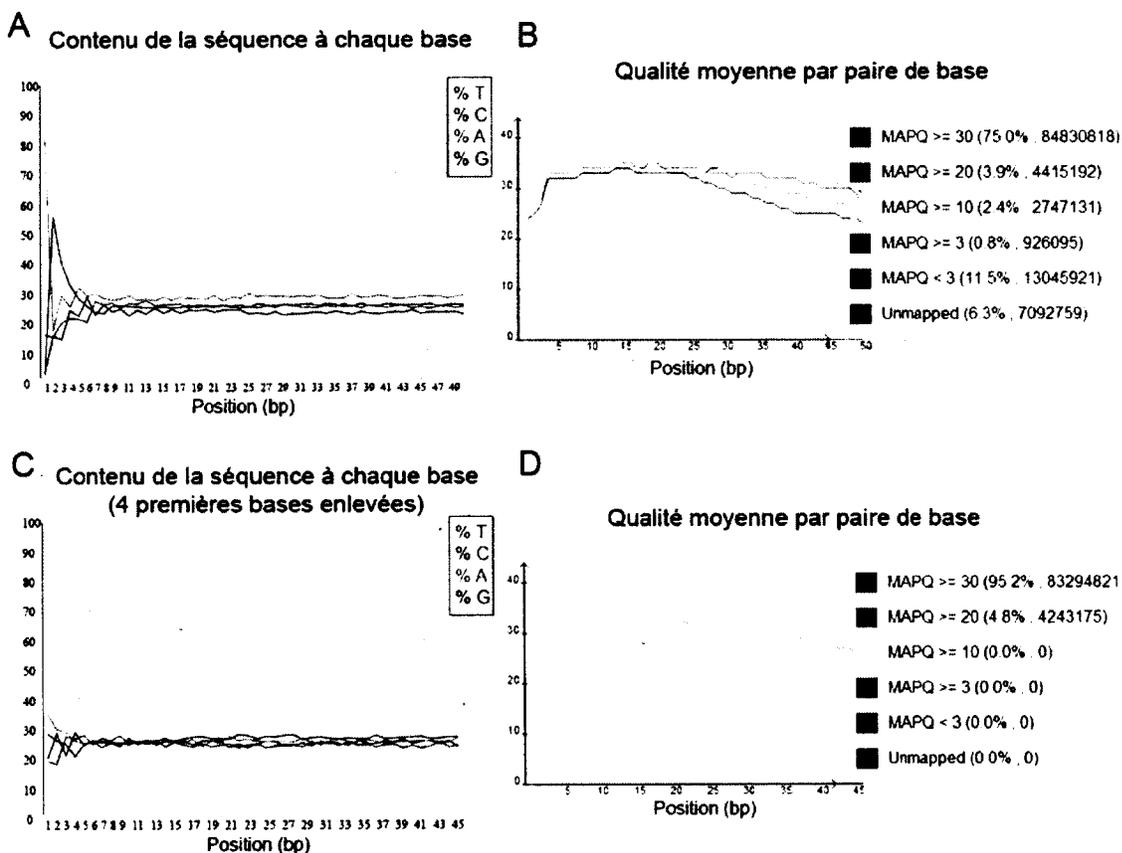


Figure 3.3 : Capture d'écran de graphiques générés par FastQC et SAMstat lors de la vérification de la qualité des séquences obtenues après le séquençage. Vérification avec FastQC du contenu des séquences à chaque base dans les données avant (A) et après (C) avoir enlevé les 4 premières bases. La qualité moyenne de l'alignement de chaque paire de bases des données avant (B) et après (D) le retrait des 4 premières bases et des données ayant un MAPQ score inférieur à 20 obtenu avec SAMstat sont présentées.

Un exemple de graphique généré par MACS est présenté pour le chromosome 15 (qui comprend le gène *CYP11A1*) d'un échantillon d'ADN de MCF7 traité au TCDD (Figure 3.4). On observe que MACS estime le d à 138 pb, mais si l'on ajoute les 4 premières bases enlevées, on obtient 142 pb ce qui est très proche du 147 pb attendu pour un mononucléosome. Des valeurs semblables de d ont été obtenues dans les autres échantillons à d'autres chromosomes. Ces résultats nous permettent de confirmer que des fragments de tailles très similaires à celles attendues (~150 pb) ont été séquencés, et donc que le séquençage a bel et bien fonctionné en ce qui a trait à la taille des échantillons d'ADN.

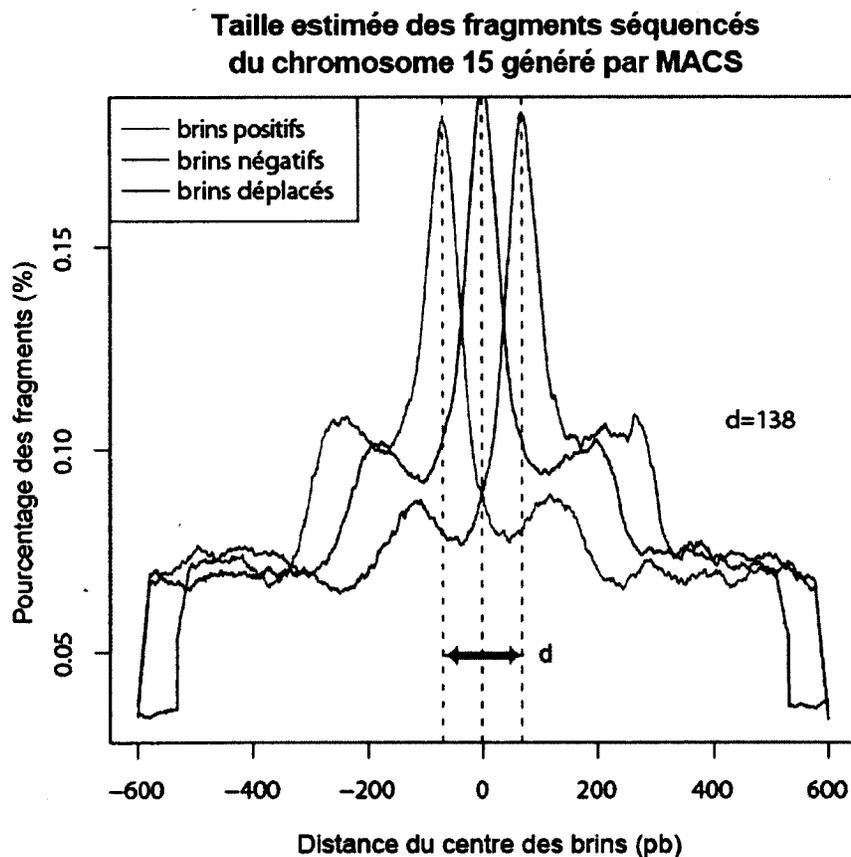
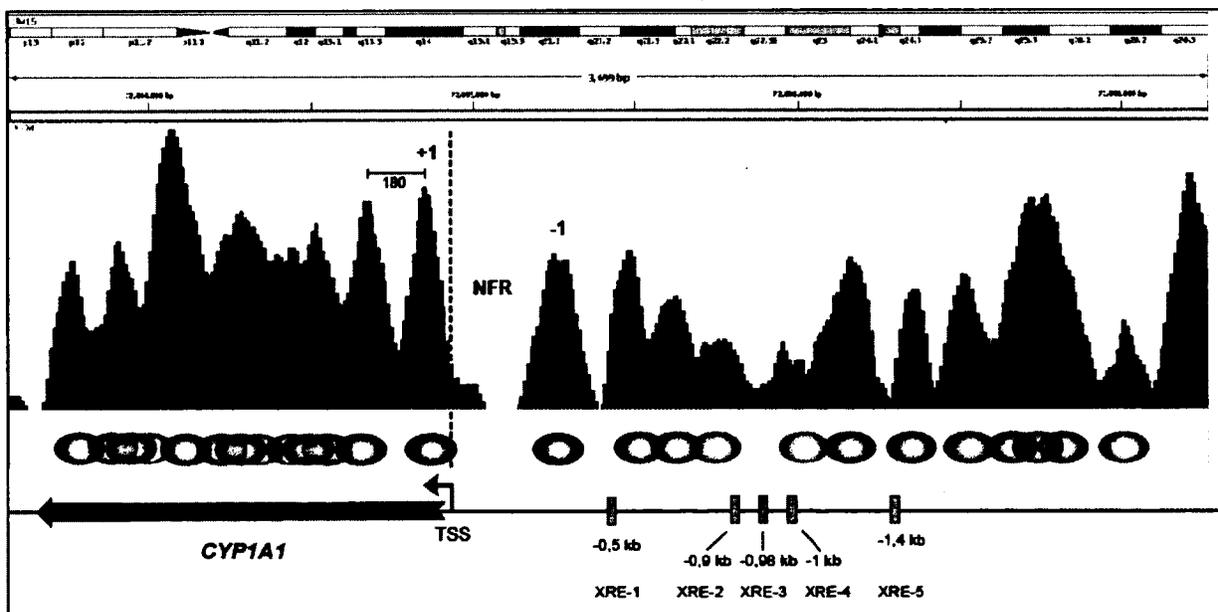


Figure 3.4 : Modèle généré par le programme MACS qui estime la taille moyenne des fragments séquencés. Le graphique représente le pourcentage de fragments alignés par rapport à la distance du centre des pics des brins + et -. Il calcule la distance entre les deux pics (d), puis déplace les fragments de $d/2$ vers l'extrémité 3', qu'il détermine comme étant le site le plus probable de liaison de la protéine.

