

**ÉTUDE DU LIEN ANTAGONISTE EXISTANT ENTRE LA MÉTHYLATION DE
L'ADN ET LE VARIANT D'HISTONE H2A.Z : RÔLE DU COMPLEXE TIP60/P400**

par

Marc-Antoine Paul-Ouellet

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

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, décembre 2022

Le 18 décembre 2022

Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Marc-Antoine Paul-Ouellet dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Luc R. Gaudreau
Directeur de recherche
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Nicolas Gévry
Évaluateur interne
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Viktor Steimle
Président-rapporteur
Département de biologie
Université de Sherbrooke

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Luc R. Gaudreau, pour m'avoir laissé la chance de démontrer mes compétences et mes aptitudes à travers mes travaux de recherches. Tu m'as montré à quel point je pouvais dépasser mes limites et que je pouvais relever des défis à laquelle je ne pensais pas être en mesure d'y parvenir. L'étudiant que j'étais en arrivant dans le laboratoire n'est plus le même qu'aujourd'hui et cela grâce à toi.

Je tiens aussi à remercier mes conseillers, Dr Nicolas Gévry et Dr Viktor Steimle, pour leurs judicieux conseils ainsi que pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de ma maîtrise.

Ensuite, j'aimerais remercier ma famille qui m'a soutenu tout au long de mes études graduées. J'aimerais également souligner l'implication de ma mère ainsi que de mes bons amis André et Jean-François, vous m'avez montré que malgré les hauts et les bas, j'étais en mesure de réussir tout ce que j'entreprends.

Finalement, j'aimerais remercier mes collègues, Nadia Côté et Sarah Benregaya, sans vous, mes journées au laboratoire n'auraient pas été pareilles. Je vais m'ennuyer de nos discussions de tout genre pendant nos manipulations. Les fonds du CRSNG ont contribué à ce projet de recherche.

SOMMAIRE

Depuis quelques années, les recherches ont permis de constater que certains cas de cancer proviennent de dérégulations épigénétiques au niveau du génome. Ces changements épigénétiques sont réversibles, ce qui permet de développer de nouvelles approches thérapeutiques comme dans le cas des inhibiteurs de méthyltransférases (Dnmt). Il a été démontré que les fonctions aberrantes des Dnmt sont fréquemment associées à la tumorigenèse. Effectivement, les Dnmt semblent responsables de l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que de l'instabilité génomique, ce qui permet d'augmenter la malignité des tumeurs. Ces aberrations des Dnmt aggravent le pronostic des patients et augmentent la difficulté lors des traitements du cancer. Donc, la dégradation des Dnmt devient importante, car la régulation fine de l'abondance de celles-ci par le biais d'une régulation post-traductionnelle permet de supprimer le développement tumoral. De l'autre côté, le variant d'histone H2A.Z, qui permet de promouvoir la transcription des gènes, semble en mesure de protéger certains gènes de l'atténuation génique due à la méthylation de l'ADN. Dans la littérature, il a été démontré qu'il existait une relation antagoniste entre la méthylation de l'ADN et le variant d'histone H2A.Z, ce qui suggère que l'incorporation de l'un peut prévenir l'autre. De plus, un troisième acteur, le complexe Tip60/p400, semble impliqué dans la régulation entre la méthylation de l'ADN et H2A.Z et pourrait permettre de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes.

Dans le cadre de mes travaux de recherches, je me suis concentré sur les progrès récents des mécanismes moléculaires existants entre le variant d'histone H2A.Z et la méthylation de l'ADN, mais en particulier sur la façon dont le complexe Tip60/p400 permet de réguler la méthylation de l'ADN et l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine. D'une part, en induisant la dégradation de Dnmt1 ainsi que Dnmt3B. D'une autre, en maintenant certaines régions régulatrices libres de méthylation de novo.

Le complexe Tip60-p400 serait associé préférentiellement à des régions contenant H2A.Z et protégerait ainsi ces régions de la méthylation de l'ADN en favorisant la dégradation de Dnmt3B. Il y aurait donc un mécanisme de modification des marques épigénétiques existant entre ces deux protéines. Pour ce faire, plusieurs essais d'acétylation in vitro ont permis de vérifier si la modification post-traductionnelle par Tip60/p400 est possible. Afin de mieux comprendre le rôle du complexe Tip60/p400 dans ce mécanisme, des protéines recombinantes ont été obtenues afin d'étudier dans quel segment de la protéine Dnmt3B il semblait y avoir de l'acétylation. Les résultats démontrent que cette modification semblait concentrer dans le domaine PWWP de la méthyltransférase ce qui permettrait de venir jouer sur la stabilité de la protéine en empêchant ces interactions protéine-protéine ou ADN-protéine. Ensuite, il a été possible d'observer comment est affecté le patron d'incorporation du variant d'histone H2A.Z et du complexe Tip60/p400 lorsque la méthylation génomique est abolie. Ceci permettrait de suivre l'ajout du variant d'histone lorsque la chromatine n'est pas méthylée dans les gènes activement transcrits. Des expériences de CHIP ont démontré que l'incorporation de H2A.Z par le complexe Tip60/p400 favorise la transcription et empêche la déposition de la méthylation de l'ADN près des promoteurs au niveau du gène p16INKa4.

Pour terminer, les résultats obtenus lors de mes travaux de maîtrise ont révélé d'importantes caractéristiques du complexe Tip60/p400, démontrant son rôle potentiel dans l'inhibition de la méthylation de l'ADN. Ces résultats pourront contribuer à comprendre les mécanismes par lesquels ces protéines sont dérégulées lors de maladie humaine comme le cancer.

Mots clés : Tip60/p400, Dnmt3B et H2A.Z.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION.....	1
1.1 La transcription génique chez les eucaryotes.....	1
1.2 La chromatine.....	4
1.2.1 Les histones.....	6
1.3 Les modifications épigénétiques de la chromatine	7
1.3.1 Méthylation de l'ADN	8
1.3.2 Modifications post-traductionnelles des histones	11
1.3.3 Variant d'histone H2A.Z.....	12
1.4 Relation antagoniste entre H2A.Z et la méthylation de l'ADN	15
1.5 Le complexe Tip60/p400	16
1.5.1 Sous-unité Tip60	17
1.5.2 Sous-unité p400.....	18
1.6 Complexe Tip60/p400 : rôle dans la relation antagoniste existant entre la méthylation de l'ADN et le variant d'histone H2A.Z.....	19
1.7 Description du projet de recherche	20
CHAPITRE 2 - MATÉRIEL ET MÉTHODE	21
2.1 Souches bactériennes, plasmides et milieux	21
2.2 Transformations des souches bactériennes	21
2.3 Extraction et manipulation de l'ADN	21
2.4 Surexpression de gènes de fusion dans E. coli.....	22

2.5 Lyse bactérienne et purification de la protéine de fusion sous condition non dénaturante	23
2.6 Essai d'acétylation in vitro.....	23
2.7 Culture cellulaire.....	24
2.8 Essai de stabilité protéique en utilisant le cycloheximide.....	24
2.9 Essai d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	25
2.10 Purification de noyau à partir de cellule HCT 116 et immunobuvardage de type Western	26
CHAPITRE 3 - RÉSULTATS	28
3.1 Expression de protéines de fusion de différentes régions de la méthyltransférase Dnmt3B	28
3.2 Application d'un essai d'acétylation in vitro afin d'identifier les lysines acétylées au niveau des différents fragments de la méthyltransférases Dnmt3B.....	29
3.3 Optimisation du protocole d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) chez les cellules humaines HCT116	32
3.4 La localisation génomique de H2A.Z/ARN polymérase II/histone H3 au niveau du gène p16INKa4 dans les cellules HCT116 WT et HCT116DNMT1-/-; DNMT3B-/-.....	34
CHAPITRE 4 - DISCUSSION ET CONCLUSION.....	40
4.1 Le complexe Tip60/p400 permet l'acétylation du domaine PWWP de la méthyltransférase Dnmt3B	40
4.2 L'hyperméthylation du gène suppresseur de tumeur p16 ^{INK4a} empêche l'activation de la transcription ainsi que la déposition du variant d'histone H2A.Z dans les cellules HCT116.....	41
4.3 H2A.Z est localisé au niveau du promoteur du gène p16INK4a lorsque la méthylation génomique est abolie (en absence de Dnmt1 et Dnmt3B), ce qui permet la réexpression du gène suppresseur de tumeur	43
BIBLIOGRAPHIE	47

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Tableau 1.1	Les facteurs généraux de la transcription et leurs fonctions	3
--------------------	--	---

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau 2.1	Souches bactériennes et leurs génotypes	22
Tableau 2.2	Amorces utilisées l'amplification des fragments Dnmt3B	24
Tableau 2.3	Anticorps utilisés pour les expériences CHIP	27
Tableau 2.4	Amorces utilisées pour l'analyse qPCR pour les expériences CHIP	27
Tableau 2.5	Tampons d'extractions nucléaires pour la purification de noyau des cellules HCT116 de type sauvage	28
Tableau 2.6	Anticorps utilisés pour les expériences de Western Blot	29

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1.1	Schéma représentant l'activation du complexe d'initiation de la transcription	3
Figure 1.2	Représentation des niveaux de compaction de la chromatine lors de l'interphase	6
Figure 1.3	Structure de base des principales méthyltransférases de l'ADN	11
Figure 1.4	Un rôle à la fois positif et négatif de H2A.Z dans l'expression des gènes	15
Figure 1.5	Schéma représentant la structure de l'acétyltransférase Tip60, une des sous-unités du complexe Tip60/p400	19
Figure 1.6	Schéma représentant la structure de l'ATPase p400, une des sous-unités du complexe Tip60/p400	20

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 2.1	Schéma de la structure des différents fragments de la méthyltransférase Dnmt3B utilisés pour les protéines de fusion	23
Figure 2.2	Schéma représentant les différents endroits du gène p16 ^{INKa4} amplifiés lors de l'analyse par qPCR	27

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Figure 3.1	Induction de l'expression du vecteur pGex6P1 contenant le fragment PWWP-GST à l'aide de 1 mM d'IPTG	31
Figure 3.2	Démonstration de la purification du complexe Tip60/p400 à l'aide de cellules HCT116 de type sauvage	32
Figure 3.3	Le complexe Tip60/p400 permet d'acétyler le domaine <i>PWWP</i> de la méthyltransférase Dnmt3B	34
Figure 3.4	Patron de migration de la chromatine des cellules HCT116 de type sauvage à la suite d'une sonication à l'aide du Bioruptor	36
Figure 3.5	Augmentation significative de l'enrichissement de la grosse sous-unité de l'ADN polymérase II aux différentes régions du locus du gène p16 ^{<i>INK4a</i>} chez les cellules HCT116 ayant une délétion pour les méthyltransférases	39
Figure 3.6	Le variant d'histone H2A.Z est enrichi à de fortes concentrations près du promoteur du gène p16 ^{<i>INK4a</i>} seulement chez les cellules HCT116 ayant une délétion pour les méthyltransférases	40
Figure 3.7	L'histone H3 est enrichie à de fortes concentrations au gène p16 ^{<i>INK4a</i>} seulement chez les cellules HCT116 de type sauvage	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Récepteur d'aryl hydrocarbure
ANP32E	Phosphoprotéine nucléaire riche en leucine 32
ARN	Acide ribonucléique
C	Cytosine
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
CHROMO	Chromodomaine
CpG	Cytosine – Phosphate – Guanine
CO ₂	Dioxyde de carbone
CYP	Cytochrome p450
DMEM	Milieu Eagle modifié de Dulbecco
DNMT	Méthyltransférase
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide diaminotétracarboxylique
ER	Récepteur des œstrogènes
FWD	Foward
FBS	Sérum de veau fœtal
G	Guanine
GADPH	Glycéraldéhyde – 3 – phosphate déshydrogénase
GST	Glutathion S-transférase
HCl	Acide chlorhydrique
IPTG	Isopropyl – β –D – thiogalactopyranoside
KO	Knock-out ou invalidation d'un gène
LB	Luria-Bertani
ml	Millilitre

mM	Milimolaire
MYST	Domaine histone acétyltransférase
NaCl	Chlorure de sodium
Nm	Nanomètre
NPC	Complexe de pore nucléaire
Pb	Paires de bases
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
Pen/Strep	Pénicilline – Streptomycine
PMSF	Fluorure de phenylméthanesulfonyle
PTM	Modification post-traductionnelle
PVDF	Polyfluorure de vinyldène
PWWP	Domaine Proline-Tryptophane-Tryptophane-Proline
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase en temps réel
Rcf	Force centrifuge relative
Rev	Reverse
Rpm	Révolution par minute
SDS	Dodécylsulfate de sodium
siRNA	Petits ARN interférants
T	Thymidine
TBP	Protéine de liaison à la boîte TATA
TSS	Site d'initiation de la transcription
µg/µl	Microgramme/microlitre
WT	Type sauvage
°C	Degré Celsius

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La transcription génique chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, pour de nombreux gènes codant pour une protéine, l'initiation de la transcription est une étape primordiale. Elle permet d'effectuer la lecture de l'information génétique contenue dans le gène, ce qui mène ultérieurement à l'expression de la protéine (Buccitelli et Selbach, 2020). Pour ce faire, les gènes sont organisés afin de faciliter le contrôle de l'expression et de la transcription. Une des premières régions indispensables pour l'initiation de la transcription est le promoteur, une région non transcrite de l'ADN (Wang et Stumph, 1995). Il se situe en amont du site d'initiation de la transcription où y réside la boîte TATA. Cette séquence riche en répétition d'acide nucléique thymines et adénines permet la liaison des facteurs généraux de la transcription ainsi que de l'ARN polymérase. Cependant, chez une très grande proportion des gènes, on ne retrouve pas de boîte TATA. En effet, elle est présente dans seulement 30 % des gènes transcrits. Tout de même, il a été démontré que la protéine TBP peut lier des variants de la séquence TATA et permettre le repliement de l'ADN. Ainsi, il semble que TBP peut être localisé à l'échelle du génome sur la plupart des promoteurs des eucaryotes même en absence de la boîte TATA (Sainsbury et al., 2015).

Afin de permettre la transcription d'un gène en ARN, il existe trois différents ARN polymérases chez les eucaryotes. Tout d'abord, l'ARN polymérase I permet de synthétiser la plupart des ARN ribosomiques de la cellule (Carter et Drouin, 2009). Par la suite, l'ARN polymérase III permet la synthèse des ARN de transfert. Enfin, il y a l'ARN polymérase II. Elle est essentielle lors de la transcription de la majorité des gènes (Carter et Drouin, 2009). Cependant, la polymérase seule n'est pas en mesure de reconnaître la séquence du promoteur et va avoir besoin de l'aide des facteurs généraux de la transcription. Ces protéines permettent de former ce que l'on appelle le complexe d'initiation de la transcription. Il existe différents facteurs généraux de

la transcription, mais chacun d'entre eux est nécessaire pour l'activation de la transcription (Feklistov, 2013). Les principaux facteurs généraux de transcription et leurs fonctions sont décrits dans le tableau 1.1.