3.2 Positionnement de nucléosomes aux promoteurs de *CYP1A1* et *CYP1B1*

Mon premier objectif consistait à déterminer le positionnement des nucléosomes à *CYP1A1* et *CYP1B1*, donc les données de séquençage correspondant à ces deux gènes ont été extraites. Pour le gène *CYP1A1*, une région de 48 Kb qui inclut le gène *CYP1A2* (chr15 : 72,796,000-72,845,000 bases) et une région de 35 Kb pour le gène *CYP1B1* (chr2 : 38,146,000-38,182,000 bases) ont été isolés. Le programme DANPOS (Dynamic Analysis of Nucleosome Positioning and Occupancy by Sequencing) a été utilisé pour analyser les données et déterminer le positionnement de nucléosomes. C'est un programme conçu pour faire l'analyse comparative à l'échelle du génome du positionnement de nucléosomes. Celui-ci permet de calculer la densité de fragments séquencés ajustés pour faire 147 pb couvrant chaque paire de bases du génome dans une population de cellules. Les fichiers générés par ce programme, visualisés dans IGV, sont présentés ci-dessous. On observe le positionnement putatif de nucléosomes dans les MCF7 aux gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* (Figure 3.5) en conditions non-traitées. Au gène *CYP1A1* (Figure 3.5 A), on observe en amont du TSS un nucléosome +1 avec un fort positionnement (pic bien défini), suivi d'une région NFR d'environ 200 pb et d'un nucléosome -1 avec un fort positionnement. Cette région est caractéristique de l'organisation des promoteurs chez la plupart des eucaryotes, ce qui valide, en partie, le

A



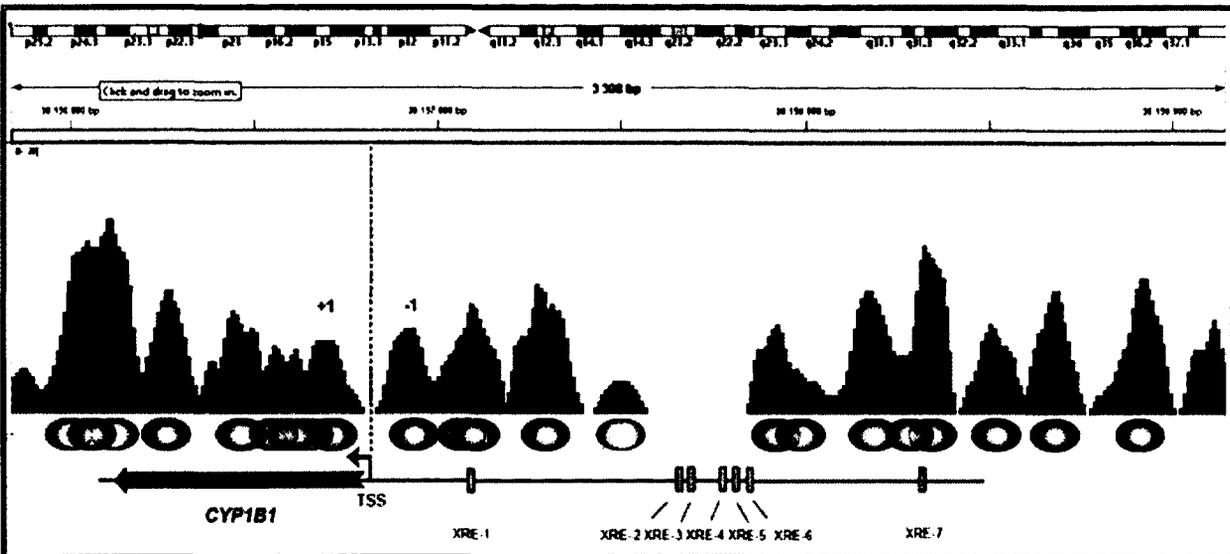
B

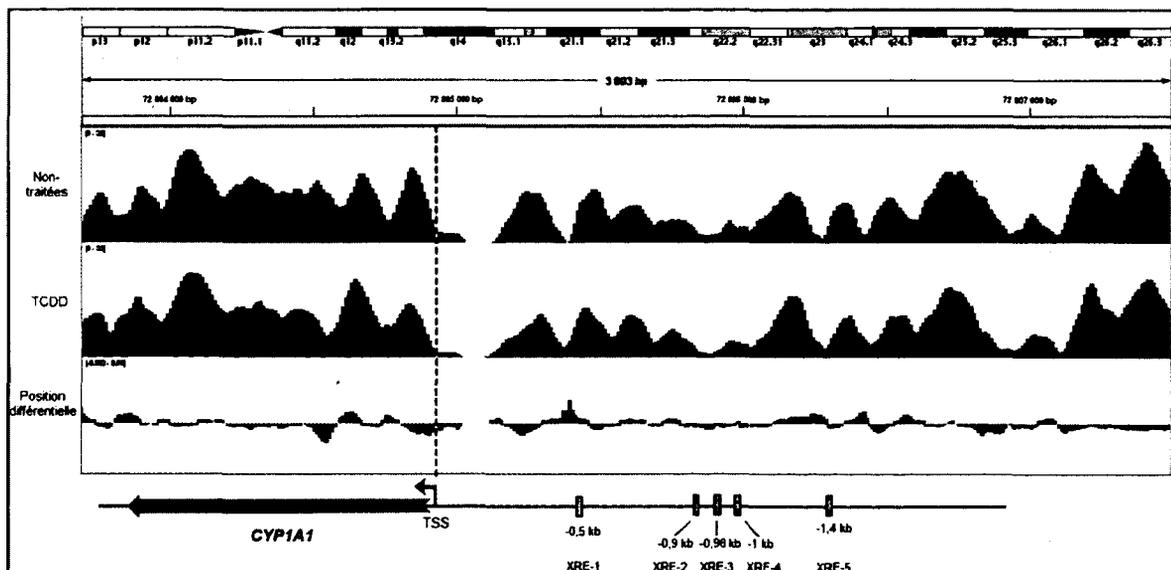
Figure 3.5 : Positionnement putatif de nucléosomes. Capture d'écran des résultats obtenus avec le programme DANPOS pour le positionnement de nucléosomes aux gènes *CYP1A1* (A) et *CYP1B1* (B) dans les MCF7 traitées au DMSO et visualisé dans IGV.

positionnement de nucléosomes obtenu avec la technique de MNase-seq. On observe également que le positionnement de nucléosomes dans la région codante du gène semble moins bien défini, et qu'il y a une légère déplétion de nucléosomes sur ~100 pb au niveau du XRE-3, où AhR se lie pour induire l'activation transcriptionnelle de *CYP1A1*. Au gène *CYP1B1* (Figure 3.5 B), on observe une organisation des nucléosomes autour du TSS semblable à celle observée à *CYP1A1*, mais moins bien définie. Une région NFR est présente, quoique moins grande en taille, qui s'aligne parfaitement avec le TSS, ainsi que des nucléosomes +1 et -1 de part et d'autre de cette région, mais qui sont moins bien défini et leurs pics moins intenses. On observe également une région NFR de ~250 pb au niveau du XREs 2, 3, 4 et 5, qui ne correspond pas à des séquences répétées, mais où AhR se lie pour induire l'activation transcriptionnelle de *CYP1B1*.

3.3 Modulation du positionnement de nucléosomes aux gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* suite à leur induction par le TCDD

Mon deuxième objectif était de comparer le positionnement des nucléosomes dans les régions promotrices de *CYP1A1* et *CYP1B1* traités ou non au TCDD, afin de vérifier si l'induction des gènes entraîne des changements. Avec le programme DANPOS, il est également possible, en fournissant des données non-traitées et traitées, de calculer le positionnement différentiel de nucléosomes entre deux conditions à chaque paire de bases. Cette approche a été utilisée pour réaliser cet objectif, en conditions non-traitées (DMSO) ou traitées 6 hrs au TCDD (Figure 3.6). Au gène *CYP1A1* (Figure 3.6 A), on peut observer le positionnement différentiel des nucléosomes calculé par DANPOS dans le panneau du bas, et l'on constate qu'il y a très peu de variations entre les deux conditions. Le NFR en amont du TSS est toujours présent, mais les pics des nucléosomes +1 et -1 sont légèrement plus larges et moins définis. La région dépourvue en nucléosome au XRE-3 est également toujours présente après le traitement au TCDD. Au gène *CYP1B1* (Figure 3.6 B), on constate qu'il y a encore une fois peu de variations entre les deux conditions. Il n'y a pas de changement notable entre les deux conditions au niveau de l'organisation des nucléosomes autour du TSS. Cependant, en amont du XRE-1 il y a une diminution du signal de positionnement différentiel.

A



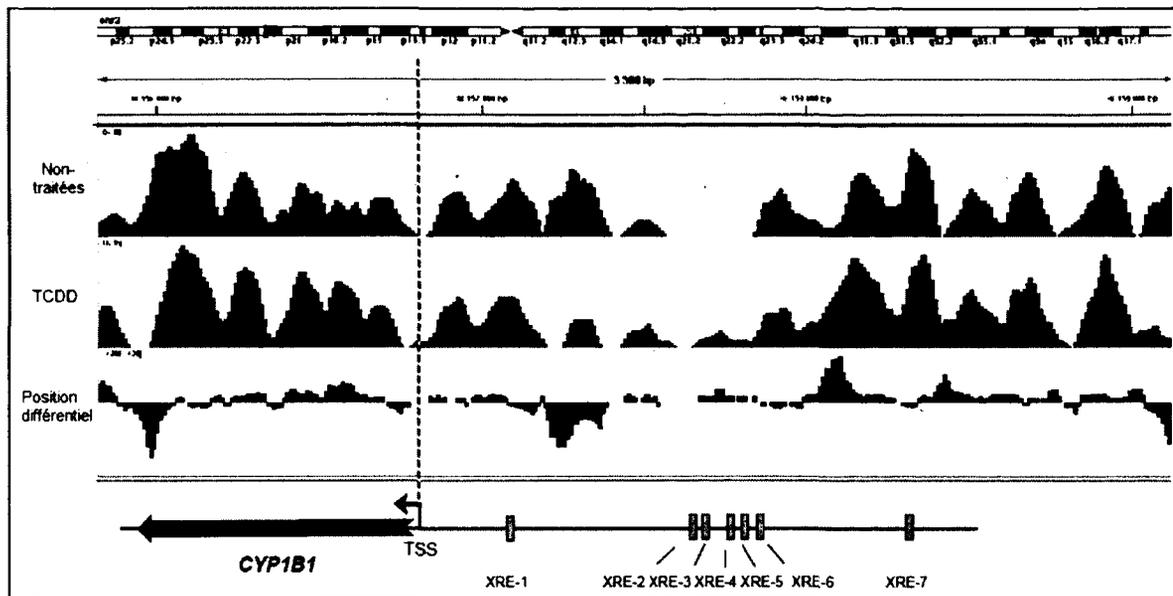
B

Figure 3.6 : Comparaison du positionnement de nucléosomes entre deux conditions.

Capture d'écran des résultats obtenus avec le programme DANPOS pour la comparaison du positionnement des nucléosomes aux gènes *CYP1A1* (A) et *CYP1B1* (B) dans les MCF7 traitées au DMSO et au TCDD pendant 6h et visualisé dans IGV.

À la région NFR au XREs 2, 3, 4 et 5 qu'on observait en conditions non-traitées, on observe que suite au traitement au TCDD il y a apparition d'un pic, ce qui semble indiquer qu'un nucléosome est présent à cet endroit. À la lumière de ces résultats, le peu de variations au niveau du positionnement de nucléosomes qu'on observe aux deux gènes peut vouloir dire deux choses. Soit il n'y a vraiment pas de changement (stabilisation, déstabilisation, déplacement latéral ou éviction) engendré par l'induction des gènes au niveau du positionnement des nucléosomes, soit des changements ont lieu, mais ils sont possiblement subtils et la technique utilisée manque de résolution pour nous permettre de les observer.

3.4 Vérification du positionnement des nucléosomes aux promoteurs de *CYP1A1* et *CYP1B1*, en présence ou en absence du variant H2A.Z.

Mon troisième objectif consistait à vérifier, par d'autres techniques à moyenne résolution, le positionnement de nucléosomes à *CYP1A1* et *CYP1B1*. Je voulais également investiguer la présence ou l'absence du variant H2A.Z à ces régions promotrices et son implication potentielle dans le positionnement des nucléosomes. Pour ce faire, j'ai effectué des expériences de CHIP de l'histone H3 et du variant H2A.Z dans des MCF7 ATCC. Celles-ci ont été traitées au DMSO et au TCDD pendant 6 heures, comme pour le MNase-seq, ainsi qu'au TCDD pendant 90 minutes puisqu'on observe un pic de recrutement de AhR après ce temps de traitement dans le laboratoire. Au promoteur de *CYP1A1* (Figure 3.7), on observe que les niveaux de H3 restent relativement constants sur toute la région étudiée et entre les différents traitements (Figure 3.7 B). Ces résultats semblent corrélérer avec les résultats de MNase-seq

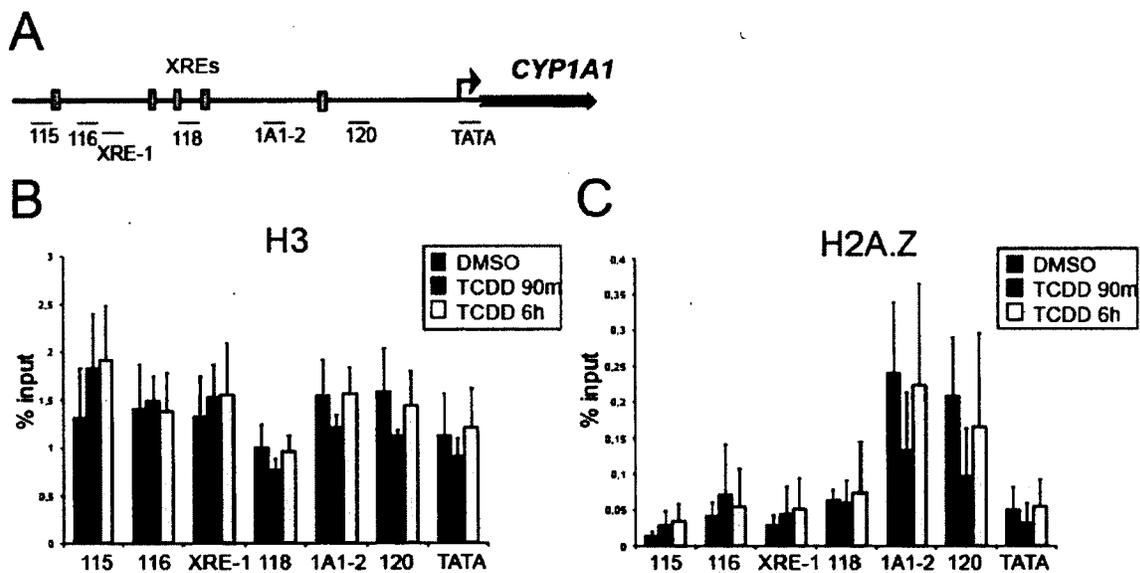


Figure 3.7 : Experiences de ChIPs au promoteur de *CYP1A1*.

(A) Schéma représentant l'emplacement des différentes amorces utilisées pour effectuer les ChIPs au promoteur de *CYP1A1*. Des ChIPs de H3 (B) et H2A.Z (C) ont été effectués dans les MCF7 ATCC traitées avec 10nM de TCDD pendant 90 min et 6 hrs.

obtenues à *CYP1A1*, où l'on constate peu de variation dans le positionnement des nucléosomes. De plus, on observe un enrichissement du variant H2A.Z autour du XRE-1 (amorces 1A1-2 et 120), qui diminue de 50% après 90 min de traitement au TCDD puis revient au même niveau que le contrôle négatif après 6 hrs de traitement au TCDD (Figure 3.7 B). Au promoteur de *CYP1B1* (Figure 3.8), on observe une diminution flagrante (~80%) des niveaux de H3 après les deux temps de traitements au TCDD au XRE 2 et 3, qui est également visible à la TATA, mais moins prononcée (Figure 3.8 B). La quantité de H2A.Z à *CYP1B1* est elle aussi nettement diminuée suite aux traitements au TCDD, autant au XRE-2 qu'à la TATA (Figure 3.8 C). Cependant, ces résultats ne vont pas dans le même sens que les résultats de MNase-seq. En effet, aux XREs 2,3,4 et 5 on voit l'apparition d'un nucléosome après le traitement au TCDD en MNase-seq, en ChIP on voit plutôt ce qui semble être le départ d'un nucléosome à cette région en réponse au TCDD. Suite à l'obtention de ses profils très différents, nous avons voulu confirmer lequel était reproductible, mais en conditions plus similaires à celles utilisées lors du MNase-seq.