Afin d'amorcer la transcription d'un gène, la structure formée de TFIID et d'ADN est stabilisée par l'arrivée de nouveaux facteurs tels que TFIIB et TFIIA (Gupta et Saki-Ak, 2016). Ces protéines sont rejointes par le complexe ARN polymérase II -TFIIF et ultérieurement par les facteurs TFIIE et TFIIH, ce qui complète le complexe de pré- initiation de la transcription (figure 1.1) (Yang et al., 2007). Afin de pouvoir commencer la synthèse de l'ARN messager, le facteur général de transcription TFIIH a un rôle important à jouer. Ce facteur doit être en mesure de permettre la dissociation des facteurs d'initiations de la transcription, ainsi que de la formation du complexe d'élongation (Sainsbury et al., 2015). Cet évènement devient possible grâce à la fonction kinase que contient TFIIH qui permet la phosphorylation de la queue C-terminale de l'ARN polymérase II. Par ailleurs, TFIIH contient aussi une fonction hélicase permettant la formation de la bulle de transcription, ce qui rend accessibles les brins d'ADN à la machinerie d'élongation. De plus, il est intéressant de constater que les cellules eucaryotes ont la propriété de contrôler si un gène est exprimé ou non, soit en variant la taille des cellules, le stade du cycle cellulaire ou encore en variant l'abondance de l'ARN polymérase II (Fraser et al., 2021).

Une autre composante importante de la machinerie transcriptionnelle permet de stimuler la transcription des gènes, il s'agit des activateurs de la transcription. Ils aident dans le recrutement d'une variété de protéine tels que les facteurs généraux de transcription, les ARN polymérases et les co-activateurs (Ma, 2011). Généralement, les activateurs de transcription sont composés de deux principaux domaines. L'un d'eux permet de lier l'ADN tandis que l'autre permet l'activation de la transcription (Ma, 2011). Ces protéines permettent de lier un site qui se situe près du promoteur ou parfois à des distances de plusieurs kilo paires de bases du promoteur. Dans le cas où le site se retrouve loin du promoteur, les activateurs s'appuient sur la flexibilité de l'ADN pour courber et rapprocher le site du promoteur (Green, 2005).

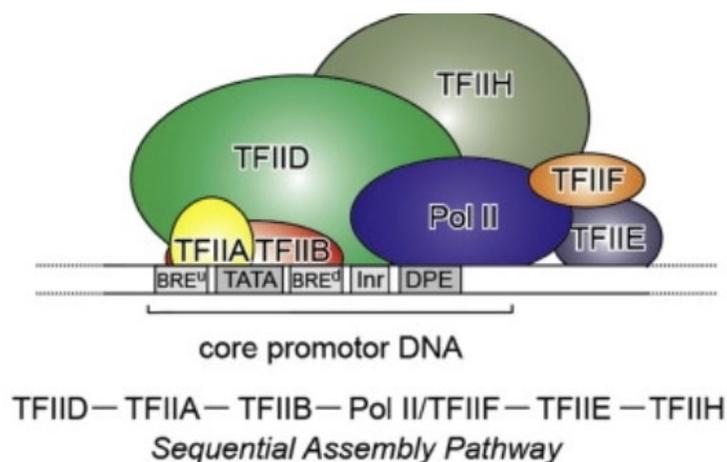


Fig. 1.1 Schéma représentant l’activation du complexe d’initiation de la transcription (Gupta et al., 2016). Le complexe de préinitiation est formé de façon séquentielle. Tout d’abord, la structure formée de TFIID et d’ADN est stabilisée par l’arrivée de nouveaux facteurs tels que TFIIB et TFIIA. Ces protéines sont rejointes par le complexe ARN polymérase II -TFIIF et ultérieurement par les facteurs TFIIIE et TFIIH, ce qui complète le complexe de pré- initiation de la transcription.

Tableau 1.1 Les facteurs généraux de transcriptions et leurs fonctions (Sainsbury et al., 2015)

Facteurs	Fonctions
TFIID	Lie le promoteur grâce à la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP), contient de nombreux facteurs associés de TBP.
TFIIB	Rôle de liaison à l’ADN, permet la sélection du TSS.
TFIIH	Contient une activité hélicase qui permet de dérouler la double hélice d’ADN.
TFIIIE	Permet de recruter TFIIH au complexe de préinitiation.
TFIIF	Permet de recruter l’ARN polymérase II au complexe de préinitiation.
TFIIA	Permet de stabiliser la liaison du facteur TFIID à l’ADN.

1.2 La chromatine

L'ADN est organisé en une forme hautement compactée appelée chromatine. Elle se compose principalement d'ADN et de protéines (Armeev et al., 2019). Les principales protéines de la chromatine sont les histones et seront discutées plus en détail dans la prochaine section. Il existe deux formes de chromatine, tout d'abord il y a l'euchromatine qui correspond à une forme de chromatine relâchée, ce qui permet une plus grande accessibilité à la machinerie transcriptionnelle (Morrison et Thakur, 2021). Elle est caractérisée par des modifications d'histones ainsi que la présence de variant afin de faciliter l'activation de la transcription (Morrison et Thakur, 2021). De l'autre côté, il y a aussi l'hétérochromatine. Elle correspond à une région transcriptionnellement moins active ainsi qu'une forme très condensée de chromatine (Morrison et Thakur, 2021). Ces régions sont associées en majorité avec le silençage génique et sont beaucoup moins accessibles que l'euchromatine (Morrison et Thakur, 2021).

Dans plusieurs études de microscopie, il a été observé que la chromatine ressemble à des billes superposées sur un filament d'ADN. Les petites billes observées correspondent aux nucléosomes. Ces derniers sont composés d'ADN enroulé autour de 8 histones (Bonev et Cavalli, 2016). Toutes ces structures peuvent être compactées plus ou moins à l'aide d'histones supplémentaires (variants d'histones) qui soutiennent la structure de la chromatine. Le premier niveau de compaction des nucléosomes correspond à une spirale de 30 nm appelée solénoïde (Bonev et Cavalli, 2016). Cependant, il y a des évidences supplémentaires qui démontrent qu'*in vivo*, il n'y aura pas de structure qui se rapproche de la fibre de 30 nm. Certes, certaines études démontrent plutôt un modèle de repliement irrégulier de la chromatine qui se rapproche à celui des ribosomes dans le cytoplasme (Magaña-Acosta et Valadez-Graham, 2020). La chromatine serait plutôt définie en une structure irrégulière de 10 nm formée avec des amas de nucléosomes que l'on nomme les nucléosomes clutches. Les amas de nucléosomes peuvent être d'une grosseur variés, ce qui permet de moduler la transcription des gènes (figure 1.2) (Portillo-ledesma et al., 2022).

Au niveau suivant de compaction se trouvent des boucles de chromatine appelées domaine d'association topologique (TADs) (Magaña-Acosta et Valadez-Graham, 2020). Elles sont formées par extrusion de boucles et permettent à des régions génomiques proches d'interagir. Les compartiments chromatiques sont le niveau suivant. Ils permettent entre autres de classer les gènes selon la compaction de la chromatine (relâchée ou compactée) (Wu et al., 2007). Ils existent deux types de compartiments chromatiques. En premier lieu, il y a le compartiment A qui contient en majorité des gènes transcriptionnellement actifs. Il est localisé dans la région centrale noyau près des NPCs, ce qui permet au gène de se retrouver dans un environnement permissif à la transcription (Wu et al., 2007). De l'autre côté, le compartiment B contient en majorité des gènes inactifs sur le plan transcriptionnel (Magaña-Acosta et Valadez-Graham, 2020). Il est localisé à la périphérie du noyau permettant les interactions avec la lamina nucléaire, ce qui permet au gènes de se retrouver dans un environnement répressif (Wu et al., 2007).

Pour terminer, le dernier niveau d'organisation correspond au positionnement des chromosomes dans le noyau, ce qu'on appelle les territoires chromosomiques (Magaña-Acosta et Valadez-Graham, 2020). Ces territoires ne sont pas disposés de façon aléatoire dans le noyau. Ils sont plutôt structurés selon la longueur génomique, la densité des gènes et l'activité transcriptionnelle. Ainsi, cette configuration permet de générer des quartiers génomiques actifs et répressifs distincts. Aussi, il est important de noter que ces territoires ne sont pas fixes. Il arrive fréquemment que des contacts intrachromosomiques surviennent entre les domaines riches en gènes actifs transcriptionnellement, ce qui permet l'activation et la régulation des gènes dans ces loci (Sarnataro et Chariello, 2017).

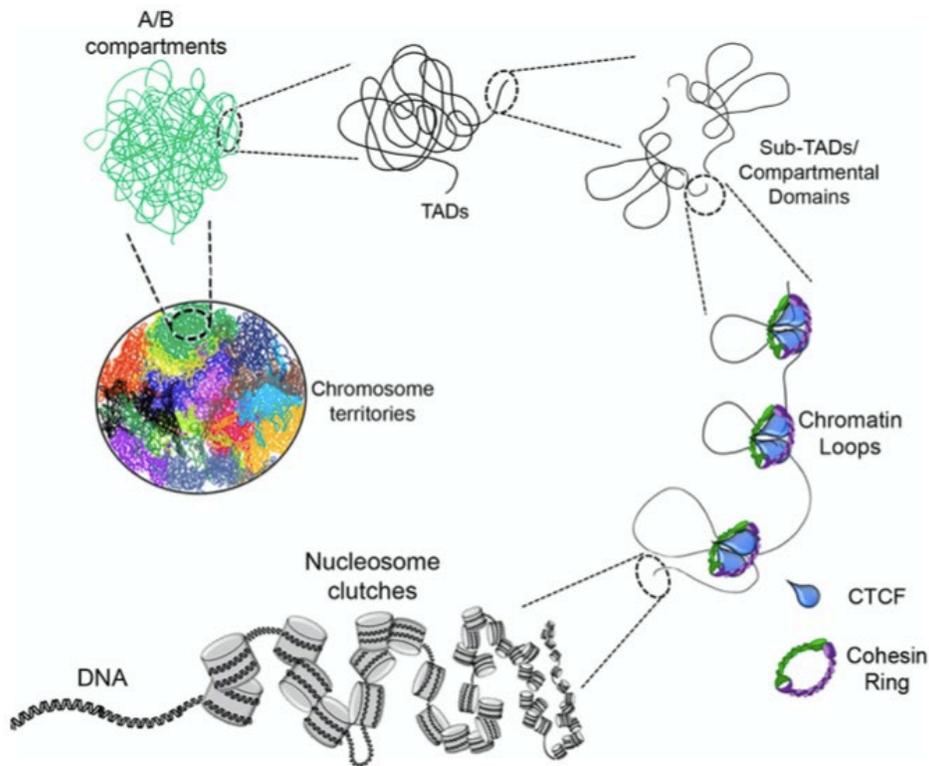


Fig. 1.2 Représentation des niveaux de compaction de la chromatine lors de l'interphase (Magaña-Acosta et Valadez-Graham, 2020). L'organisation de la chromatine chez les eucaryotes. L'ADN interagit avec les octomères d'histone et formera un amas de nucléosomes irréguliers. Au niveau suivant de compaction se trouvent des boucles de chromatine appelées domaine d'association topologique (TADs). Les compartiments chromatiques A/B sont le niveau suivant. Ils permettent entre autres de classifier les gènes selon la compaction de la chromatine (relâchée ou compactée). Le dernier niveau d'organisation correspond au positionnement des chromosomes dans le noyau, ce qu'on appelle les territoires chromosomiques (chaque couleur représente un chromosome différent).

1.2.1 Les histones

Les histones font partie de la structure fondamentale de la chromatine. Ces protéines permettent d'envelopper l'ADN dans une structure très serrée (Dueva et al., 2019). En d'autres mots, elles

agissent comme un élément d'emballage pour l'ADN. Les histones contiennent énormément d'acide aminé arginines et lysines sur leur queue N-terminale, ce qui permet d'obtenir une charge résiduelle positive (Dueva et al., 2019). Cette charge résiduelle permet aux histones d'obtenir une forte interaction avec les groupements phosphates de l'ADN ayant une charge négative.

Au niveau structurel, elles sont composées de trois hélices alpha séparées par deux boucles non structurées ainsi que d'une extension accessible et non structurée que l'on nomme la queue. Cette dernière est un site de modification présente sur les histones qui permet d'altérer la fonction individuelle des nucléosomes (Carter et Zhao, 2021). Chez les humains, on retrouve quatre histones centrales, H2A, H2B, H3 et H4, qui sont abondantes et permettent de former le cœur protéique autour duquel l'ADN sera enroulé (Schachner et al., 2021). En effet, ces protéines permettent de former le nucléosome qui aura un impact sur la fonction et la dynamique de la chromatine. Le nucléosome est formé grâce à l'association ordonnée du tétramère d'histone H3-H4 avec une molécule d'ADN. Par la suite, deux dimères des histones H2A-H2B se joignent aux tétramères d'histone pour compléter la structure (Cutter et J. Hayes, 2015).

1.3 Les modifications épigénétiques de la chromatine

Au niveau du génome, les gènes peuvent être activés ou réprimés par différents types de modifications chimiques appelés modifications épigénétiques. (Costa, 2010). Ces dernières correspondent à des changements réversibles et héréditaires survenant dans l'expression des gènes sans toutefois changer la séquence nucléotidique (Sharma et al., 2009). De plus, les mécanismes épigénétiques sont des paramètres génomiques qui peuvent changer la fonction du génome par une influence exogène. Par exemple, les cellules peuvent recevoir des signaux provenant directement de l'environnement, ce qui cause des modifications dans l'expression de leurs gènes. Ces modifications épigénétiques permettent aux cellules de se spécialiser au cours du développement ou encore permettent un ajustement de son activité face à certaines situations.

Ils existent différents types d'informations épigénétiques que peuvent hériter les chromosomes afin de réguler la structure dynamique de la chromatine (Sharma et al., 2009). Parmi celles-ci, on retrouve la méthylation de l'ADN, les modifications covalentes d'histones ainsi que l'incorporation de variants d'histones. Ces modifications travaillent ensemble afin de réguler le fonctionnement du génome en altérant entre autres l'accessibilité ainsi que la compaction de la chromatine (Bollati et Baccarelli, 2010). Par exemple, l'accès à certaines régions chromosomiques est contrôlé par des modifications épigénétiques, ce qui permet aux gènes présents dans cette région d'être activés ou inactivés (Costa, 2010). L'interaction de ces modifications permet de créer un paysage épigénétique ayant un impact sur le génome des différents types cellulaires (Bollati et Baccarelli, 2010). Un fait intéressant concernant les modifications épigénétiques se situe au niveau du stade zygotique ainsi que lors de la formation des cellules germinales. Lors de ces deux stades de différenciation, deux reprogrammations épigénétiques à l'échelle du génome ont lieu afin d'adapter les embryons à une différenciation ultérieure (Sharma et Kelly, 2009).

Un état pathologique tel que le cancer entraîne une activation ou une inhibition inappropriée de diverses voies de signalisation. C'est un exemple de ce qui arrive lorsque la cellule n'est plus en mesure de maintenir les marques épigénétiques (Bollati et Baccarelli, 2010). En effet, les cellules cancéreuses humaines sont un exemple de paysage épigénétique dans lequel on remarque des anomalies (Abi Khalil, 2014). Ces altérations proviennent d'une reprogrammation de chaque composante de la machinerie épigénétique, ce qui peut avoir un impact direct sur la cellule et ainsi promouvoir la progression du cancer. Le fait que les altérations épigénétiques sont réversibles et que les cellules peuvent être restaurées dans un stade normal permet de développer des thérapies épigénétiques efficaces (Abi Khalil, 2014).