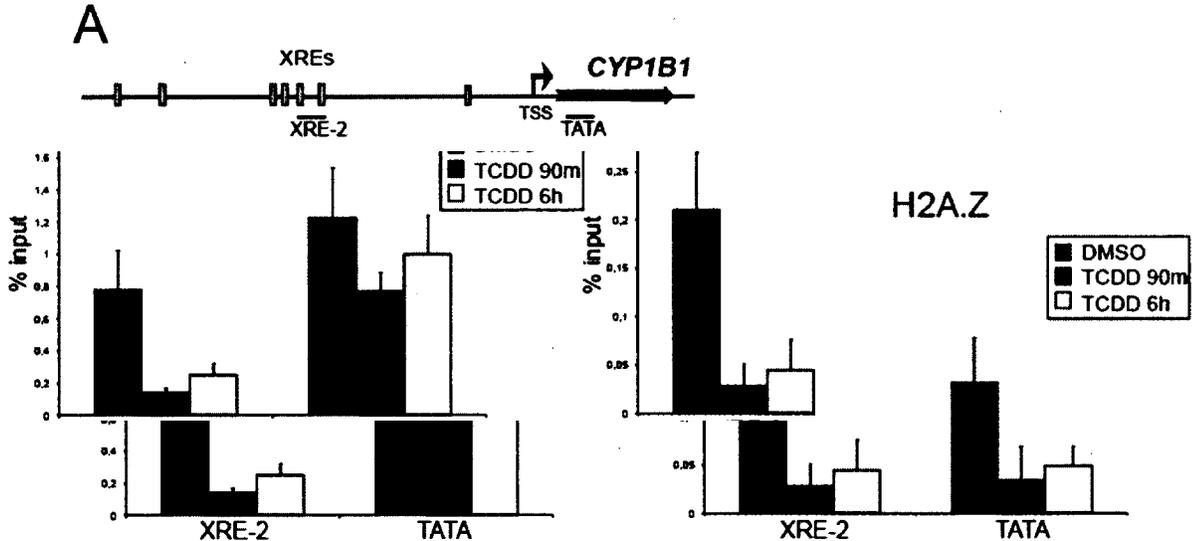


Figure 3.8 : Expériences de ChIPs au promoteur de *CYP1B1*.

(A) Schéma représentant l'emplacement des différentes amorces utilisées pour effectuer les ChIPs au promoteur de *CYP1B1*. Des ChIPs de H3 (B) et H2A.Z (C) ont été effectués dans les MCF7 ATCC traitées avec 10nM de TCDD pendant 90min et 6 hrs.

Des expériences de ChIP couplées à des digestions MNase (Mono-ChIP) de H3 et H2A.Z ont donc été réalisées. J'ai balayé les régions promotrices de *CYP1A1* sur ~500 pb (Figure 3.9 A) et *CYP1B1* sur ~850 pb (Figure 3.10 A) avec des amorces de 100 pb se chevauchant de 50 pb, dans la mesure du possible puisqu'ils se trouvent dans des îlots CpG. À *CYP1A1*, on observe que les niveaux de H3 restent relativement constants sur toute la région couverte après les traitements (Figure 3.9 B). Une faible diminution de H3 en réponse au TCDD est visible, mais aucune frontière de nucléosome n'est distinguable. Les niveaux de H2A.Z sont eux aussi assez constants et il y a présence de H2A.Z en condition non-traitée sur toute la région couverte (Figure 3.9 C), et non uniquement autour du XRE-1 telle qu'observée en ChIP. Par contre, la diminution de 50% (et même plus) des niveaux de H2A.Z après traitement au TCDD est toujours présente. À *CYP1B1*, les niveaux de H3 en condition non-traitée sont eux aussi relativement constants et aucune frontière de nucléosome n'est visible (Figure 3.10 B). En réponse au TCDD, une diminution de ~65% de H3 est visible à l'amorce A et de 50% aux

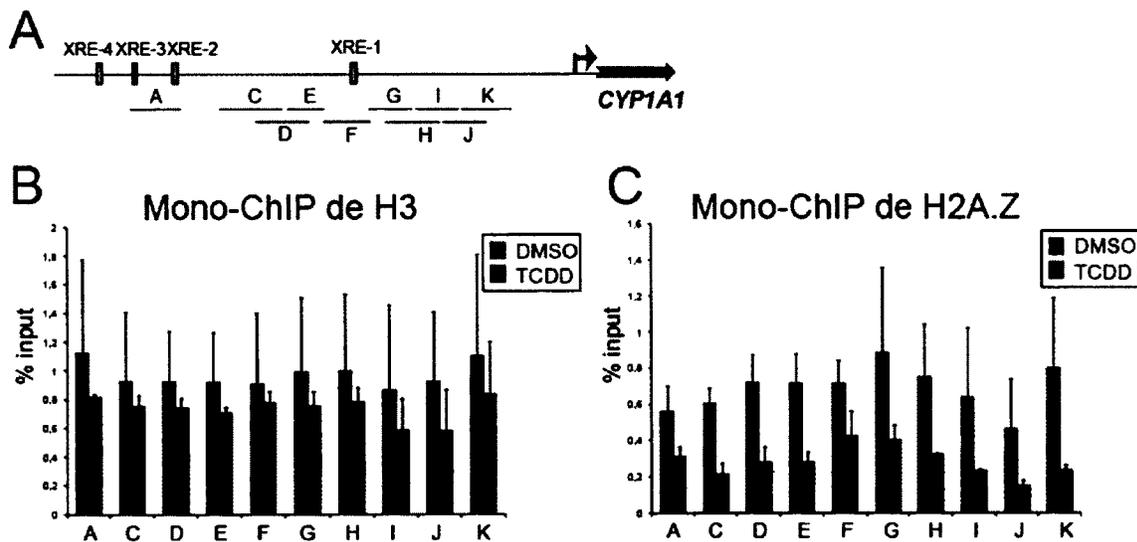


Figure 3.9 : Mono-ChIPs dans la région promotrice de *CYP1A1*.

(A) Schéma représentant l'emplacement des différentes amorces utilisées au promoteur de *CYP1A1*. Des Mono-ChIPs de H3 (B) et H2A.Z (C) ont été effectués dans les MCF7 ATCC traitées avec 10nM de TCDD pendant 90 min.

amorces B et C, puis les niveaux de H3 restent les mêmes plus on s'approche du XRE-1. En condition non-traitée, on distingue deux régions un peu plus enrichies en H2A.Z aux amorces A et E (Figure 3.10 C), et on observe une diminution de ~80% de H2A.Z sur toute la région couverte en réponse au TCDD. Ces résultats corrént avec les résultats obtenus en ChIP, même si la diminution de H3 en réponse au TCDD est moins importante, et vont à l'encontre des résultats de MNase-seq. Un effet de population de cellules pourrait partiellement expliquer pourquoi nous ne distinguons pas de frontière de nucléosomes avec la technique de Mono-ChIP, puisque celle-ci est censée fournir une meilleure résolution que le ChIP classique.