1.3.1 Méthylation de l'ADN

Tout d'abord, la méthylation de l'ADN est une modification épigénétique se retrouvant au niveau de la séquence nucléotidique de l'ADN. Elle permet le transfert d'un groupement

méthyle à la place d'un atome d'hydrogène sur le carbone 5 d'une cytosine (Weber et al., 2007). Cette modification de l'ADN ne peut avoir lieu que sur des cytosines formant des dinucléotides CG ou dans des structures que l'on appelle les îlots CpG (Weber et al., 2007). Dans 60 à 70 % des gènes humains, les promoteurs sont associés à des îlots CpG. Ces îlots sont composés d'une séquence ayant une haute fréquence de dinucléotides cytosines et guanines et se retrouvent le plus souvent dans les régions promotrices de gènes ou dans le premier exon des gènes codant pour des protéines (Rose et Klose, 2014).

On peut voir l'importance de ces structures dans les gènes qui sont tissus spécifiques ainsi que les gènes ménages (housekeeping gene). En effet, on peut remarquer une grande quantité de méthylation présente au niveau du promoteur des gènes tissus spécifiques, ce qui implique que ces gènes ne sont pas exprimés dans les cellules différenciées (Yong et al., 2016). Par contre, pour les gènes ménages qui sont transcriptionnellement actifs, le promoteur ne sera pas méthylé (Yong et al., 2016). Tout de même, on essaie toujours de comprendre comment la machinerie responsable de la méthylation de l'ADN est dirigée vers des séquences spécifiques du génome. Un mécanisme proposé semble démontrer qu'une interaction des méthyltransférases de l'ADN avec certains facteurs épigénétiques permettrait de guider la machinerie vers une région chromosomique précise (Hervouet et al., 2018).

Chez les mammifères, il existe trois enzymes principales qui sont responsables de la méthylation de l'ADN soit les méthyltransférases de l'ADN. Il y a Dnmt1, une enzyme de maintien. Elle permet de copier les marques de méthylation présente sur le brin mère pour les reproduire sur le brin nouvellement synthétisé durant la réplication (figure 1.3) (Hervouet et al., 2018). Ensuite, il y a Dnmt3A et Dnmt3B, des enzymes de novo, qui permettent d'établir de nouvelles marques de méthylation sur le brin ADN non méthylé seulement (figure 1.3) (Laisné et al., 2018). Ensemble, ces enzymes permettent de maintenir les niveaux de méthylation suffisante pour le bon fonctionnement des cellules.

Parmi tous ces enzymes, le laboratoire s'intéresse plus en détail à la méthyltransférase Dnmt3B, un marqueur important dans le cancer du sein. En effet, Sandhu et al. semblaient démontrer un patron de surexpression de la Dnmt3B ainsi que de hauts taux d'atténuation génique au niveau de la tumeur tissulaire en comparaison avec les tissus mammaires normaux (Sandhu et al., 2012). Cette activité aberrante de Dnmt3B contribue à une résistance à la chimiothérapie, mais fournit une cible de développement pour trouver de nouvelles stratégies de traitement (Zhang et al., 2020). Cette résistance peut s'expliquer par le nombre de gènes réprimés par la méthylation aberrante de l'ADN, plus précisément celle appliquée par Dnmt3B, ainsi que les activités cellulaires supprimées associées à ces gènes (Sandhu et al., 2012). Pour contrer ce problème, un traitement par des médicaments cytotoxiques permet de cibler les Dnmt3B, ce qui sensibilise les cellules à la mort cellulaire et améliore grandement l'efficacité de la chimiothérapie (Sandhu et al., 2012).

Dnmt3B contient un domaine catalytique conservé en C-terminale, suivi d'une région moins conservée en N-terminale qui contient les domaines ADD et PWWP. Ces deux domaines sont respectivement responsables de l'interaction protéine-protéine et ADN-protéine de Dnmt3B (Gagliardi et al., 2018). Le domaine ADD confère à Dnmt3B la capacité de reconnaître et de lier les queues d'histones H3 non méthylées au niveau de la lysine, ce qui prévient la liaison aux sites TSS actifs (Gagliardi et al., 2018). Pour ce qui est du domaine PWWP, il est responsable du recrutement de Dnmt3B au niveau du corps génique de plusieurs gènes grâce à l'enrichissement en H3K36me3 dans ces régions (Ge et al., 2004). Aussi, le domaine PWWP et les domaines riches en cystéine reconnaissent les PTM d'histone spécifique, ce qui contribue au maintien de la régulation globale (Ge et al., 2004). Toutes ces observations permettent entre autres de considérer le domaine PWWP comme un nouveau module de ciblage de la chromatine et il est essentiel pour la fonction des méthyltransférases de novo (Zhang et al., 2020).

Cependant, dans certains cas, des régions promotrices de gènes, comme les suppresseurs de tumeur (par exemple p16WAF4), se retrouvent hyperméthylées, ce qui conduit à la répression génique aberrante (Feng et al., 2019). Cette altération génique atténue l'expression des gènes et

par conséquent contribue à l'initiation et à la progression de la tumorigenèse (Herman et al., 1995). L'hyperméthylation des promoteurs est une caractéristique commune dans une variété de tumeurs.

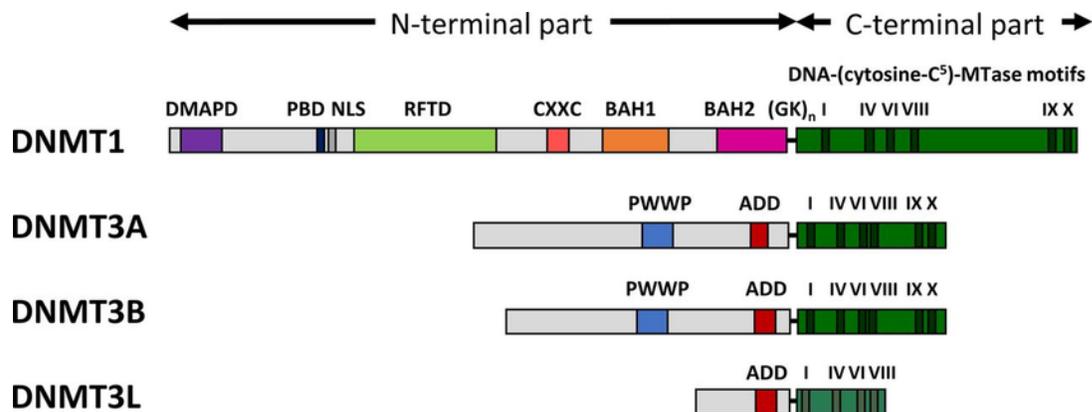


Fig. 1.3 Structure de base des principales méthyltransférases de l'ADN (Jeltsch et Jurkowska, 2016). DNMT1, DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L sont des protéines constituées de différents domaines importants. DMAPD – domaine d'interaction de la protéine 1, PBD – domaine de liaison à PCNA, NLS - signal de localisation nucléaire, RFTD – domaine de ciblage, CXXC – domaine CXXC, BAH1 et BAH2 – domaine d'homologie bromo-adjacents, GK_n – répétitions glycine et lysine, PWWP – domaine composé du motif tryptophane proline proline tryptophane, ADD – domaine ATRX - DNMT3 - DNMT3L.

1.3.2 Modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont les protéines formant le cœur des nucléosomes. Elles contiennent une extrémité non structurée en N-terminale pouvant subir des modifications covalentes post-traductionnelles. Il existe de nombreuses modifications qui peuvent modifier l'état des histones incluant l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la glycosylation, la sumoylation et la ribosylation (Sharma et al., 2009). Ces multiples modifications permettent aux cellules de réguler de nombreux processus biologiques comme la transcription, la réplication ainsi que la

réparation (Sharma et al., 2009). Contrairement à la méthylation, les modifications post-traductionnelles des histones peuvent être associées à la répression ou l'activation de la transcription. Cet état dépend du résidu modifié ainsi que du type de modification présente au sein de la queue N-terminale de l'histone (Millán-Zambrano et al., 2022). De plus, le type, l'emplacement et la combinaison des différentes modifications post-traductionnelles des histones formeraient un code qui dicterait la manière de réguler l'expression génique ainsi qu'un état particulier de la chromatine : active, permissive ou encore inactive.

Dans le génome, les modifications courantes retrouvées sont l'acétylation et la méthylation des résidus lysine au niveau des histones H3 et H4 (Millán-Zambrano et al., 2022). Tout d'abord, si on regarde au niveau de l'acétylation des lysines, il est possible d'observer une activation des gènes. En effet, à ces endroits, on remarque une présence accrue des marques d'histone active comme l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9ac) et l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac) (Millán-Zambrano et al., 2022). De l'autre côté, il y a la méthylation des histones qui semble être associée à la répression ou encore à l'activation de la transcription. L'effet encouru dépend du résidu qui sera modifié ainsi que du degré de méthylation (Wang et al., 2022). Par exemple, au niveau du promoteur de gènes actifs transcriptionnellement, on retrouvera une triméthylation de la lysine 4 sur l'histone H3 (H3K4me3) (Wang et al., 2022). Tandis que pour un gène transcriptionnellement inactif, on retrouvera plutôt des modifications post-traductionnelles comme la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) et la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) (Wang et al., 2022). Pour terminer, ces modifications post-traductionnelles sont un exemple de complément qui permet de garder la mémoire épigénétique à l'intérieur d'une cellule grâce à un code qui dicte la structure et l'activité des différentes régions de la chromatine (Sharma et al., 2009).

1.3.3 Variant d'histone H2A.Z

Tout comme pour la méthylation de l'ADN, la présence du variant d'histone H2A.Z au sein de la chromatine représente une marque épigénétique importante pour le contrôle de la

transcription (Giaimo et al., 2019). Afin de bien comprendre son rôle au niveau du génome, il sera question de bien cerner les caractéristiques importantes de ce variant d'histone. Tout d'abord, H2A.Z est une histone non canonique qui se différencie des histones conventionnelles en ayant quelques acides aminés différents dans leur séquence (Matsuda et al., 2010). Il s'agit d'un variant d'histone très conservé au niveau de sa séquence dans l'évolution, ce qui pourrait indiquer un rôle très important dans les mécanismes cellulaires. Dans la cellule, ils sont exprimés à des niveaux très bas par rapport à leurs orthologues canoniques. On peut observer ce phénomène puisque les gènes des variants d'histone sont présents sous une seule copie (Colino-Sanguino et al., 2022). Aussi, leur expression n'est pas limitée à la phase S comme les histones canoniques. En effet, ils sont exprimés tout au long du cycle cellulaire (Brewis et al., 2021).

H2A.Z se situe principalement au niveau du TSS de plusieurs gènes, mais peut se situer également au niveau des régions régulatrices incluant les activateurs et répresseurs (Guillemette et Gaudreau, 2006a, 2006b). De plus, chez plusieurs espèces telles que la souris (Shen et al., 2018) et la drosophile (Grigorian et al., 2017), H2A.Z est essentiel pour leur viabilité. Avec certitude, il a été démontré dans une étude que les gènes ayant des nucléosomes contenant H2A.Z sont plus permissifs à la transcription, ce qui représente une exigence pour de nombreuses fonctions cellulaires durant le développement (Giaimo et al., 2019). Au niveau du génome, H2A.Z joue un rôle dans plusieurs mécanismes moléculaires incluant l'activation des gènes, la ségrégation des chromosomes, l'atténuation de l'hétérochromatine et la progression du cycle cellulaire. (Giaimo et al., 2019; Miranda et al., 2011).

Dans l'expression des gènes, il a été démontré que H2A.Z peut avoir un rôle à la fois positif et négatif (Bagchi et al., 2020; Guillemette et Gaudreau, 2006b; Kamakaka et Biggins, 2005). Au niveau de son rôle positif, la présence de H2A.Z au nucléosome +1 améliore l'accessibilité et la mobilité de l'ADN, ce qui permet possiblement la liaison de l'ARN polymérase II, l'initiation de la transcription et ultérieurement l'éviction des dimères d'histone H2A.Z/H2B (figure 1.4) (Lewis et al., 2021). À l'opposé, un enrichissement accru du variant d'histone H2A.Z sur le corps génique permet de favoriser la formation de structures de chromatine stables et compactes

(figure 1.4) (Lewis et al., 2021). Malgré sa quantité limitée, sa distribution dans le génome confère une nouvelle propriété structurale et fonctionnelle aux nucléosomes.

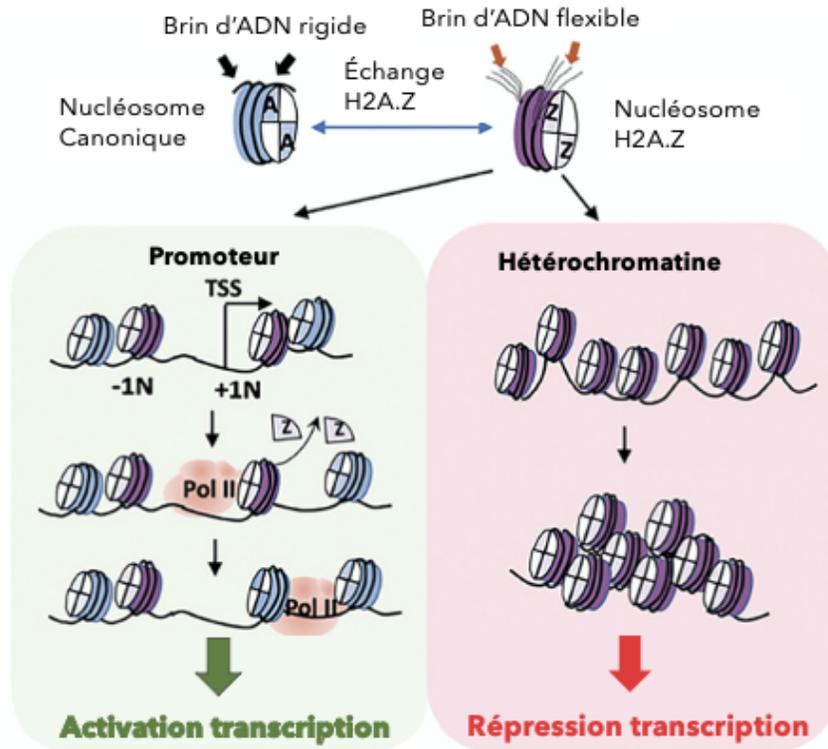


Fig. 1.4 Un rôle à la fois positif et négatif de H2A.Z dans l'expression des gènes (Lewis et al., 2021). H2A.Z peut avoir un rôle à la fois positif et négatif. La présence de H2A.Z au nucléosome +1 améliore l'accessibilité et la mobilité de l'ADN, ce qui permet la liaison de l'ARN polymérase II et l'initiation de la transcription. De l'autre côté, un enrichissement accru du variant d'histone H2A. Z sur le corps génique permet de favoriser la formation de structures de chromatine stables et compactes.

La déposition de H2A.Z au sein de la chromatine chez les mammifères est effectuée entre autres par le complexe Tip60/p400, mais plus particulièrement par la sous-unité p400, une ATPase de la classe SWI2/SNF2 (Becker et Workman, 2013). Pour ne pas encombrer la machinerie transcriptionnelle lors de la transcription des gènes, H2A.Z est enlevée de la chromatine par la

chaperonne ANP32E (Obri et al., 2014). Par contre, la déméthylation de la lysine K101, située à l'extrémité C-terminale de H2A.Z, par la méthyltransférase d'histone SMYD3 empêche l'évincement par la chaperonne ANP32E, ce qui permet une association plus stable du variant d'histone avec la chromatine (Obri et al., 2014). Malgré tout, on ne connaît pas suffisamment les mécanismes permettant à la cellule de reconnaître les endroits où doit être déposé H2A.Z, mais il semble suivre un patron de déposition qui n'est pas aléatoire. Cependant, il semble que Brd8, une sous-unité du complexe Tip60/p400, possède deux bromodomaines capables de lier les lysines acétylées sur l'extrémité des queues d'histone (Lashgari et al., 2018). Cette caractéristique de la sous-unité permettrait de lire le patron d'acétylation présent au niveau des nucléosomes de gènes inactifs, ce qui permettrait de charger spécifiquement H2A.Z dans ces régions (Lashgari et al., 2018).

Pour terminer, le variant d'histone H2A.Z est un acteur important dans le cancer puisqu'il joue un rôle majeur dans l'activation transcriptionnelle de gènes responsable de l'initiation, la croissance et le potentiel métastatique des cellules (Marques et al., 2013). Plusieurs études démontrent que H2A.Z est surexprimé dans les cancers du sein (Rangasamy, 2010), de la prostate (Dryhurst et Ausió, 2014) et les cancers colorectaux (Rispoli et al., 2019). Cette surexpression est fréquente et corrélée avec un mauvais pronostic (Monteiro et al., 2014).

1.4 Relation antagoniste entre H2A.Z et la méthylation de l'ADN

De façon importante, il a été démontré qu'il existait une relation antagoniste entre la méthylation de l'ADN et le variant d'histone H2A.Z (Zilberman et al., 2008). Au niveau du génome, on peut remarquer une distribution opposée de ces deux marques épigénétiques, ce qui suggère que l'un peut prévenir la présence de l'autre. Bref, les éléments régulateurs géniques qui semblent échapper à la méthylation de l'ADN sont enrichis en variant d'histone H2A.Z. À l'opposé, un gène ayant un niveau de méthylation élevé est dépourvu du variant d'histone (Coleman-Derr et Zilberman, 2012; Zilberman et al., 2008). Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, certains changements dans le patron de méthylation de l'ADN, comme la perte de la

méthyltransférase MET1, amèneraient une augmentation accrue de la présence du variant d'histone H2A.Z (Zilberman et al., 2008). Cette relation a aussi été observée chez les eucaryotes à l'aide de cellules tumorales humaines. Conerly et al. ont observé qu'une déplétion progressive de H2A.Z autour des sites TSS semble augmenter la méthylation de l'ADN à certains loci. Une autre étude menée par Yang et al. (2012) démontre qu'un traitement avec un agent hypométhylant de l'ADN, le 5 -Aza -2' -désoxycytidine, amène la perte de la méthylation de l'ADN à un locus donné et s'en suit une augmentation de H2A.Z.

Cette relation a aussi été observée au promoteur proximal du gène CYP1A1 (Marques et al., 2013). Plusieurs expérimentations ont permis à Marques et al. (2013) de démontrer que l'absence de H2A.Z augmente de façon significative les niveaux de méthylation de l'ADN. De l'autre côté, lorsque le variant d'histone H2A.Z est présent, il peut exclure la méthylation de l'ADN au promoteur proximal, ce qui favorise la liaison de AhR (récepteur aryl hydrocarbène) et possiblement l'expression du gène CYP1A1 (Marques et al., 2013). Effectivement, ER α , un récepteur aux œstrogènes, atténue l'expression de CYP1A1 en recrutant directement la méthyltransférase Dnmt3B, ce qui affecte le patron de méthylation de son promoteur (Marques et al., 2013). À l'opposé, ils ont pu remarquer que H2A.Z contribue à l'expression du gène CYP1A1 en relâchant la répression médiée par ER α (Marques et al., 2013). En bref, ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse qu'une troisième composante soit le complexe Tip60/p400, une chaperonne du variant d'histone H2A.Z, pourrait jouer un rôle dans la relation antagoniste entre H2A.Z et la méthylation de l'ADN.

1.5 Le complexe Tip60/p400

Le complexe Tip60/p400 est composé de 17 sous-unités. Il permet de réguler la structure de la chromatine en agissant comme un complexe de remodelage. Aussi, il a été démontré que ce complexe agit comme un co-activateur transcriptionnel qui interagit avec des facteurs de transcriptions spécifiques, ce qui permet l'activation des gènes (Mohamed-Ahmed et al., 2018).

Ce complexe participe aussi dans d'autres processus comme la réparation de l'ADN ainsi que l'apoptose (Idrissou et al., 2020).

On retrouve le complexe Tip60/p400 dérégulé dans plusieurs cas de cancer (IDRISSOU et al., 2020; Mattera et al., 2009). Par exemple, dans le cas d'un carcinome colorectal, il a été démontré que le rapport entre les ARN messagers de Tip60/p400 est affecté (Mattera et al., 2009). Ce déséquilibre dans le ratio Tip60/p400 cause un dérèglement dans la réponse cellulaire face aux dommages à l'ADN, mais peut être renversé par la surexpression de la sous-unité Tip60, ce qui permet d'augmenter l'apoptose et de diminuer la prolifération cellulaire (Mattera et al., 2009). Ces résultats suggèrent que le défaut dans l'équilibre entre les sous-unités Tip60/p400 est important dans la progression du cancer. Pour ces raisons, le laboratoire s'est concentré sur deux principales sous-unités présentées dans les sections suivantes.

1.5.1 Sous-unité Tip60

La sous-unité Tip60, une acétyltransférase, peut ajouter un groupement acétyle sur la queue N-terminale des histones H2A, H4 ainsi qu'un bon nombre de facteurs de transcription et de protéines non-histones (Kar et al., 2012). Tip60 semble impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN, dans la réparation de bris double-brin ainsi que dans l'activation transcriptionnelle (Squatrito et al., 2006). Tip60 est composé des domaines CHROMO, MYST et doigt de Zinc (figure 1.5). Le chromodomaine de Tip60 permet de médier les interactions avec les lysines méthylées des histones ou avec les molécules d'ARN (Sapountzi et al., 2006). Pour ce qui est du domaine MYST, il s'agit du domaine catalytique de la protéine. Il contient une courte séquence d'acide aminé qui permet de lier l'acétyl-coenzyme A ainsi que le substrat (Sapountzi et al., 2006). Finalement, le domaine en doigt de Zinc (Cys-Cys-His-Cys) est contenu dans le domaine MYST. Il est essentiel pour l'activité acétyltransférase et est requis pour des interactions protéine-protéine (Doyon et al., 2004).

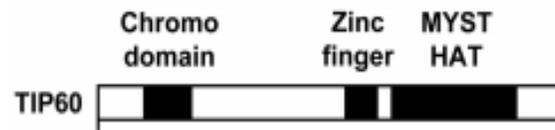


Fig. 1.5 Schéma représentant la structure de l'acétyltransférase Tip60, une des sous-unités du complexe Tip60/p400 (Park et al., 2010)

1.5.2 Sous-unité p400

La sous-unité p400, une ATPase de la classe SWI2/SNF2, médie l'échange du dimère H2A-H2B par le dimère H2A.Z-H2B dans les nucléosomes (Kar et al., 2012). Lors de l'échange, la sous-unité reste associée avec les nucléosomes contenant H2A.Z pour augmenter sa stabilité (Colino-Sanguino et al., 2022). La présence de la sous-unité p400 aux nombreux sites de déposition de H2A.Z suggère que ce complexe pourrait avoir une grande importance dans la relation antagoniste (Lashgari et al., 2017; Narkaj et al., 2018). Effectivement, auprès de certains gènes, il est même possible d'observer que la sous-unité p400 suit de près les niveaux du variant d'histone H2A.Z aux TSS (Lashgari et al., 2017). Pour bien comprendre la biologie du complexe Tip60/p400, il est important d'en apprendre un peu plus sur la structure de la sous-unité p400. Elle est composée des domaines *HSA*, du domaine d'homologie *SWI2/SNF2* ainsi que du domaine *SANT* (figure 1.6). En premier lieu, la liaison de la sous-unité p400 avec l'ADN est médiée par le domaine *HSA*. Ensuite, le domaine d'homologie *SWI2/SNF2* est en mesure de mobiliser des nucléosomes, comme H2A.Z, ainsi que plusieurs autres protéines associées à l'ADN. Enfin, le domaine *SANT* permet l'interaction de p400 avec les queues d'histones (Narkaj et al., 2018).

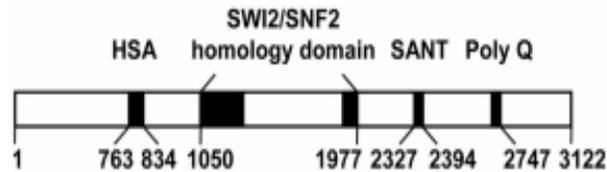


Fig. 1.6 Schéma représentant la structure de l'ATPase p400, une des sous-unités du complexe Tip60/p400 (Park et al., 2010)

1.6 Complexe Tip60/p400 : rôle dans la relation antagoniste existant entre la méthylation de l'ADN et le variant d'histone H2A.Z.

Plusieurs études démontrent que le complexe Tip60/p400 est responsable de l'incorporation du variant d'histone H2A.Z dans la chromatine et permet ainsi de maintenir certaines régions régulatrices libres de méthylation de novo (Lashgari et al., 2017). Par exemple, à l'aide d'un inhibiteur de la sous-unité Tip60, dans une culture de neurones hippocampiques, il a été possible d'observer une réduction du niveau de H2A.Z auprès des gènes *Syp* et *Arc* après seulement deux heures, ce qui indique que le complexe Tip60/p400 est important dans la mise en place des niveaux du variant d'histone dans la chromatine (Narkaj et al., 2018).

En plus de son rôle avec le variant d'histone H2A.Z, Tip60 peut acétyler la méthyltransférase Dnmt1, ce qui mènerait à la déstabilisation de cette dernière et ultimement à sa dégradation (Bronner, 2011). Face à ces résultats, le laboratoire tente de déterminer si le même phénomène peut survenir au niveau de la méthyltransférase Dnmt3B. Des résultats préliminaires non publiés de Maud Marques démontrent qu'*in vivo*, dans des cellules cancéreuses de la glande mammaire (MCF-7), Dnmt3B interagit avec le complexe Tip60/p400 et Tip60 semble en mesure d'acétyler Dnmt3B. Cette nouvelle acétylation s'en suit d'une augmentation accrue des niveaux d'ubiquitination de la protéine Dnmt3B, ce qui entrainerait ultérieurement sa dégradation. Bref, tous ces résultats démontrent que le complexe Tip60/p400 pourrait avoir un rôle dans la relation antagoniste entre la méthylation de l'ADN et le variant

d'histone H2A.Z. Pour terminer, nous proposons un modèle de mécanisme reliant H2A.Z, la méthylation de l'ADN et le complexe Tip60/p400.

1.7 Description du projet de recherche

Le but principal de mon projet de recherche est de comprendre la façon dont le complexe Tip60/p400 permet de réguler la méthylation de l'ADN et l'incorporation de H2A.Z dans la chromatine. D'une part, en induisant la dégradation de Dnmt1 ainsi que Dnmt3B. D'une autre, en maintenant certaines régions régulatrices libres de méthylation de *nov*. Pour y parvenir, différentes approches ont été réalisées visant à approfondir nos connaissances sur la relation existante entre Tip60/p400/H2A.Z et la méthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses HCT116. Tout d'abord, le premier objectif du projet consiste à vérifier si le complexe Tip60/p400 peut promouvoir la dégradation de la méthyltransférase Dnmt3B *in vitro*. En effet, en se basant en partie sur des résultats obtenus par Hong et al., ainsi que ceux obtenus par Maud Marques dans le laboratoire Gaudreau, il a été démontré que Dnmt1 est déstabilisé par l'acétylation de Tip60, ce qui mène à une ubiquitination par la ligase E3 UHRF1 et permet une dégradation par le protéasome (Hong et Shao, 2011). Ensuite, le deuxième objectif du projet de recherche consistait à vérifier la localisation génomique de Tip60/p400/H2A.Z en présence et en absence de Dnmt1 et Dnmt3B dans les HCT116. Au niveau des cellules sauvages, elles devraient présenter un profil élevé de méthylation au niveau du promoteur du gène p16^{INK4a}. Tandis qu'à l'opposé, les cellules ayant une suppression pour les méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3B, elles devraient présenter un profil élevé de variant d'histone ainsi que de p400 au niveau du promoteur du gène p16^{INK4a}.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Souches bactériennes, plasmides et milieux

Les souches d'*E. coli* utilisées ainsi que leurs génotypes sont énumérées au tableau 2.1. Le vecteur d'expression utilisée est pGEX6P1. Chaque vecteur contiendra un des fragments de la méthyltransférase Dnmt3B représenté dans la figure 2.1. Les différentes souches d'*E. coli* ont été cultivées et obtenues dans un milieu nutritif LB pour toutes les expériences subséquentes. 100 µg/µl d'ampicilline a été ajouté à chacun des milieux pour l'amplification des bactéries contenant le vecteur pGEX6p1 avec ou sans insert.

Tableau 2.1 Souches bactériennes et leurs génotypes

Souches	Génotypes	Source
Dh5 α	supE44 Δ (lacZYA-argF)U196 (Φ 80 Δ lacZM15) hsdR17 recA1 [1] endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Woodcock et al. (1989)
BL21 (DE3)	F' ompT hsdSB(r_B m_B) gal dem (λ Its857 ind1 Sam7 nin5 [2] lavUV5-T7gene1)	Studier et al. (1986)

2.2 Transformations des souches bactériennes

Les cellules compétentes DH5 α , une souche d'*E. coli*, ont été transformées selon Froger et al. (2007). Pour la sélection des bactéries transformées, 100 µg/µl d'ampicilline a été ajouté à chacun des milieux.

2.3 Extraction et manipulation de l'ADN

L'extraction du vecteur a été effectuée à l'aide d'une lyse alcaline (Ehrt et al., 2003). Pour la manipulation de l'ADN, les différents fragments Dnmt3B utilisés sont représentés dans la

figure 2.1. Ces différents fragments d'ADN ont été obtenus à l'aide du plasmide pcDNA3 contenant le gène Dnmt3B. Les amorces utilisées afin d'obtenir ces fragments sont disponibles dans le tableau 2.2. Ces différents fragments ont été insérés et amplifiés dans le plasmide pGEX6P1 avec l'aide de la souche DH5 α d'*E. coli* afin d'obtenir des protéines de fusion GST. Ces différentes enzymes requises pour insérer les différents fragments ont été obtenues de New England Biolabs et ont été utilisées selon les recommandations du manufacturier.

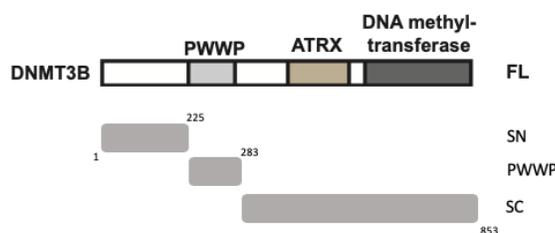


Fig. 2.1 Schéma de la structure des différents fragments de la méthyltransférase Dnmt3B utilisées pour les protéines de fusion. SN : fragment correspondant du début de la protéine jusqu'au début du domaine PWWP. PWWP : domaine Proline-Tryptophane-Tryptophane-Proline de Dnmt3B SC : fragment correspondant du domaine PWWP jusqu'à la fin de la protéine.