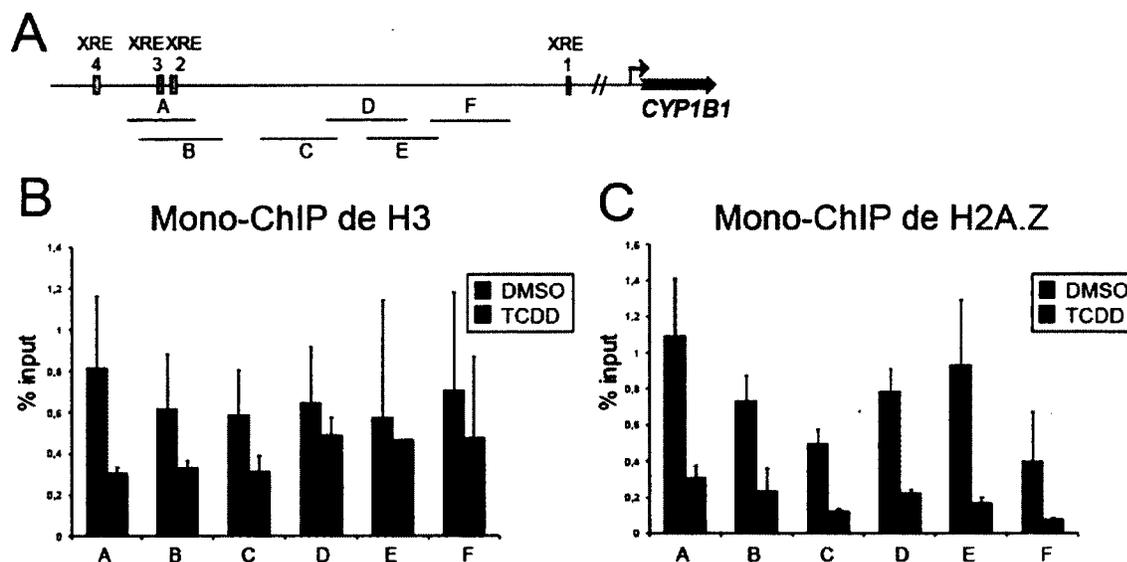


Figure 3.10 : Mono-ChIPs dans la région promotrice de *CYP1B1*.

(A) Schéma représentant l'emplacement des différentes amorces utilisées au promoteur de *CYP1B1*. Des Mono-ChIPs de H3 (B) et H2A.Z (C) ont été effectués dans les MCF7 ATCC traitées avec 10nM de TCDD pendant 90 min.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

L'étude du positionnement de nucléosomes aux promoteurs de gènes cibles de AhR a été réalisée dans le cadre de mon projet de maîtrise. Les travaux présentés avaient pour objectif de faire avancer nos connaissances sur la relation entre la régulation de l'expression des gènes et le positionnement des nucléosomes aux gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* en réponse au TCDD. Des travaux dans le laboratoire ont montré que H2A.Z était important pour la régulation des gènes cibles de AhR. La déplétion de H2A.Z entraîne une diminution de l'induction de *CYP1A1* en réponse au TCDD uniquement dans des cellules exprimant ER α , tandis que l'induction de *CYP1B1* est toujours affectée par la déplétion de H2A.Z, indépendamment du statut de ER α dans les cellules (Marques *et al.*, 2013, en révision). Ces résultats suggèrent que le rôle de H2A.Z dans la régulation de ces deux gènes est différent. En effet, dans des cellules exprimant ER α , la déplétion de H2A.Z engendre une augmentation de la méthylation de l'ADN au promoteur de *CYP1A1*, ce qui affecte ces niveaux d'induction après traitement au TCDD, mais ce mécanisme n'a pas été étudié à *CYP1B1*. De plus, des travaux précédents réalisés dans le laboratoire ont montré l'importance du variant H2A.Z dans la régulation du positionnement de nucléosomes aussi bien chez la levure que dans des cellules humaines (Gevry *et al.*, 2009; Guillemette *et al.*, 2005). Pour ces raisons, nous avons également décidé d'investiguer le comportement du variant H2A.Z aux promoteurs de *CYP1A1* et *CYP1B1* avant et après traitement au TCDD.

La technique de MNase-seq utilisée ici nous a permis de cartographier à haute résolution la position des nucléosomes aux promoteurs de *CYP1A1* et *CYP1B1*. Nous avons également comparé le positionnement de nucléosomes avant et après l'induction de ces deux gènes par le TCDD, et constaté qu'il y a très peu de variations de la position des nucléosomes entre les

deux conditions à ces gènes. Cependant, aux sites de liaisons de AhR localisé au promoteur de *CYP1B1*, on observe une région dépourvue de nucléosomes en conditions non-traitées, puis un léger pic correspondant potentiellement à l'apparition d'un nucléosome à cet endroit en réponse au TCDD.

Afin de confirmer les résultats de MNase-seq, nous avons utilisé d'autres techniques pour observer le positionnement de nucléosomes, ainsi que la présence ou l'absence de H2A.Z. Les expériences de ChIPs et Mono-ChIPs effectués ont permis d'observer qu'à *CYP1A1*, les niveaux de H3 restent inchangés, en accord avec les données de MNase-seq, mais les niveaux de H2A.Z diminuent de 50% après traitement au TCDD. À *CYP1B1*, on observe une perte importante de H3, surtout aux sites de liaisons de AhR, ainsi que de H2A.Z après l'induction du gène par le TCDD, ce qui suggère une perte potentielle de nucléosome(s) dans sa région promotrice. De plus, *CYP1B1* possède des EREs dans cette région promotrice et l'ARN pol II y est préliée avant induction du gène, ce qui n'est pas le cas à *CYP1A1*. Ces résultats suggèrent un rôle différent de la chromatine dans la régulation de l'expression de *CYP1A1* et *CYP1B1*, en accord avec d'autres résultats qui montrent que ER α affecte spécifiquement l'expression de *CYP1A1*, mais pas de *CYP1B1* (Marques *et al.*, 2013, en révision). D'autres études sont nécessaires afin de trouver les acteurs impliqués dans ces mécanismes de régulation, surtout au niveau du positionnement des nucléosomes au gène *CYP1B1*.

Finalement, les résultats contradictoires obtenus avec les différentes techniques au promoteur de *CYP1B1* suggèrent que la technique de MNase-seq n'est peut-être pas la meilleure technique pour comparer le positionnement différentiel de nucléosomes entre différentes conditions; surtout considérant la couverture (quantité de données) nécessaire pour couvrir tout le génome humain.

CONCLUSION

Lors de la planification des expériences de MNase-seq, nous pouvions nous attendre à obtenir au moins 200 millions de lectures de séquençage par échantillon avec la technologie Illumina. Donc en combinant nos duplicatas nous nous attendions à avoir ~ 400 millions de séquences au total par conditions. Ceci équivaut à une couverture de 19X du génome pour des nucléosomes de 147 pb. En réalité, en combinant les duplicatas et les échantillons reséquencés après le triage de contrôle de qualité, ~ 200 millions de lectures de séquençage pour les échantillons non-traités et ~ 300 millions de lectures de séquençage pour les échantillons traités au TCDD ont été obtenues. Ceci équivaut à une couverture de 9X et 13X respectivement du génome pour des nucléosomes de 147 pb. Or, ces valeurs sont théoriques et ne représentent pas ce que nous avons vraiment obtenu comme couverture. En visualisant les données brutes dans IGV, après avoir fait le contrôle de qualité et combiné les duplicatas, nous avons constaté que la couverture de chaque nucléosome ne dépassait pas 4X dans nos régions d'étude (*CYP1A1* et *CYP1B1*).

La présence d'un biais dans les premières bases a certainement eu un impact sur la quantité de lectures de séquençage obtenues pour chaque échantillon. Pour un des échantillons traités au TCDD, nous avons obtenu un nombre très faible de lectures de séquençage (82 millions de séquences avant le contrôle de qualité). Cet échantillon a été reséquencé en ajoutant de l'ADN de phage (PhiX) afin d'augmenter la diversité des premières bases, ce qui a considérablement amélioré le nombre de lectures de séquençage obtenues, le faisant plus que doubler. Cependant, le biais observé des premières bases ainsi que leur moins bon alignement sur le génome était toujours présent dans l'échantillon reséquencé.

Une hypothèse qui pourrait expliquer le biais observé lors du séquençage des premières bases, surtout la présence d'un A en première position, serait attribuable à la préférence de la MNase de cliver des séquences A/T riches. Une autre hypothèse est que, lors de la fabrication des librairies de séquençage avec le kit Illumina, le A pourrait provenir de l'étape d'adénylation des fragments d'ADN en 3', qui sert à empêcher que les fragments d'ADN ne se religuent sur eux-mêmes lors de la ligation des adaptateurs. Ce sont des hypothèses qui pour être testées nécessiteraient d'une part d'utiliser en parallèle des MNases de différentes compagnies pour effectuer des digestions, et d'une autre part de comparer plusieurs services de préparation de librairies et de séquençage.

Le nombre de lectures de séquences requis pour tirer des conclusions d'expériences de séquençage à haut débit dépend du but de l'expérience elle-même. Dans notre cas, je crois que nos résultats de MNase-seq sont en mesure de nous fournir une bonne idée du positionnement putatif des nucléosomes à *CYP1A1* et *CYP1B1*, puisque ce sont ces gènes qui nous intéressent. Nous disposons de données pour le génome entier, donc il serait également possible d'obtenir l'information sur la position des nucléosomes pour d'autres gènes.