Tableau 2.2 Amorces utilisées pour l'amplification des fragments Dnmt3B

PWWP- FWD	5'-TTAAGGATCCATAGGGGACCTCGTGTGGGG-3'
PWWP-REV	5'- TTAATTGTCGACACAGCCCCAGTGCCACCAGT-3'
SN- FWD	5'- TTAAGGATCCATGAAGGGAGACACCAGGCA -3'
SN- REV	5'- TTAATTGTCGACCTCTGAACTGTCTCCATCTC -3'
SC- FWD	5'- TTAAGGATCCCCTGGAGACTCATTGGAGGA-3'
SC- REV	5'- TTAATTGTCGACCTATTCACATGCAAAGTAGT-3'

2.4 Surexpression de gènes de fusion dans *E. coli*

Le vecteur pGEX6P1 contenant les différents fragments Dnmt3B a été transformé dans des bactéries BL21 d'*E. coli*. De ces bactéries, on prend une colonie et on l'inocule dans 10 ml de milieu LB ainsi que 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ d'ampicilline. Ces cultures sont incubées durant toute la nuit à

37 °C. Le jour suivant, 10 ml de la culture est utilisé pour inoculer 500 ml de LB contenant 100 µg/µl d'ampicilline. Cette fois-ci, les cultures sont incubées à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une DO à 600 nm de 0,7. Lorsque ce seuil est atteint, 1 mM d'IPTG est ajouté à chacune des cultures et elles sont incubées jusqu'à une durée de 5 heures à une température de 37 °C. À la fin de l'incubation, toute la culture de bactéries est prélevée et centrifugée à 5000 rpm pendant 10 minutes à une température de 4 °C.

2.5 Lyse bactérienne et purification de la protéine de fusion sous condition non dénaturante

Les bactéries BL21 exprimant les différents fragments de Dnmt3B sont resuspendues dans un tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Nonidet P-40, 1x Cocktail d'inhibiteur, 1x PMSF) à raison de 5 ml par gramme de bactérie. Par la suite, les différents échantillons sont incubés sur glace pendant 30 minutes en y ajoutant 1 mg/ml de lysozymes. Finalement, le lysat bactérien est centrifugé à 10 000 rcf pendant 30 minutes à une température de 4 °C afin de recueillir le surnageant contenant les protéines en phase soluble.

Le surnageant est mélangé avec 50 µl d'une résine ayant du glutathion couplé de façon covalente avec des billes de sépharose. Ces billes sont préparées selon les recommandations du manufacturier pour chacun des échantillons. Grâce à des lavages successifs (au moins 3), les protéines non spécifiques présentes dans le lysat cellulaire sont enlevées à l'aide de 500 µl de tampon de lavage (1x PBS, 5 mM EDTA et 0,15 mM PMSF). Finalement, les protéines de fusion ont été éluées avec 100 µl de tampon d'éluion (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM glutathion réduit) pendant 15 minutes à température pièce. Chacun des échantillons purifiés ont été analysés par SDS-PAGE 10 % pour vérifier la présence ou non de la protéine de fusion.

2.6 Essai d'acétylation *in vitro*

Pour les essais d'acétylation *in vitro*, plusieurs réactions individuelles contenant du tampon d'acétylation (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 % glycérol, 10 mM sodium butyrate, 0,1 mM EDTA,

1 mM DTT, 1x PMSF et 10 uM Acétyl-CoA), une quantité croissante des différents fragments Dnmt3B ainsi qu'une quantité constante de complexes Tip60/p400 provenant de cellules HCT116 de type sauvage, ont été effectuées et seront disposés dans des microtubes de 1,5 ml. Chaque réaction est incubée pendant 45 minutes à 30 °C afin de pouvoir vérifier si ces fragments peuvent être acétylés ou non. Pour l'analyse, un gel de polyacrylamide 10 % suivi d'un immunobuvardage de type western avec un anticorps dirigé contre les lysines acétylées a été effectué.

2.7 Culture cellulaire

Les différentes lignées cellulaires utilisées pour le projet de recherche, soit les HCT116 et les Wi-38, proviennent de la banque de cellules du Département de biologie de l'Université de Sherbrooke. Tout d'abord, les cellules HCT116 sont une lignée cellulaire provenant d'un carcinome colorectal, tandis que les Wi-38 sont des cellules adhérentes provenant de fibroblastes de tissu pulmonaire. Afin de pouvoir effectuer toutes mes expérimentations, j'ai même utilisé des cellules HCT 116 *Dnmt1*^{-/-} *Dnmt3B*^{-/-}. Ces cellules ont une délétion des allèles des méthyltransférases *Dnmt1* et *Dnmt3B*. Elles sont une gracieuseté du laboratoire du professeur Bert Vogelstein de l'Université Johns Hopkins au Maryland. Ces différentes lignées cellulaires ont été maintenues dans un milieu DMEM contenant 10 % de FBS ainsi que 1 % Pen/Strep. Elles sont cultivées à 37 °C dans un environnement humide contenant 5 % de CO₂.

2.8 Essai de stabilité protéique en utilisant le cycloheximide

Des cellules HCT116 de type sauvage ont été transfectées avec la construction pcDNA3 contenant l'acétyltransférase Tip60 (0 à 10 µg) ainsi qu'une quantité constante de Dnmt3B (10 µg) dans des plaques de 6 puits. La transfection a lieu en présence de lipofectamine 24 heures après le dernier passage. Deux jours après la transfection, les cellules ont été traitées avec 200 µg/µl de cycloheximide pendant 0 à 8 heures. Ces différentes manipulations permettent de s'assurer que la diminution de l'abondance des protéines peut être attribuée à la dégradation et non à une instabilité externe.

2.9 Essai d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les essais d'immunoprécipitation de la chromatine ont été effectués comme décrit dans Svtelis et al. (2007). Le pontage des protéines sur la chromatine a été effectué à l'aide de formaldéhyde sur environ 2×10^6 à 10×10^6 cellules HCT116 de type sauvage fraîchement décongelées. Ensuite, pour l'étape de sonication, le lysat cellulaire a subi 15 cycles de sonication à haute intensité d'une durée de 30 secondes chacun. De plus, chaque cycle a été entrecoupé d'une pause de 30 secondes pour éviter de chauffer l'échantillon durant le traitement. Pour les étapes d'immunoprécipitation, les anticorps utilisés sont indiqués dans le tableau 2.3. La purification de la chromatine a été effectuée à l'aide d'une trousse de purification de PCR de la compagnie Qiagen (Qiaquick). L'ADN récupéré est analysé par qPCR à l'aide d'amorce représentant des fragments du gène de *p16^{INKa4}* (figure 2.2). Les amorces utilisées pour le qPCR sont indiquées dans le tableau 2.4. Les résultats sont présentés en enrichissement moyen pour chacun des anticorps. Il s'agit d'une mesure comparant la quantité de séquences cibles mesurées dans l'isolat de l'immunoprécipitation à la quantité mesurée dans un isolat de témoin négatif.

Tableau 2.3 **Anticorps utilisés pour les expériences de ChIP**

H2A.Z	Ab2851, Abcam
H3	B1791, Abcam
ARN polymérase II	(8WG16) MMS-126R, Covance

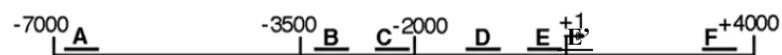


Fig. 2.2 Schéma représentant les différents endroits du gène *p16^{INKa4}* amplifiés lors de l'analyse par qPCR (Witcher et Emerson, 2009)

Tableau 2.4 Amorces utilisées pour l'analyse qPCR pour les expériences ChIP

p16INK4a-A FWD	5'-TATTCCTCCATTGCCTTTGC-3'
p16INK4a-A REV	5'-TGGGGTGATGCATTCTGATA-3'
p16INK4a-B FWD	5'-ACTCTCCCACCCCATTAAG-3'
p16INK4a-B REV	5'-ATGCTGCCATACCCAGCTAA-3'
p16INK4a-C FWD	5'-GAGAGGTACCCCGAGGAAAA-3'
p16INK4a-C REV	5'-CCCTGGTTGACTTAAACCTTGT-3'
p16INK4a-D FWD	5'-TGGTCTTTGGATCACTGTGC-3'
p16INK4a-D REV	5'-TAATACGGACGGGGGAGAAT-3'
p16INK4a-E FWD	5'-AGTCCTCCTTCCCTTGCCAAC-3'
p16INK4a-E REV	5'-CGGAGGAGGTGCTATTAACCTC-3'
p16INK4a-E' FWD	5'-GTAGAGGGTCTGCAGCGGGA-3'
p16INK4a-E' REV	5'-ATTACAAACCCCTTCTGAAA-3'
p16INK4a-F FWD	5'-TCACAGTGCTCTCTGCCTGT-3'
p16INK4a-F REV	5'-ACACAAGCCCCAGGTGTCTA-3'

2.10 Purification de noyau à partir de cellule HCT 116 et immunobuvardage de type Western

Afin de purifier le complexe Tip60 ayant une fusion GST, les cellules exprimant le complexe étiqueté sont récoltées, resuspendues et centrifugées dans quatre tampons d'extraction nucléaire (NE) (tableau 2.5). Pour chacune des étapes de centrifugation, une vitesse de 2500 rcf a été utilisée pour une durée de 5 minutes à 4 °C. Ces différentes étapes ainsi que les nombreux tampons d'extraction nucléaire ont permis de séparer les protéines cytoplasmiques des protéines nucléaires. Enfin, il ne reste qu'à effectuer la lyse des différents échantillons afin de concentrer les protéines nucléaires. Pour vérifier la présence du complexe Tip60/p400, un immunobuvardage de type Western a été effectué à l'aide d'un anticorps dirigé contre la sous-unité Tip60. Afin de déterminer si les échantillons ont été chargés de façon semblable dans tous les puits et que le transfert a bien fonctionné, un contrôle est effectué avec un anticorps dirigé contre GADPH ou l'actine.

Tableau 2.5 Tampons d'extractions nucléaires pour la purification de noyau des cellules HCT116 de type sauvage

Tampon NE 1	25 mM HEPES pH 7.9, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Tampon NE 2	50 ml Tampon 1 + 500 µl NP-40 (1% IGEPAL)
Tampon NE 3	1:1 Tampon 1 et 2
Tampon NE 4	25 mM HEPES pH 7.9, 350 mM NaCl

Les résultats des essais d'acétylation sont révélés grâce à un immunobuvardage de type Western. Pour ce faire, les protéines totales sont séparées sur un gel de polyacrylamide de 10 %. À la suite à la migration sur gel, on transfère les protéines sur une membrane de PVDF. À la suite de cette étape, la membrane est mise en contact de l'anticorps primaire dirigé contre les lysines acétylées, ce qui permet de mettre en évidence une protéine particulière dans un mélange complexe. La liste des anticorps utilisés lors des différentes expérimentations d'immunoprécipitation et d'immunobuvardage de type Western est indiquée dans le tableau 2.6.

Tableau 2.6 Anticorps utilisés pour les expériences de Western Blot

Dnmt3B	Sc-20704, Santa Cruz Biotechnology
Tip60	Ab23886, Abcam
Acétyle-lysine	Ab190179, Abcam
GADPH	Ab8245, Abcam
Actine	A2066, Sigma

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Expression de protéines de fusion de différentes régions de la méthyltransférase Dnmt3B

Il a été possible de cloner trois différentes régions d'ADN du gène *Dnmt3B* correspondant à trois régions de la méthyltransférase Dnmt3B (figure 2.1). À l'aide d'enzymes de restriction, ces différents fragments ont été insérés dans le vecteur pGEX6P1 contenant une étiquette GST. Ces nouveaux vecteurs contenant les fragments recombinés ont pu être insérés dans les cellules DH5 α . Il s'agit d'une souche d'*E. coli* qui maximise l'efficacité de la transformation (Dower et al., 1988). Il a été alors possible d'effectuer une mini lyse alcaline afin de récupérer les vecteurs amplifiés. Pour ce qui est de l'induction de l'expression de la protéine d'intérêt, la souche d'*E. coli* DH5 α a été traitée avec l'analogue du lactose l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG). Cette étape a été suivie d'une purification par chromatographie d'affinité avec une matrice de glutathion pour obtenir ces nouveaux fragments recombinés pour l'essai d'acétylation *in vitro*.

Pour le vecteur pGEX6P1, l'expression de l'insert est sous le contrôle du promoteur *lac et est* induit par l'IPTG (Hu et al., 2015). Donc, pour l'induction de l'expression de la protéine d'intérêt, il sera possible d'utiliser la souche d'*E. coli* BL21 induit par 1 mM d'IPTG incubée pendant 3 heures à une température de 37 °C sous agitation (figure 3.1). Bref, il a été possible d'obtenir des fragments PWWP- GST après seulement 3 heures d'induction par l'IPTG (figure 3.1).

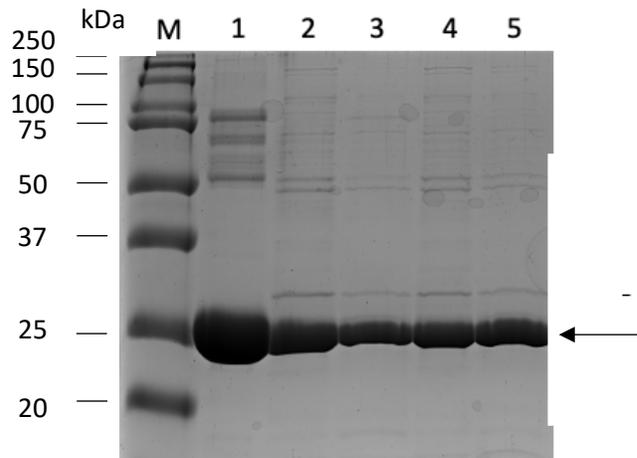


Fig. 3.1 Induction de l'expression du vecteur pGEX6P1 contenant le fragment PWWP-GST à l'aide de 1 mM d'IPTG. Gel de polyacrylamide 10 % coloré au bleu de Coomassie. La flèche représente le fragment PWWP-GST. M : marqueur Precision Plus Protein Dual Color de 250 kDa. 1 : souche E. coli contenant un vecteur non induit par l'IPTG. 2 et 3 : souche E. coli numéro 6 contenant le vecteur ainsi que le fragment PWWP-GST induit pendant 3 heures et 5 heures par l'IPTG. 4 -5 : souche E. coli numéro 8 contenant le vecteur ainsi que le fragment PWWP-GST induit pendant 3 heures et 5 heures respectivement par l'IPTG.

3.2 Application d'un essai d'acétylation *in vitro* afin d'identifier les lysines acétylées au niveau des différents fragments de la méthyltransférases Dnmt3B

Le premier objectif du projet consistait à vérifier si le complexe Tip60/p400 peut promouvoir l'acétylation de Dnmt3B *in vitro*. Pour vérifier ceci, un essai d'acétylation a été effectué à l'aide de fragments de Dnmt3B recombinants (figure 3.1) et du complexe Tip60/p400 purifié (figure 3.2).

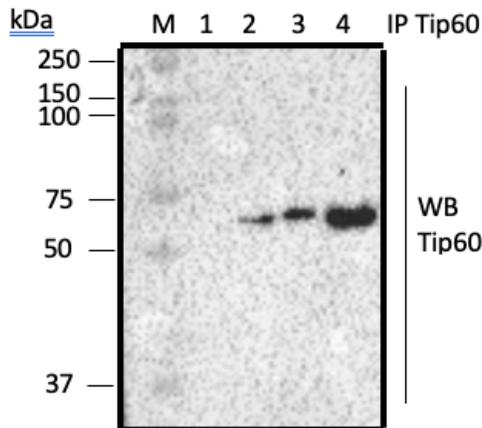


Fig. 3.2 Démonstration de la purification du complexe Tip60/p400 à l'aide de cellules HCT116 de type sauvage. Membrane de PVDF sondée à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre la sous-unité Tip60. 1 : marqueur Precision Plus Protein Dual Color de 250 kDa. 2 et 3 : extraits cellulaires totales des cellules HCT116 contenant les protéines nucléaires et cytoplasmiques. 4 : extraits des protéines nucléaires totales des cellules HCT116. 5 : purification du complexe Tip60/p400 à l'aide de la purification par noyau.

La méthode utilisée dans le cadre de mon projet de recherche est un essai d'acétylation non radioactive *in vitro*. Elle a été développée par Kuninger et son équipe du département de biologie moléculaire de l'Université des sciences de la santé en Oregon afin, entre autres, de mesurer l'activité des histones acétyltransférases (Kuninger et al., 2007). Cette méthode offre plusieurs avantages comparativement aux méthodes utilisant la radioactivité. Premièrement, il s'agit d'une technique simple et non dispendieuse qui permet d'éviter l'utilisation de la radioactivité comme méthode d'analyse. Deuxièmement, même après l'essai d'acétylation, il est possible de pouvoir réutiliser les mêmes échantillons pour d'autres essais ainsi que d'autres analyses comme la spectrométrie de masse (Kuninger et al., 2007).

Pour mes expériences, des essais d'acétylation *in vitro* ont été effectués de la même façon que décrite dans la section matériel et méthodes. Pour ce faire, j'ai effectué plusieurs réactions

individuelles contenant du tampon d'acétylation, une quantité croissante des différents fragments Dnmt3B ainsi qu'une quantité constante du complexe Tip60/p400 pour vérifier si ces fragments sont acétylés ou non. Après une incubation de 45 minutes, un gel de polyacrylamide de 10 % a été effectué suivi d'un immunobuvardage de type Western à l'aide d'un anticorps dirigé contre les lysines acétylées. Cette dernière étape permet d'avoir un portrait général de la méthylation présente au niveau de la méthyltransférase Dnmt3B. Grâce à cette méthode, il a été possible d'observer que le complexe Tip60/p400 permettrait l'acétylation du domaine *PWWP* de la méthyltransférase Dnmt3B (Figure 3.3). Ces fragments acétylés seront ensuite utilisés pour identifier les résidus lysines ainsi que les sites fonctionnels du domaine *PWWP*. Un essai d'acétylation a aussi été effectué sur les fragments SN et SC. Dans les résultats obtenus, aucune marque d'acétylation n'est présente dans les autres domaines de la protéine Dnmt3B, ce qui pourrait signifier que cette région de la méthyltransférase n'interagit pas avec le complexe Tip60/p400.

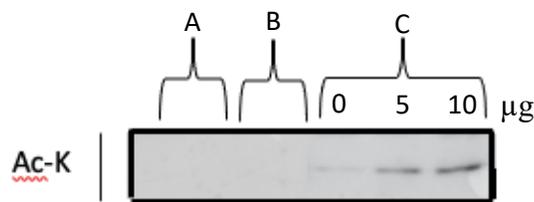


Fig. 3.3 Le complexe Tip60/p400 permet d'acétyler le domaine *PWWP* de la méthyltransférase Dnmt3B. Détection des lysines acétylées présentes sur le fragment PWWP-GST grâce à un immunobuvardage de style Western . A) Incubation des fragments PWWP ayant une fusion GST avec un tampon sans acétyl-CoA. B) Incubation des fragments PWWP ayant une fusion GST, mais sans la source d'acétyltransférase, ici il s'agit du complexe Tip60/p400. C) Incubation des fragments PWWP ayant une fusion GST (0 à 10 µg) avec de l'acétyl-CoA ainsi que le complexe Tip60/p400.

3.3 Optimisation du protocole d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) chez les cellules humaines HCT116

Le protocole a été effectué comme décrit dans Svtelis et al. (2007). Cependant, certaines étapes clés ont été optimisées afin d'obtenir de meilleurs résultats avec les cellules HCT116. Effectivement, deux étapes devaient être optimisées afin d'obtenir une chromatine de qualité et des résultats reproductibles. La première à être optimisée est la sonication, une étape essentielle pour le succès d'un ChIP. L'optimisation de la fragmentation de la chromatine pour les cellules HCT116 est nécessaire afin de bien solubiliser la chromatine et permettre sa co-précipitation dans les étapes subséquentes (Kim, 2018). Elle permet même d'obtenir des échantillons de qualité et des expériences qui sont reproductibles. Un des problèmes couramment rencontrés avec cette technique de fragmentation est la durée de sonication requise. Avec certitude, plusieurs résultats démontrent qu'une sonication trop longue peut endommager l'intégrité de la chromatine ainsi que les épitopes des protéines fixées par le formaldéhyde (Song et al., 2015). C'est pour cette raison qu'il faut identifier et utiliser la quantité minimale de sonication requise pour générer des tailles de fragments voulues afin de minimiser les dommages qui pourrait mettre en péril l'intégrité de la chromatine. Un aspect important à garder en tête lors du changement du protocole est que la taille des fragments diminue à mesure que le temps de sonication augmente (Buck et Lieb, 2004).

Des essais ont été effectués sur des cellules HCT116 comme décrit dans le protocole original afin d'optimiser la technique. En revanche, les résultats de la figure 3.4a démontrent que le nombre de cycles n'est pas suffisant pour obtenir des fragments de 150 à 500 pb. Il est important de noter que cette taille de fragment est préférable pour la méthode d'analyse de séquençage à haut débit puisque les produits les plus longs amplifient plus difficilement (Kim, 2018). De plus, lorsque la taille dépasse les 500 pb, les fragments sont plus gros et plus diffus que les inserts courts. Alors, les fragments plus courts offrent une haute résolution des sites de liaison et ils fonctionnent efficacement pour les plateformes de nouvelle génération (Kidder et al., 2011). Afin d'obtenir des fragments suffisamment courts, il faut fragmenter de 18 à 22 fois pendant le

même temps ainsi que la même intensité que dans le protocole de Sotelis et al. (2007) afin d'obtenir les bonnes tailles de fragment (figure 3.4 b).

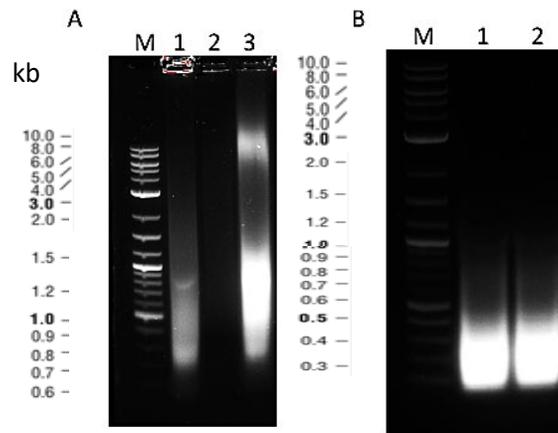


Fig. 3.4 Patron de migration de la chromatine des cellules HCT116 de type sauvage à la suite d'une sonication à l'aide du Bioruptor. Gel d'agarose 1 % coloré à l'aide d'un agent intercalant, le Gel Green. A) Sonication non efficace de la chromatine donnant des fragments de 800 à plus de 1 kb. M : marqueur 1 kb Plus DNA. 1, 2 et 3 : échantillons de chromatine fixés au formaldéhyde ayant subi 10, 12 et 15 cycles de sonication respectivement. B) Sonication efficace de la chromatine donnant des fragments de 150 à 400 bases. M : marqueur 1 kb Plus DNA. 1 et 2 : échantillons de chromatine fixés au formaldéhyde ayant subi 18 et 22 cycles de sonication respectivement.

La deuxième méthode à être optimisée est celle de la purification finale de la chromatine. Originellement, il s'agissait d'effectuer une purification à l'aide d'un mélange de phénol et de chloroforme. Cependant, pour différentes raisons, un kit de Biobasics pour purifier les produits de PCR a été utilisé afin de purifier les échantillons. Une des premières raisons est que la technique est simple et efficace, ce qui permet d'obtenir une préparation d'ADN de haute qualité (da Silva et al., 2020). Ensuite, il n'y a pas d'étapes supplémentaires de purification dans l'éthanol à effectuer. Aussi, l'utilisation du kit Biobasics permet d'obtenir un haut rendement et une reproductibilité de la technique (da Silva et al., 2020). Un des avantages considérables de

cette technique par rapport à une purification par le phénol – chloroforme est que la pureté est grandement améliorée (da Silva et al., 2020). Pour les procédures techniques avec le kit Biobasics comme les lavages et l'éluion, les recommandations du fabricant ont été suivies.

3.4 La localisation génomique de H2A.Z/ARN polymérase II/histone H3 au niveau du gène p16INKa4 dans les cellules HCT116 WT et HCT116DNMT1-/-; DNMT3B-/-

Le deuxième objectif du projet de recherche consistait à vérifier la localisation génomique de Tip60/p400/H2A.Z en présence et en absence de Dnmt1 et de Dnmt3B dans les cellules HCT116. Il sera donc possible de suivre les niveaux de déposition de Tip60/p400/H2A.Z en absence de la presque totalité de méthylation au niveau génomique. Les cellules sauvages devraient présenter un profil élevé du variant d'histone ainsi que de sous-unité p400 au niveau du corps génique du gène *p16^{INK4a}*. Cette hypothèse se base sur le fait que le gène *p16^{INK4a}* est hyperméthylé au niveau de son promoteur, ce qui causerait la relocalisation de H2A.Z dans le corps génique et permettrait l'inhibition de l'expression du gène (Liu et al., 2003). Pour les cellules HCT116 *Dnmt1^{-/-}/Dnmt3B^{-/-}*, elles devraient présenter une augmentation au promoteur. Rhee et al. (2002) ont démontré que lorsque la méthylation de l'ADN était abolie au niveau de l'allèle sauvage de *p16^{INK4a}*, il y avait une réexpression possible (Rhee et al., 2002). Pour cela, une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a été effectuée avec des anticorps dirigés contre H2A.Z, la grosse sous-unité de la polymérase II ainsi que l'histone H3 au promoteur et au corps génique de *p16^{INK4a}*. Des amplicons sur une distance de quelques kilobases en amont du site d'initiation de la transcription du gène *p16^{INK4a}* permettra de profiler le promoteur (figure 3.5 a et b).

Une expérience de ChIP a été effectuée contre la grosse sous-unité de l'ARN polymérase II chez les cellules HCT116 afin de vérifier le niveau d'activation de la transcription. Effectivement, la présence accrue de l'ARN polymérase à la chromatine est un indicateur de l'activation de la transcription. En analysant la figure 3.5c, il est possible d'observer un faible enrichissement de l'ARN polymérase II, ce qui indique qu'elle semble présente qu'en faible quantité pour les cellules HCT116 de type sauvage. Tandis que pour les cellules HCT116 ayant une délétion pour

les méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3B, le niveau d'enrichissement de l'ARN polymérase II est élevé, ce qui indiquerait une présence accrue de celle-ci aux différentes régions du locus du gène *p16^{INK4a}* (figure 3.5c). Les résultats obtenus semblent démontrer un niveau d'activation de la transcription du gène suppresseur de tumeur significativement élevé chez les cellules ayant une suppression pour les méthyltransférases comparativement aux cellules HCT116 de type sauvage.

Pour vérifier que les résultats du ChIP de la grosse sous-unité corrélient avec l'activité transcriptionnelle, une expérience de RT-qPCR a été effectuée afin de déterminer le niveau d'expression du gène *p16^{INK4a}*. Pour ce faire, des cellules Wi-38 ont été utilisées comme témoin. Cette dernière correspond à une lignée non cancéreuse qui ne devrait pas exprimer le suppresseur de tumeur *p16^{INK4a}*. En regardant la figure 3.5 d, il est possible d'observer que le niveau d'expression du gène suppresseur de tumeur des cellules ayant une délétion pour les méthyltransférases est 3x fois plus élevée que les cellules de type sauvage et des Wi-38. Ces résultats permettent de conclure que les cellules ayant une délétion pour les méthyltransférases sont en mesure de rétablir l'expression du gène *p16^{INK4a}* comparativement aux cellules HCT116 de type sauvage.

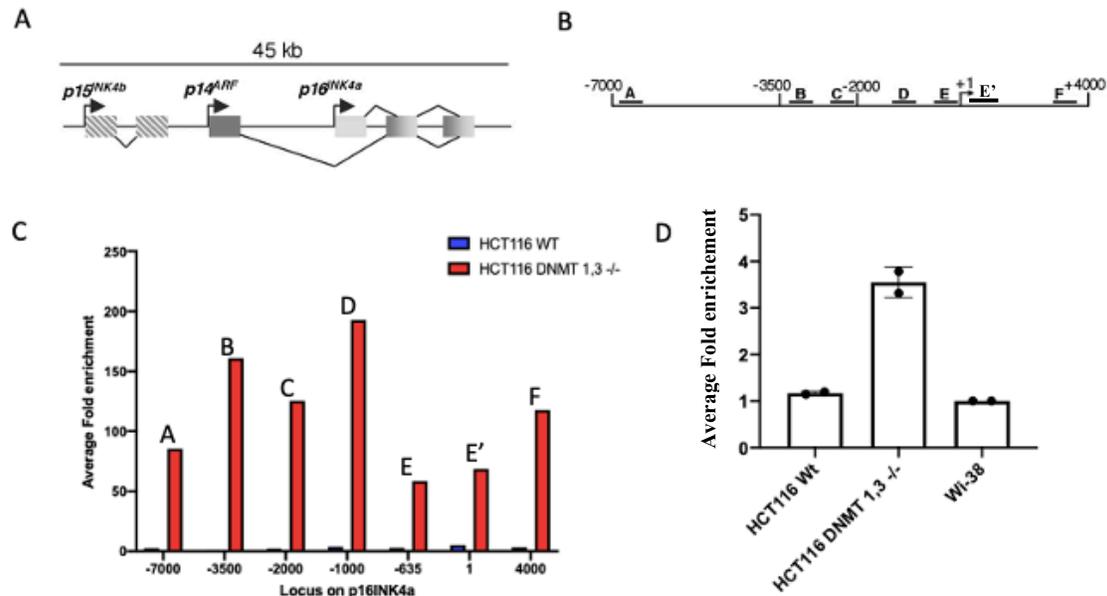


Fig. 3.5 Augmentations significatives de l'enrichissement de la grosse sous-unité de l'ARN polymérase II aux différentes régions du locus du gène *p16^{INK4a}* chez les cellules HCT116 ayant une délétion pour les méthyltransférases. A) Structure de base du gène *p16INK4a* (Witcher et Emerson, 2009) B) Différentes régions du locus du gène *p16INK4a* amplifiées par qPCR pour les expériences de ChIP (A-F) C) Enrichissement de la grosse sous-unité de la polymérase II aux différentes régions du locus du gène *p16INK4a* sur différentes lignées cellulaires. D) Niveau d'expression du gène suppresseur de tumeur *p16INK4a* dans différentes lignées cellulaires.

Une expérience de ChIP dirigée contre H2A.Z démontre un niveau élevé de déposition de H2A.Z tout au long du locus du gène *p16^{INK4a}* pour les cellules HCT116 2 KO en comparaison avec les HCT116 WT (figure 3.6a). Ces résultats démontrent un rôle important du variant d'histone H2A.Z dans l'établissement de la transcription de gène. En effet, chez les cellules humaines, le variant d'histone H2A.Z est associé avec certains promoteurs de gènes pendant leur induction, ce qui permet d'incorporer efficacement la machinerie transcriptionnelle et activer la transcription (Bagchi et al., 2020; Coleman-Derr et Zilberman, 2012).