Malheureusement, les résultats obtenus avec le MNase-seq ne montrent pas de changement dramatique par rapport au positionnement des nucléosomes aux promoteurs de *CYP1A1* et *CYP1B1* avant et après traitements au TCDD. Dans le but de comparer la position de nucléosomes entre deux conditions, un nombre plus robuste de lectures aurait été nécessaire afin de couvrir plusieurs fois la position de chaque nucléosome à travers tout le génome quantitatif. Une estimation du nombre 'nécessaire' requis pour atteindre cet objectif est ~ 450-750 millions de lectures de séquençage (Zhang et Pugh, 2011), mais ce sont des valeurs arbitraires et il n'existe aucun consensus sur le sujet à ce jour. Nous n'avons malencontreusement pas obtenu une couverture suffisante du génome, ce qui rend difficile la comparaison entre nos deux conditions puisque des changements subtils pourraient être ratés, surtout lorsqu'on regarde le positionnement de nucléosome dans une population de cellules.

Les résultats obtenus lors de mes travaux suggèrent que le MNase-seq n'est peut-être pas la technique la plus adéquate pour étudier le positionnement différentiel de nucléosomes entre différentes conditions, et d'autres approches mentionnées dans les perspectives pourraient être envisageables. Le génome humain ayant une taille considérable (3,2 milliards de paires de bases) comparativement à d'autres organismes, il est crucial d'avoir le nombre le plus élevé possible de lectures de séquençage pour le couvrir de manière quantitative.

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer pourquoi nous n'observons pas ou très peu de différences à *CYP1A1* et *CYP1B1* entre les deux traitements est la quantité de cellules qui répondent aux traitements au TCDD. En effet, nous ne savons pas si toutes les cellules induisent *CYP1A1* et *CYP1B1*. Donc, l'absence ou le peu d'effet sur le positionnement de nucléosomes pourrait être dû au fait que seulement une petite sous-population de cellules est induite et exprime les CYPs, d'où l'impossibilité d'observer des changements clairs. Pour vérifier cela, on pourrait effectuer des expériences de FISH ARN contre *CYP1A1* et *CYP1B1* sur des MCF7 en culture avant et après traitements au TCDD, ou encore de l'immunofluorescence pour voir l'accumulation des deux enzymes.

Il est largement établi que les nucléosomes et les facteurs de transcription compétitionnent pour l'accès à des séquences d'ADN, ce qui constitue un des mécanismes par lequel les nucléosomes influencent l'activité transcritivienne. C'est pourquoi la plupart des sites de liaison de facteurs de transcription se retrouvent dans des régions dépourvues de nucléosomes, où l'accessibilité à ces sites est augmentée à cause de la faible densité de nucléosomes. Cependant, certains facteurs de transcription peuvent se lier à l'ADN sur la surface externe du nucléosome, mais l'occlusion stérique des sites à l'intérieur et la forte courbure de l'ADN autour du nucléosome empêche la plupart des facteurs de transcription de lier l'ADN nucléosomal (Goh *et al.*, 2010). Des travaux parus en 2010 ont comparé des données de cartographie de nucléosomes de chromatine ponté et non ponté au formaldéhyde (Goh *et al.*, 2010). Ils ont observé que la densité de nucléosome était préférentiellement accrue aux sites

de liaison de facteurs de transcription lorsque la chromatine avait été pontée au formaldéhyde, comparativement à la chromatine non pontée. Or, j'ai utilisé des conditions de chromatine pontée au formaldéhyde pour mes expériences de MNase-seq, mais j'observe tout de même une faible densité nucléosomale aux XREs clés où se lie AhR à *CYP1A1* et *CYP1B1*. Leurs observations sont néanmoins très intéressantes et il serait envisageable de vérifier par CHIP ou Mono-CHIP ces différentes conditions. Le pontage chimique ne devrait pas être nécessaire si les nucléosomes sont suffisamment stables pour que leur localisation reste la même à la fin de l'expérience que lorsqu'*in vivo*. Toutefois, pour certains nucléosomes, une fragilité (forte sensibilité d'un nucléosome à la MNase) peu être observée et causée par l'instabilité des coeurs d'histones, qui peut-être compensée par un pontage chimique avant les traitements à la MNase. Or, beaucoup de nucléosomes 'fragiles' ont été constatés à des loci initialement identifiés comme étant 'dépourvue de nucléosomes' (Xi *et al.*, 2011). Donc, cartographier le positionnement de nucléosomes en utilisant des conditions de digestions MNase qui préservent ces nucléosomes plus fragiles pourrait révéler un autre niveau de complexité dans l'organisation des nucléosomes et plus facilement mettre en évidence un lien entre ceux-ci et la régulation de la transcription.

Enfin, des différences ont été observées au niveau de la présence de certaines histones entre les expériences de MNase-seq et celles de ChIPs et Mono-ChIPs et une raison qui pourrait expliquer cela est un changement au niveau des cellules MCF7 utilisées entre ces expériences. Les cellules MCF7, sur lesquelles les digestions MNase pour le MNase-seq ont été réalisées, ont cessé de répondre de manière attendue aux traitements au TCDD à nos gènes cibles. En ChIP, nous n'observons plus de liaison de AhR et de l'ARN pol II aux promoteurs de *CYP1A1* et *CYP1B1* suite aux traitements au TCDD, même si une induction des gènes en ARNm était détectable. Des cellules MCF7 provenant de ATCC ont été testées et elles répondaient de manière attendue au TCDD, donc ces cellules ont été utilisées pour toutes les expériences subséquentes. Même si ces cellules d'ATCC portent le même nom que nos anciennes cellules MCF7, des différences flagrantes sont notables lors de la culture de ces cellules. En effet, elles sont morphologiquement différentes des anciennes MCF7 et leur temps

de doublement est significativement plus long, ce qui n'exclut pas que d'autres différences existent. Évidemment, ce sont des cellules cancéreuses, qui à la base ont déjà un potentiel de transformation (mutation) élevé, mais les différences observées entre des lignées cellulaires censées être 'identiques' sont inquiétantes. Selon la source et les conditions de cultures utilisées, les cellules peuvent répondre différemment et cela pourrait en partie expliquer les divergences et le manque de reproductibilité entre laboratoires.

PERSPECTIVES

Nous savons que H2A.Z est important pour l'induction de *CYP1A1* et *CYP1B1*, mais son rôle semble différent dans la régulation de l'expression de ces deux gènes (Marques *et al.*, 2013, en révision). Malheureusement, je n'ai pas eu le temps au cours de ma maîtrise d'approfondir le rôle de H2A.Z dans la structure de la chromatine à *CYP1A1* et surtout à *CYP1B1*. Il serait donc intéressant de voir si la déplétion de H2A.Z dans les cellules MCF7 affecte les niveaux de H3 et modifie le positionnement de nucléosomes à ces gènes, avant et après traitements au TCDD. Des expériences de séquençages précédés d'une étape d'enrichissement par hybridation soustractive avec la technologie SureSelect d'Agilent serait une bonne alternative au manque de résolution du séquençage 'classique'. Dans le laboratoire, nous nous intéressons à la régulation de l'expression de deux gènes cibles de AhR, mais il serait intéressant, avec des données de séquençage à haut débit ou d'autres technique de haute résolution (ex : LM-PCR), d'analyser le positionnement de nucléosomes à d'autres gènes cibles de AhR.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, D.W., Ivanova, V.S., Wang, X., Bonner, W.M. et Ausio, J. (2001). Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation. *J Biol Chem* 276, 41945-41949.

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

Aggarwal, B.B. et Ichikawa, H. (2005). Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* 4, 1201-1215.

Ahmad, K. et Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* 9, 1191-1200.

Albert, I., Mavrich, T.N., Tomsho, L.P., Qi, J., Zanton, S.J., Schuster, S.C. et Pugh, B.F. (2007). Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 446, 572-576.

Bai, L. et Morozov, A.V. (2010). Gene regulation by nucleosome positioning. *Trends in genetics* : TIG 26, 476-483.

Banerjee, T. et Chakravarti, D. (2011). A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Mol Cell Biol* 31, 4858-4873.

Bannister, A.J. et Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 21, 381-395.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. et Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.

Beischlag, T.V. et Perdew, G.H. (2005). ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J Biol Chem* 280, 21607-21611.

Chadwick, B.P. et Willard, H.F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *The Journal of cell biology* *152*, 375-384.

Chen, K., Xi, Y., Pan, X., Li, Z., Kaestner, K., Tyler, J., Dent, S., He, X. et Li, W. (2012). DANPOS: Dynamic Analysis of Nucleosome Position and Occupancy by Sequencing. *Genome Res.*

Clapier, C.R. et Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* *78*, 273-304.

Clarkson, M.J., Wells, J.R., Gibson, F., Saint, R. et Tremethick, D.J. (1999). Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* *399*, 694-697.

Conaway, R.C. et Conaway, J.W. (2011). Function and regulation of the Mediator complex. *Curr Opin Genet Dev* *21*, 225-230.

Corchero, J., Pimprale, S., Kimura, S. et Gonzalez, F.J. (2001). Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics* *11*, 1-6.

Costanzi, C. et Pehrson, J.R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* *393*, 599-601.

Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C. et Barouki, R. (2001). Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res* *61*, 3942-3948.

Creyghton, M.P., Markoulaki, S., Levine, S.S., Hanna, J., Lodato, M.A., Sha, K., Young, R.A., Jaenisch, R. et Boyer, L.A. (2008). H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. *Cell* *135*, 649-661.

Dahmus, M.E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* *271*, 19009-19012.

Denison, M.S., Fisher, J.M. et Whitlock, J.P., Jr. (1988). The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem* *263*, 17221-17224.

Denison, M.S. et Nagy, S.R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* *43*, 309-334.

Dhillon, N., Oki, M., Szyjka, S.J., Aparicio, O.M. et Kamakaka, R.T. (2006). H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. *Mol Cell Biol* 26, 489-501.

Duan, R., Porter, W., Samudio, I., Vyhldal, C., Kladdé, M. et Safe, S. (1999). Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Endocrinol* 13, 1511-1521.

Eberharter, A. et Becker, P.B. (2004). ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J Cell Sci* 117, 3707-3711.

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

Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C. et Tremethick, D.J. (2002). The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol* 9, 172-176.

Fan, J.Y., Rangasamy, D., Luger, K. et Tremethick, D.J. (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1alpha-mediated chromatin fiber folding. *Mol Cell* 16, 655-661.

Fedor, M.J., Lue, N.F. et Kornberg, R.D. (1988). Statistical positioning of nucleosomes by specific protein-binding to an upstream activating sequence in yeast. *J Mol Biol* 204, 109-127.

Field, Y., Kaplan, N., Fondufe-Mittendorf, Y., Moore, I.K., Sharon, E., Lubling, Y., Widom, J. et Segal, E. (2008). Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS computational biology* 4, e1000216.

Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M. et Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* 21, 1869-1881.

Gevry, N., Hardy, S., Jacques, P.E., Laflamme, L., Sotelis, A., Robert, F. et Gaudreau, L. (2009). Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes Dev* 23, 1522-1533.

Gillesby, B.E., Stanostefano, M., Porter, W., Safe, S., Wu, Z.F. et Zacharewski, T.R. (1997). Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry* 36, 6080-6089.

Gkikopoulos, T., Schofield, P., Singh, V., Pinskaya, M., Mellor, J., Smolle, M., Workman, J.L., Barton, G.J. et Owen-Hughes, T. (2011). A role for Snf2-related nucleosome-spacing enzymes in genome-wide nucleosome organization. *Science* 333, 1758-1760.

Goh, W.S., Orlov, Y., Li, J. et Clarke, N.D. (2010). Blurring of high-resolution data shows that the effect of intrinsic nucleosome occupancy on transcription factor binding is mostly regional, not local. *PLoS computational biology* 6, e1000649.

Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F. et Gaudreau, L. (2005). Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* 3, e384.

Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 307-340.

Hardy, S., Jacques, P.E., Grévy, N., Forest, A., Fortin, M.E., Laflamme, L., Gaudreau, L. et Robert, F. (2009). The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet*.

Harris, M., Zacharewski, T. et Safe, S. (1990). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds on the occupied nuclear estrogen receptor in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 50, 3579-3584.

Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T. et McMahon, M. (2009). Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. *Toxicol Sci* 111, 199-201.

Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D. et Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* 6, 2288-2298.

Imbalzano, A.N., Kwon, H., Green, M.R. et Kingston, R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370, 481-485.

Iouzalén, N., Moreau, J. et Mechali, M. (1996). H2A.ZI, a new variant histone expressed during *Xenopus* early development exhibits several distinct features from the core histone H2A. *Nucleic Acids Res* 24, 3947-3952.

Iyer, V.R. (2012). Nucleosome positioning: bringing order to the eukaryotic genome. *Trends in cell biology* 22, 250-256.

Jaiswal, A.K., Nebert, D.W., McBride, O.W. et Gonzalez, F.J. (1987). Human P(3)450: cDNA and complete protein sequence, repetitive Alu sequences in the 3' nontranslated region, and localization of gene to chromosome 15. *Journal of experimental pathology* 3, 1-17.

Jensen, K., Santisteban, M.S., Urekar, C. et Smith, M.M. (2011). Histone H2A.Z acid patch residues required for deposition and function. *Molecular genetics and genomics* : MGG 285, 287-296.

Jiang, C. et Pugh, B.F. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet* 10, 161-172.

Jin, C. et Felsenfeld, G. (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev* 21, 1519-1529.

Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K. et Felsenfeld, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* 41, 941-945.

Johnson, S.M., Tan, F.J., McCullough, H.L., Riordan, D.P. et Fire, A.Z. (2006). Flexibility and constraint in the nucleosome core landscape of *Caenorhabditis elegans* chromatin. *Genome Res* 16, 1505-1516.

Kalocsay, M., Hiller, N.J. et Jentsch, S. (2009). Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Mol Cell* 33, 335-343.

Kamakaka, R.T. et Biggins, S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev* 19, 295-310.

Kaplan, N., Moore, I.K., Fondufe-Mittendorf, Y., Gossett, A.J., Tillo, D., Field, Y., LeProust, E.M., Hughes, T.R., Lieb, J.D., Widom, J., *et al.* (2009). The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature* 458, 362-366.

Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L. et Pongratz, I. (2001). The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol* 21, 2594-2607.

Kharat, I. et Saatcioglu, F. (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J Biol Chem* 271, 10533-10537.

- Kietz, S., Feng, S., Agoulnik, A. et Hombach-Klonisch, S. (2009). Estrogen and TCDD influence RLN2 gene activity in estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 1160, 367-373.
- Kim, D.W., Gazourian, L., Quadri, S.A., Romieu-Mourez, R., Sherr, D.H. et Sonenshein, G.E. (2000). The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* 19, 5498-5506.
- Kimura, S., Gonzalez, F.J. et Nebert, D.W. (1986). Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible P(1)450 and P(3)450 genes: differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. *Mol Cell Biol* 6, 1471-1477.
- Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K. et Fujii-Kuriyama, Y. (1997). CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J Biochem* 122, 703-710.
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K. et Kobayashi, K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect* 112, 524-531.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Krishnan, V., Porter, W., Santostefano, M., Wang, X. et Safe, S. (1995). Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol* 15, 6710-6719.
- Ku, M., Jaffe, J.D., Koche, R.P., Rheinbay, E., Endoh, M., Koseki, H., Carr, S.A. et Bernstein, B.E. (2012). H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions. *Genome biology* 13, R85.
- Kumar, M.B. et Perdew, G.H. (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr* 8, 273-286.
- Kumar, M.B., Tarpey, R.W. et Perdew, G.H. (1999). Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J Biol Chem* 274, 22155-22164.
- Lantermann, A.B., Straub, T., Stralfors, A., Yuan, G.C., Ekwall, K. et Korber, P. (2010). Schizosaccharomyces pombe genome-wide nucleosome mapping reveals positioning

mechanisms distinct from those of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol* *17*, 251-257.

Lassmann, T., Hayashizaki, Y. et Daub, C.O. (2011). SAMStat: monitoring biases in next generation sequencing data. *Bioinformatics* *27*, 130-131.

Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R.H., Davis, R.W., Hughes, T.R. et Nislow, C. (2007). A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet* *39*, 1235-1244.

Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Gutierrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J. et Workman, J.L. (2005). Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 18385-18390.

Li, H. et Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* *25*, 1754-1760.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. et Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* *25*, 2078-2079.

Linden, J., Lensu, S., Tuomisto, J. et Pohjanvirta, R. (2010). Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Frontiers in neuroendocrinology* *31*, 452-478.

Liu, X., Li, B. et GorovskyMa (1996). Essential and nonessential histone H2A variants in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* *16*, 4305-4311.

Lomvardas, S. et Thanos, D. (2002). Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture. *Cell* *110*, 261-271.

Luk, E., Ranjan, A., Fitzgerald, P.C., Mizuguchi, G., Huang, Y., Wei, D. et Wu, C. (2010). Stepwise histone replacement by SWR1 requires dual activation with histone H2A.Z and canonical nucleosome. *Cell* *143*, 725-736.

Malik, S. et Roeder, R.G. (2010). The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* *11*, 761-772.