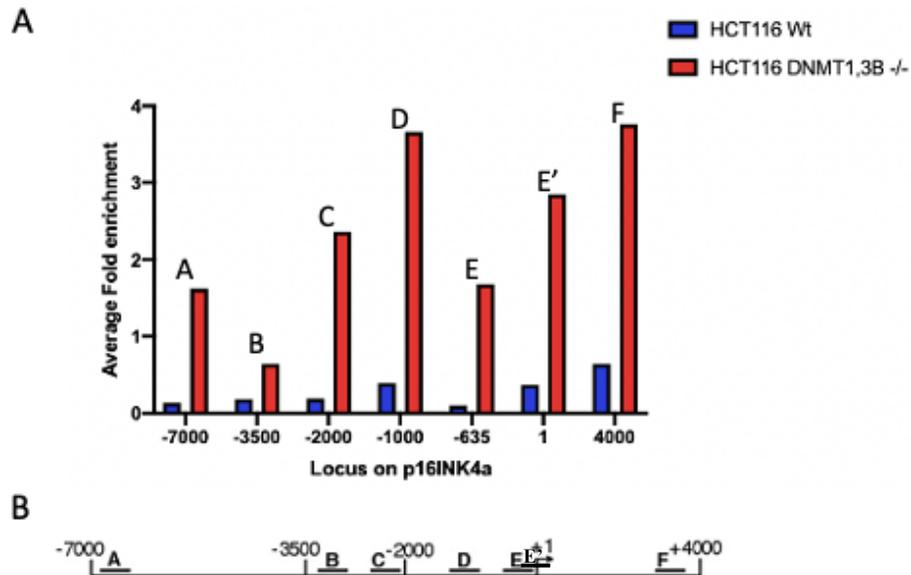


Fig. 3.6 Le variant d'histone H2A.Z est enrichi à de fortes concentrations près du promoteur du gène *p16^{INK4a}* seulement chez les cellules HCT116 ayant une délétion pour les méthyltransférases. A) Enrichissement du variant d'histone H2A.Z au gène p16INK4a sur différentes lignées cellulaires. B) Différentes régions du locus du gène p16INK4a amplifiées par qPCR pour les expériences de ChIP (A-F).

Une troisième expérience d'immunoprécipitation de la chromatine effectuée avec l'histone H3 permet de comparer l'intensité de toutes marques épigénétiques sur la chromatine (Flensburg et al., 2014). Aussi, l'histone H3 est un autre indice du niveau de transcription du gène puisqu'il permet d'observer la densité de compaction de la chromatine (Flensburg et al., 2014). Ce type de contrôle est essentiel particulièrement dans les promoteurs où la densité varie grandement selon l'activité des gènes. En analysant les résultats obtenus lors du ChIP de l'histone H3, on peut observer un niveau élevé d'histone H3 face aux différentes régions du locus du gène *p16^{INK4a}* chez les cellules HCT116 de type sauvage, ce qui permet de suggérer une compaction importante de la chromatine (figure 3.7a). D'un autre côté, chez les cellules ayant

une délétion pour les méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3B, il a été observé un niveau bas d’histones H3 aux différentes régions du locus du gène *p16^{INK4a}*, ce qui corrèle avec l’enrichissement accru du variant d’histone H2A.Z (figure 3.6a et 3.7a). Ces résultats démontrent que la diminution de l’histone H3 au gène *p16^{INK4a}* semble corrélérer avec l’expression du gène.

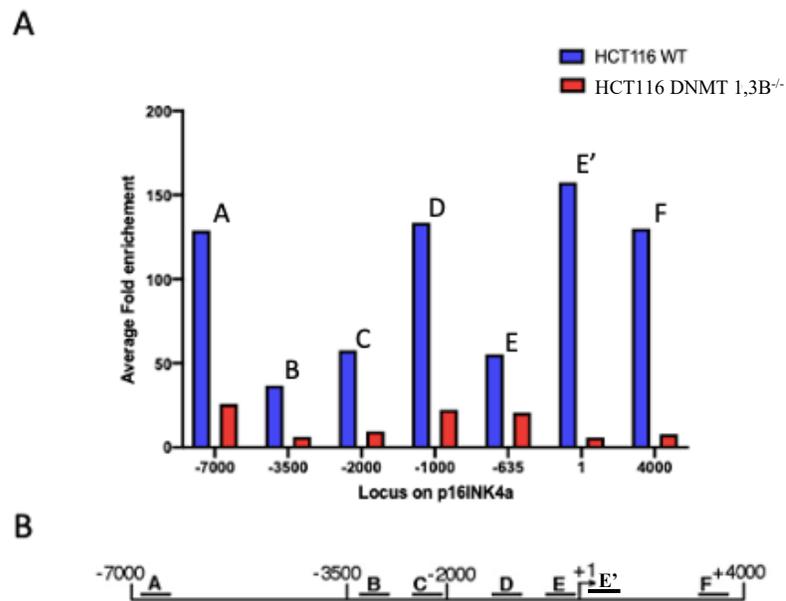


Fig. 3.7 L’histone H3 est enrichie au gène *p16^{INK4a}* seulement chez les cellules HCT116 de type sauvage. A) Enrichissement de l’histone H3 aux différentes régions du locus du gène p16INK4a sur différentes lignées cellulaires. B) Différentes régions du locus du gène p16INK4a amplifiées par qPCR pour les expériences de ChIP (A-F).

Tous les résultats de l’immunoprécipitation de la chromatine semblent converger vers une même conclusion pour les cellules ayant une déplétion pour les méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3B. En regardant plus précisément les résultats, on semble percevoir une perte importante des tétramères d’histone H3/H4 dans les régions codantes du gène *p16^{INK4a}*, tandis qu’à l’opposé, nous avons une augmentation des niveaux de H2A.Z. Donc, l’enrichissement de H2A.Z au niveau des promoteurs corrèle avec le niveau d’expression du gène puisque la chromatine est

dans un état plus permissif à la transcription. Bref, lorsque la méthylation est abolie, la cellule semble activer certaines voies qui étaient réprimées par la méthylation.

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Le complexe Tip60/p400 permet l'acétylation du domaine PWWP de la méthyltransférase Dnmt3B

Le complexe Tip60/p400 a été étudié afin de mieux comprendre son implication dans la relation antagoniste existant entre le variant d'histone H2A.Z et la méthylation de l'ADN. Un premier exemple qui démontre que le complexe peut avoir un rôle à jouer dans cette relation antagoniste réside dans des résultats non publiés de Maud Marques. Ils indiquent qu'*in vivo* Dnmt3B interagit avec le complexe Tip60/p400 et que la sous-unité Tip60 permettrait l'acétylation de la méthyltransférase (Marques, 2012). Ceci a été vérifié en effectuant la surexpression de Tip60, ce qui a augmenté les niveaux de Dnmt3B acétylés. Plus encore, on remarque une augmentation des niveaux de Dnmt3B ubiquitinés ainsi que sa dégradation. Dans les cellules MCF-7, on peut effectivement observer que cette acétylation de Dnmt3B permet de diminuer la quantité totale (Marques, 2012). Il est important de noter que des résultats similaires ont aussi déjà été obtenus avec Dnmt1 (Bronner, 2011).

Afin de vérifier si l'acétylation de la méthyltransférase Dnmt3B par le complexe Tip60/p400 mènerait à son ubiquitination et à sa dégradation, un essai d'acétylation *in vitro* a été effectué sur des fragments de protéines recombinantes. Grâce à cette méthode, il a été possible d'observer que le complexe Tip60/p400 permettrait l'acétylation du domaine *PWWP* de la méthyltransférase Dnmt3B. En se basant sur la littérature, cette réaction permettrait de venir jouer sur la stabilité de la protéine en empêchant ces interactions protéine-protéine ou ADN-protéine (Ge et al., 2004). Alors, il devient intéressant d'aller vérifier la conséquence de l'acétylation sur les fonctions de la Dnmt3B ainsi que le comportement du variant d'histone H2A.Z au niveau des gènes dépourvus de méthylation.

Ge et al. ont démontré que le domaine *PWWP* peut être considéré comme un nouveau module de ciblage de la chromatine et ils suggéraient même que l'association médiée par *PWWP* était essentielle pour la fonction des méthyltransférases de novo (Ge et al., 2004). Ces résultats permettent de confirmer que le complexe Tip60/p400 pourrait avoir un rôle majeur dans la relation antagoniste existant entre la méthylation de l'ADN et le variant d'histone H2A.Z. Pour les essais d'acétylation, j'ai opté pour un complexe Tip60/p400 purifié provenant de cellules HCT116 plutôt que d'une sous-unité Tip60 étiquetée FLAG. Cette décision s'explique par le fait que le complexe Tip60/p400 contient plusieurs cofacteurs essentiels pour l'activité HAT de Tip60 et que lors de la purification de la sous-unité Tip60, la protéine n'est plus en mesure d'acétyler les nucléosomes (Jha et al., 2013). À l'opposé, le complexe Tip60/p400 garde son activité enzymatique, ce qui indique que seulement les expériences contenant le complexe Tip60/p400 seraient capables d'acétyler la méthyltransférase Dnmt3B. Pour terminer, il serait intéressant de cartographier à quel endroit dans le domaine PWWP de Dnmt3B se retrouvent les 14 résidus lysines ayant une modification post-traductionnelle de type acétylation.

4.2 L'hyperméthylation du gène suppresseur de tumeur p16^{INK4a} empêche l'activation de la transcription ainsi que la déposition du variant d'histone H2A.Z dans les cellules HCT116

Le fait de comprendre comment divers facteurs régulent la transcription dans les cellules vivantes a été grandement facilité par les études de ChIP. Cette technique permet de déterminer si oui ou non une protéine est présente dans une région génique donnée (Kim, 2018). Grâce à des expériences de ChIP, il a été possible de suivre les niveaux de déposition de H2A.Z au niveau du gène p16^{INK4a}, l'enrichissement de la grande sous-unité de la polymérase II et de l'histone H3 en absence de la presque totalité de méthylation de l'ADN au niveau génomique. Selon le modèle utilisé, les cellules HCT116 de type sauvage devraient présenter un profil élevé du variant d'histone ainsi que de la sous-unité p400 au niveau du gène p16^{INK4a}. Ce phénomène pourrait être causé par l'hyperméthylation du promoteur de p16^{INK4a}, ce qui causerait un déplacement de ces deux protéines au niveau du corps génique du gène. Pour les cellules 2 KO pour la méthyltransférases Dnmt1 et Dnmt3B, elles devraient présenter une augmentation du

variant d'histone H2A.Z ainsi que de la sous-unité p400 au niveau du promoteur de *p16^{INK4a}*. Ceci serait possible en émettant l'hypothèse que la majorité de la méthylation de l'ADN est abolie dans ces cellules, ce qui permettrait alors à ces protéines de se relocaliser au niveau du promoteur et permettre l'expression du gène *p16^{INK4a}*. Dans des expériences ultérieures, le ChIP de la sous-unité p400 ou Tip60 sera effectué afin d'étudier plus en détail son rôle dans la relation existant entre la méthylation de l'ADN et le variant d'histone H2A.Z. Afin de bien comprendre les résultats présentés dans les prochaines sections, il est important de comprendre le rôle de chacun des anticorps utilisés. En premier lieu, l'utilisation d'un anticorps contre l'histone H3 donne une mesure de l'occupation des nucléosomes à une région indiquée. Ensuite, le ChIP de la grosse sous-unité de la polymérase II donne une mesure du taux de transcription à travers une région (Flensburg et al., 2014). Donc, plus il y a la présence de la polymérase, plus l'activité génique à cet endroit est importante.

Il a été démontré que le promoteur du suppresseur de tumeur *p16^{INK4a}* est hyperméthylé dans plusieurs types de cancer, ce qui empêche l'activation de la transcription du gène et empêche la déposition de variant d'histone H2A.Z (Rhee et al., 2002). Ces observations semblent concorder avec les résultats obtenus lors de l'expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Effectivement, il semble y avoir un faible niveau de déposition du variant d'histone H2A.Z le long des différents locus du gène *p16^{INK4a}* chez les cellules HCT116 de type sauvage. De plus, je supposais qu'il y aurait une relocalisation importante du variant d'histone au niveau du corps génique de *p16^{INK4a}*. Malheureusement, ces résultats ne permettent pas d'observer cela. Ce phénomène s'explique en partie puisque H2A.Z semble être retrouvé dans les promoteurs inactifs de gène actif transcriptionnellement (Miranda et al., 2011). Cependant, dans le cas des cellules HCT116, le gène est inactivé par la présence accrue de méthylation de l'ADN, ce qui expliquerait l'absence du variant d'histone H2A.Z (Rhee et al., 2002). Un autre indice de la faible transcription du gène peut être observé à l'aide du ChIP de l'histone H3. On observe alors un niveau élevé d'histone H3 face aux différents locus du gène *p16^{INK4a}*, ce qui permet de suggérer une compaction importante de la chromatine par la présence accrue de nucléosome qui

empêcherait l'ARN polymérase II de se lier au site d'initiation de la transcription (Ranjan et al., 2020).

4.3 H2A.Z est localisé au niveau du promoteur du gène p16^{INK4a} lorsque la méthylation génomique est abolie (en absence de Dnmt1 et Dnmt3B), ce qui permet la réexpression du gène suppresseur de tumeur

Au niveau des cellules HCT116 avec une suppression génique au niveau des méthyltransférases Dnmt1 et 3B, nous avons un niveau élevé de déposition de H2A.Z tout au long du locus du gène p16^{INK4a} en comparaison avec les HCT116 WT. Par contre, on s'attendait à avoir un niveau beaucoup plus élevé du variant d'histone près du site d'initiation de la transcription dans cette lignée cellulaire puisqu'en général, chez les cellules humaines, le variant d'histone H2A.Z est associé avec certains promoteurs de gènes pendant leur induction (Giaino et al., 2019). Cette association avec le promoteur permet d'incorporer efficacement la machinerie transcriptionnelle et activer la transcription (Bagchi et al., 2020; Coleman-Derr et Zilberman, 2012). En plus de son rôle dans la transcription des gènes, le variant d'histone H2A.Z jouerait un rôle important lors de l'initiation de la transcription (Ranjan et al., 2020). Donc, le niveau beaucoup moins élevé du variant d'histone H2A.Z pourrait s'expliquer par le fait que ces deux protéines ne semblent pas co-occuper le promoteur au même moment. Le variant d'histone H2A.Z est incorporé avant l'ARN polymérase II et se retrouve expulsé lorsque la polymérase est chargée (Ranjan et al., 2020). Cette perte de H2A.Z au niveau du promoteur amènerait ainsi une augmentation de l'accessibilité des sites de liaison pour les facteurs de transcriptions. Bref, face à toutes ces observations, le faible niveau de H2A.Z obtenu au niveau du gène p16^{INK4a} démontre que le passage de la polymérase pourrait possiblement pousser et retirer les nucléosomes qui se retrouvent en aval de la boucle de réplication (Bagchi et al., 2020; Coleman-Derr et Zilberman, 2012). Il est alors possible de conclure qu'une augmentation du variant d'histone a lieu lorsque la méthylation au niveau génomique est abolie.