Marinkovic, N., Pasalic, D., Ferencak, G., Grskovic, B. et Stavljenic Rukavina, A. (2010). Dioxins and human toxicity. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* *61*, 445-453.

- Marques, M., Laflamme, L., Gervais, A.L. et Gaudreau, L. (2010). Reconciling the positive and negative roles of histone H2A.Z in gene transcription. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 5, 267-272.
- Martens, J.A. et Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* 13, 136-142.
- Martucci, C.P. et Fishman, J. (1993). P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacology & therapeutics* 57, 237-257.
- Maston, G.A., Evans, S.K. et Green, M.R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual review of genomics and human genetics* 7, 29-59.
- Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A. et Roeder, R.G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem* 255, 11992-11996.
- Matthews, J., Wihlen, B., Thomsen, J. et Gustafsson, J.A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Mol Cell Biol* 25, 5317-5328.
- Mavrich, T.N., Ioshikhes, I.P., Venters, B.J., Jiang, C., Tomsho, L.P., Qi, J., Schuster, S.C., Albert, I. et Pugh, B.F. (2008a). A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res* 18, 1073-1083.
- Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, I.P., Li, X., Venters, B.J., Zanton, S.J., Tomsho, L.P., Qi, J., Glaser, R.L., Schuster, S.C., *et al.* (2008b). Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* 453, 358-362.
- McGhee, J.D. et Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* 49, 1115-1156.
- Meneghini, M.D., Wu, M. et Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* 112, 725-736.
- Millau, J.F. et Gaudreau, L. (2011). CTCF, cohesin, and histone variants: connecting the genome. *Biochem Cell Biol* 89, 505-513.
- Mimura, J. et Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619, 263-268.

Murray, G.I., Taylor, M.C., McFadyen, M.C., McKay, J.A., Greenlee, W.F., Burke, M.D. et Melvin, W.T. (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57, 3026-3031.

Nebert, D.W. et Gonzalez, F.J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56, 945-993.

Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., *et al.* (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.

Nguyen, L.P. et Bradfield, C.A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 21, 102-116.

Nguyen, T.A., Hoivik, D., Lee, J.E. et Safe, S. (1999). Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch Biochem Biophys* 367, 250-257.

Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., *et al.* (2007). Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562-566.

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., *et al.* (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550.

Opitz, C.A., Litzzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., *et al.* (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197-203.

Papamichos-Chronakis, M., Watanabe, S., Rando, O.J. et Peterson, C.L. (2011). Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* 144, 200-213.

Park, Y.J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J. et Luger, K. (2004). A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J Biol Chem* 279, 24274-24282.

Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M. et Bonner, W.M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* 10, 886-895.

Phatnani, H.P. et Greenleaf, A.L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.

Placek, B.J., Harrison, L.N., Villers, B.M. et Gloss, L.M. (2005). The H2A.Z/H2B dimer is unstable compared to the dimer containing the major H2A isoform. *Protein Sci* 14, 514-522.

Poland, A. et Glover, E. (1977). Chlorinated biphenyl induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity: a study of the structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 13, 924-938.

Porter, W., Wang, F., Duan, R., Qin, C., Castro-Rivera, E., Kim, K. et Safe, S. (2001). Transcriptional activation of heat shock protein 27 gene expression by 17beta-estradiol and modulation by antiestrogens and aryl hydrocarbon receptor agonists. *J Mol Endocrinol* 26, 31-42.

Puga, A., Barnes, S.J., Dalton, T.P., Chang, C., Knudsen, E.S. et Maier, M.A. (2000). Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J Biol Chem* 275, 2943-2950.

Radman-Livaja, M. et Rando, O.J. (2010). Nucleosome positioning: how is it established, and why does it matter? *Developmental biology* 339, 258-266.

Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J. et Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233-248.

Rando, O.J. et Chang, H.Y. (2009). Genome-wide views of chromatin structure. *Annu Rev Biochem* 78, 245-271.

Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P. et Tremethick, D.J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J* 22, 1599-1607.

Rogakou, E.P. et Sekeri-Pataryas, K.E. (1999). Histone variants of H2A and H3 families are regulated during in vitro aging in the same manner as during differentiation. *Experimental gerontology* 34, 741-754.

Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W. et Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45, 5671-5677.

Sadeh, R. et Allis, C.D. (2011). Genome-wide "re"-modeling of nucleosome positions. *Cell* 147, 263-266.

Santisteban, M.S., Kalashnikova, T. et Smith, M.M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411-422.

Sarkar, S., Jana, N.R., Yonemoto, J., Tohyama, C. et Sone, H. (2000). Estrogen enhances induction of cytochrome P-4501A1 by 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in liver of female Long-Evans rats. *Int J Oncol* 16, 141-147.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G. et Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* 132, 887-898.

Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. et Wu, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406, 541-544.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A. et Casero, R.A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.

Shimada, K., Oma, Y., Schleker, T., Kugou, K., Ohta, K., Harata, M. et Gasser, S.M. (2008). Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Curr Biol* 18, 566-575.

Shivaswamy, S., Bhinge, A., Zhao, Y., Jones, S., Hirst, M. et Iyer, V.R. (2008). Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol* 6, e65.

Spink, D.C., Spink, B.C., Cao, J.Q., DePasquale, J.A., Pentecost, B.T., Fasco, M.J., Li, Y. et Sutter, T.R. (1998). Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *Carcinogenesis* 19, 291-298.

Stejskalova, L., Dvorak, Z. et Pavek, P. (2011). Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art. *Current drug metabolism* 12, 198-212.

Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J. et Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol* 7, 1121-1124.

Svaren, J. et Horz, W. (1997). Transcription factors vs nucleosomes: regulation of the PHO5 promoter in yeast. *Trends Biochem Sci* 22, 93-97.

Takeuchi, S., Iida, M., Yabushita, H., Matsuda, T. et Kojima, H. (2008). In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere* 74, 155-165.

Talbert, P.B. et Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 264-275.

Thambirajah, A.A., Dryhurst, D., Ishibashi, T., Li, A., Maffey, A.H. et Ausio, J. (2006). H2A.Z stabilizes chromatin in a way that is dependent on core histone acetylation. *J Biol Chem* 281, 20036-20044.

Thatcher, T.H. et Gorovsky, M.A. (1994). Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* 22, 174-179.

Thomas, J.O. (1999). Histone H1: location and role. *Current opinion in cell biology* 11, 312-317.

Thomas, M.C. et Chiang, C.M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 41, 105-178.

Tian, Y., Ke, S., Denison, M.S., Rabson, A.B. et Gallo, M.A. (1999). Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem* 274, 510-515.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M. et Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer letters* 227, 115-124.

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P. et Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811-816.

Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenchock, B.A. et Blobel, G.A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* 19, 381-391.

Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., Zeng, K., Malek, J.A., Costa, G., McKernan, K., *et al.* (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res* 18, 1051-1063.

van Daal, A. et Elgin, S.C. (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell* 3, 593-602.

Wang, A.Y., Aristizabal, M.J., Ryan, C., Krogan, N.J. et Kobor, M.S. (2011). Key functional regions in the histone variant H2A.Z C-terminal docking domain. *Mol Cell Biol* 31, 3871-3884.

Wang, F., Samudio, I. et Safe, S. (2001). Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Cell Endocrinol* 172, 91-103.

Wang, F., Wang, W. et Safe, S. (1999). Regulation of constitutive gene expression through interactions of Sp1 protein with the nuclear aryl hydrocarbon receptor complex. *Biochemistry* 38, 11490-11500.

Weber, C.M., Henikoff, J.G. et Henikoff, S. (2010). H2A.Z nucleosomes enriched over active genes are homotypic. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1500-1507.

Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R. et Safe, S. (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 23, 1843-1855.

Xi, Y., Yao, J., Chen, R., Li, W. et He, X. (2011). Nucleosome fragility reveals novel functional states of chromatin and poises genes for activation. *Genome Res* 21, 718-724.

Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J. et Rando, O.J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* 309, 626-630.

Zhang, H., Roberts, D.N. et Cairns, B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219-231.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., *et al.* (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology* 9, R137.

Zhang, Z. et Pugh, B.F. (2011). High-resolution genome-wide mapping of the primary structure of chromatin. *Cell* 144, 175-186.

Zhang, Z., Wippo, C.J., Wal, M., Ward, E., Korber, P. et Pugh, B.F. (2011). A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science* 332, 977-980.

Zhao, X., Pendergrast, P.S. et Hernandez, N. (2001). A positioned nucleosome on the human U6 promoter allows recruitment of SNAPc by the Oct-1 POU domain. *Mol Cell* 7, 539-549.

Zhou, V.W., Goren, A. et Bernstein, B.E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* 12, 7-18.

Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. et Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125-129.

Zlatanova, J. et Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure* 16, 166-179.