Un autre résultat intéressant se situe au niveau de l'expérience de CHIP de l'histone H3. Lors de l'analyse, on observe un bas niveau d'histone H3 face aux différents locus du gène p16^{INK4a},

ce qui permet de suggérer une chromatine plus permissive. Cependant, il semble tout de même que l'histone H3 se retrouve encore dans une concentration assez importante. Pour expliquer ce phénomène, il faut revenir à la base de la transcription des gènes chez les eucaryotes. En effet, l'ARN polymérase II semble être en mesure de pousser et retirer les nucléosomes, ce qui permet d'obtenir une région libre de nucléosomes et d'activer la transcription (Ranjan et al., 2020). Cependant, ces histones sont rapidement déposées derrière la polymérase afin d'éviter une fausse initiation de la transcription dans le corps génique (Kraushaar et al., 2013). Cette récupération peut s'effectuer selon deux mécanismes distincts chez les gènes eucaryotes. Le premier mécanisme se situe au niveau des gènes hautement transcrits. Dans celui-ci, il a été observé que le passage de la polymérase II causait une perte partielle ainsi qu'un remaniement de toutes les histones (Thiriet, 2006). Tandis que dans le cas d'un gène modérément transcrit, il s'agirait plutôt d'un remaniement important du dimère H2A-H2B, mais pas au niveau des tétramères d'histones H3-H4 (Thiriet, 2006). Donc, la concentration d'histone H3 observée dans les résultats de ChIP ainsi que dans les résultats de RT-qPCR démontre que le gène *p16^{INK4a}* semble modérément transcrit, ce qui pourrait possiblement expliquer la présence importante de l'histone H3 au niveau de chacun des locus. Un autre fait intéressant trouvé dans la littérature fait référence au variant d'histone H2A.Z qui serait en mesure de préserver une partie des tétramères d'histones H3-H4 pendant la transcription (Subramanian et al., 2015). Dans cet article scientifique, on peut voir que l'incorporation du variant d'histone H2A.Z au nucléosome +1 régule l'élongation en facilitant la perte du dimère H2A.Z/ H2B sans la déplétion des tétramères H3/H4 (Subramanian et al., 2015), ce qui peut expliquer en partie les résultats obtenus.

Face à tous les résultats de ChIP obtenus, il a été possible de fournir un aperçu mécanistique dans lequel H2A.Z pourrait moduler la barrière établie par les nucléosomes en modifiant l'état de la chromatine. Ce dernier semble être retrouvé dans les promoteurs inactifs de gène actif transcriptionnellement, ce qui permet ultérieurement leur activation. De plus, selon plusieurs études, H2A.Z a un effet déstabilisant sur les interactions entre histones ainsi qu'aux niveaux internucléosomiques (Bönisch et Hake, 2012). Une telle déstabilisation des nucléosomes est

cohérente avec les rôles physiologiques attribués à ce variant. H2A.Z semble être un acteur important dans la régulation de la transcription par son enrichissement important aux promoteurs ainsi que dans le recrutement de l'ARN polymérase II et certains facteurs de transcription (Lewis et al., 2021). Par exemple, il est connu que lors du passage de l'ARN pol II à travers un gène, une partie des dimères H2A.Z- H2B est perdu. Cet évènement est possible puisque le variant d'histone H2A.Z est beaucoup plus instable que les autres histones composant le cœur du nucléosome (Kireeva et al., 2002). Ce phénomène peut s'expliquer grâce à la structure cristalline de l'histone H2A.Z. Il a été observé que seulement quelques acides aminés semblent différents dans sa séquence par rapport à H2A, ce qui entraîne une déstabilisation de son interaction avec H3- H4 par son domaine d'amarrage (Bönisch et Hake, 2012). L'ARN polymérase II peut alors se déposer sur l'ADN et causer plus facilement la perte du dimère d'histone H2A.Z-H2B, ce qui améliore l'allongement de la transcription à travers le génome.

Afin d'amener le projet de recherche à un niveau supérieur, il serait intéressant d'effectuer un silençage à l'aide de siRNA dirigé contre le gène $p16^{INK4a}$ au niveau des cellules HCT116 *Dnmt1, 3B* *-/-*. Cette expérience permettrait de vérifier s'il est possible d'obtenir un profil de déposition de H2A.Z et de l'ARN polymérase II semblable aux cellules HCT116 et Wi-38, des fibroblastes de poumons. Cette dernière correspond à une non cancéreuse qui ne devrait pas exprimer le suppresseur de tumeur $p16^{INK4a}$. En théorie, on devrait observer une augmentation des niveaux de H2A.Z dans le corps génique des gènes ainsi qu'une diminution de l'ARN polymérase II au niveau des locus de $p16^{INK4a}$, ce qui causerait l'inhibition globale de la transcription. Malheureusement, les expériences de CHIP au niveau du complexe Tip60/p400 n'ont pas été effectuées, mais elles permettraient de vérifier le rôle du complexe dans la relation existant entre la méthylation de l'ADN et le variant d'histone H2A.Z.

En conclusion, mes travaux de maîtrise m'ont permis de mieux comprendre l'interaction existante entre le domaine *PWWP* de la protéine Dnmt3B et le complexe Tip60/p400. Aussi, mes travaux m'ont permis d'observer le patron d'incorporation du variant d'histone H2A.Z lorsque la méthylation génomique est abolie. En effet, l'analyse de mes résultats a démontré que

l'incorporation de H2A.Z près des promoteurs au niveau du gène p16^{INK4a} favorise la transcription et empêche la déposition de la méthylation de l'ADN. En résumé, ce projet nous a permis de découvrir une troisième composante, le complexe Tip60/p400, jouant un rôle important dans la relation antagoniste existant entre la méthylation de l'ADN et le variant d'histone H2A.Z.

BIBLIOGRAPHIE

- Abi Khalil, C., 2014. The emerging role of epigenetics in cardiovascular disease. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 5, 178-187. <https://doi.org/10.1177/2040622314529325>
- Armeev, G.A., Gribkova, A.K., Pospelova, I., Komarova, G.A., Shaytan, A.K., 2019. Linking chromatin composition and structural dynamics at the nucleosome level. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 56, 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.11.006>
- Bagchi, D.N., Battenhouse, A.M., Park, D., Iyer, V.R., 2020. The histone variant H2A.Z in yeast is almost exclusively incorporated into the +1 nucleosome in the direction of transcription. *Nucleic Acids Res.* 48, 157-170. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1075>
- Becker, P.B., Workman, J.L., 2013. Nucleosome remodeling and epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017905>
- Bollati, V., Baccarelli, A., 2010. Environmental epigenetics. *Heredity (Edinb)*. 105, 105-112. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.2>
- Bonev, B., Cavalli, G., 2016. Organization and function of the 3D genome. *Nat. Rev. Genet.* 17, 661-678. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.112>
- Bönisch, C., Hake, S.B., 2012. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: More or less stable? *Nucleic Acids Res.* 40, 10719-10741. <https://doi.org/10.1093/nar/gks865>
- Brewis, H.T., Wang, A.Y., Gaub, A., Lau, J.J., Stirling, P.C., Kobor, M.S., 2021. What makes a histone variant a variant: Changing H2A to become H2A.Z. *PLoS Genet.* 17. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009950>
- Bronner, C., 2011. Control of DNMT1 abundance in epigenetic inheritance by acetylation, ubiquitylation, and the histone code. *Sci. Signal.* 4, 1-4. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001764>
- Buccitelli, C., Selbach, M., 2020. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat. Rev. Genet.* 21, 630-644. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>
- Buck, M.J., Lieb, J.D., 2004. ChIP-chip: Considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* 83, 349-360. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.11.004>
- Carter, B., Zhao, K., 2021. The epigenetic basis of cellular heterogeneity. *Nat. Rev. Genet.* 22, 235-250. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00300-0>
- Carter, R., Drouin, G., 2009. Structural differentiation of the three eukaryotic RNA polymerases. *Genomics* 94, 388-396. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.08.011>

- Coleman-Derr, D., Zilberman, D., 2012. Deposition of Histone Variant H2A.Z within Gene Bodies Regulates Responsive Genes. *PLoS Genet.* 8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002988>
- Colino-Sanguino, Y., Clark, S.J., Valdes-Mora, F., 2022. The H2A.Z-nucleosome code in mammals: emerging functions. *Trends Genet.* 38, 273-289.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.10.003>
- Conerly, M.L., Teves, S.S., Diolaiti, D., Ulrich, M., Eisenman, R.N., Henikoff, S., 2010. Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis. *Genome Res.* 20, 1383-1390. <https://doi.org/10.1101/gr.106542.110>
- Costa, F.F., 2010. Epigenomics in cancer management. *Cancer Manag. Res.* 2, 255-265.
<https://doi.org/10.2147/CMR.S7280>
- Cutter, A., J. Hayes, J., 2015. A Brief Review of Nucleosome Stru. *FEBS Lett.* 589, 2914-2922. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016>
- da Silva, A.N.B., de Souza, R. de C.M., Honorato, N.R.M., Martins, R.R., da Câmara, A.C.J., Galvão, L.M. da C., Chiari, E., 2020. Comparison of phenol-chloroform and a commercial deoxyribonucleic acid extraction kit for identification of bloodmeal sources from triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 53, 1-9.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0189-2020>
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W., 1988. High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.
<https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., Côté, J., 2004. Structural and Functional Conservation of the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex from Yeast to Humans. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1884-1896. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.5.1884-1896.2004>
- Dryhurst, D., Ausió, J., 2014. Histone H2A.Z deregulation in prostate cancer. Cause or effect? *Cancer Metastasis Rev.* 33, 429-439. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9486-9>
- Dueva, R., Akopyan, K., Pederiva, C., Trevisan, D., Dhanjal, S., Lindqvist, A., Farnebo, M., 2019. Neutralization of the Positive Charges on Histone Tails by RNA Promotes an Open Chromatin Structure. *Cell Chem. Biol.* 26, 1436-1449.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.08.002>
- Feklistov, A., 2013. RNA polymerase: In search of promoters. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1293, 25-32. <https://doi.org/10.1111/nyas.12197>
- Feng, L.Y., Chen, C.X., Li, L., 2019. Hypermethylation of tumor suppressor genes is a risk factor for poor prognosis in ovarian cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 98, e14588. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014588>

- Flensburg, C., Kinkel, S.A., Keniry, A., Blewitt, M.E., Oshlack, A., 2014. A comparison of control samples for ChIP-seq of histone modifications. *Front. Genet.* 5, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00329>
- Fraser, L.T.C.R., Dikdan, R.J., Dey, S., Singh, A., Tyagi, S., 2021. Reduction in gene expression noise by targeted increase in accessibility at gene loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, 1-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018640118>
- Gagliardi, M., Strazzullo, M., Matarazzo, M.R., 2018. DNMT3B functions: Novel insights from human disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00140>
- Ge, Y.Z., Pu, M.T., Gowher, H., Wu, H.P., Ding, J.P., Jeltsch, A., Xu, G.L., 2004. Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J. Biol. Chem.* 279, 25447-25454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312296200>
- Giaimo, B.D., Ferrante, F., Herchenröther, A., Hake, S.B., Borggrefe, T., 2019. The histone variant H2A.Z in gene regulation. *Epigenetics and Chromatin* 12, 1-22. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0274-9>
- Green, M.R., 2005. Eukaryotic transcription activation: Right on target. *Mol. Cell* 18, 399-402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.017>
- Grigorian, M., DeBruhl, H., Lipsick, J.S., 2017. The role of variant histone H2AV in *Drosophila melanogaster* larval hematopoiesis. *Dev.* 144, 1441-1449. <https://doi.org/10.1242/dev.142729>
- Guillemette, B., Gaudreau, L., 2006a. Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochem. Cell Biol.* 84, 528-535. <https://doi.org/10.1139/O06-077>
- Guillemette, B., Gaudreau, L., 2006b. H2A.Z: Un variant d'histone qui orne les promoteurs des gènes. *Medecine/Sciences* 22, 941-946. <https://doi.org/10.1051/medsci/20062211941>
- Gupta, K., Sari-Ak, D., Haffke, M., Trowitzsch, S., Berger, I., 2016. Zooming in on Transcription Preinitiation. *J. Mol. Biol.* 428, 2581-2591. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.003>
- Herman, J.G., Lapidus, R.G., Issa, J.P.J., Davidson, N.E., Sidransky, D., Baylin, S.B., Baylin, S.B., Merlo, A., Mao, L., Sidransky, D., 1995. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 Gene Is Frequently Associated with Aberrant DNA Methylation in All Common Human Cancers. *Cancer Res.* 55, 4525-4530.
- Hervouet, E., Peixoto, P., Delage-Mourroux, R., Boyer-Guittaut, M., Cartron, P.F., 2018. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Clin. Epigenetics* 10, 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0450-y>
- Hong, Q., Shao, Z.M., 2011. Ubiquitination/deubiquitination and acetylation/deacetylation: Making DNMT1 stability more coordinated. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 139-140. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.3>

- Hu, Y., An, Y., Fang, N., Li, Y., Jin, H., Nazarali, A., Ji, S., 2015. The Optimization of Soluble PTEN Expression in *Escherichia coli*. *Open Biochem. J.* 9, 42-48. <https://doi.org/10.2174/1874091x01509010042>
- IDRISSOU, M., BOISNIER, T., SANCHEZ, A., KHOUFAF, F.Z.H., PENAULT-LLORCA, F., BIGNON, Y.J., BERNARD-GALLON, D., 2020. TIP60/P400/H4K12ac plays a role as a heterochromatin back-up skeleton in breast cancer. *Cancer Genomics and Proteomics* 17, 687-694. <https://doi.org/10.21873/CGP.20223>
- Jeltsch, A., Jurkowska, R.Z., 2016. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - A new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res.* 44, 8556-8575. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw723>
- Jha, S., Gupta, A., Dar, A., Dutta, A., 2013. RVBs Are Required for Assembling a Functional TIP60 Complex. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1164-1174. <https://doi.org/10.1128/mcb.01567-12>
- Kamakaka, R.T., Biggins, S., 2005. Histone variants: Deviants? *Genes Dev.* 19, 295-310. <https://doi.org/10.1101/gad.1272805>
- Kar, S., Deb, M., Sengupta, D., Shilpi, A., Parbin, S., Torrisani, J., Pradhan, S., Patra, S.K., 2012. An insight into the various regulatory mechanisms modulating human DNA methyltransferase 1 stability and function. *Epigenetics* 7, 994-1007. <https://doi.org/10.4161/epi.21568>
- Kidder, B.L., Hu, G., Zhao, K., 2011. ChIP-Seq: Technical considerations for obtaining high-quality data. *Nat. Immunol.* 12, 918-922. <https://doi.org/10.1038/ni.2117>
- Kim, T.H.T., 2018. ChIP-seq. *Cold Spring Harb. Protoc.* 5, 1559-6095.
- Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M., Studitsky, V.M., 2002. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: Loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol. Cell* 9, 541-552. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00472-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00472-0)
- Kraushaar, D.C., Jin, W., Maunakea, A., Abraham, B., Ha, M., Zhao, K., 2013. Genome-wide incorporation dynamics reveal distinct categories of turnover for the histone variant H3.3. *Genome Biol.* 14, 1. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r121>
- Kuninger, D., Lundblad, J., Semirale, A., Rotwein, P., 2007. A Non-Isotopic In Vitro Assay for Histone Acetylation. *J Biotechnol.* 133, 253-260.
- Laisné, M., Gupta, N., Kirsh, O., Pradhan, S., Defossez, P.A., 2018. Mechanisms of DNA methyltransferase recruitment in mammals. *Genes (Basel).* 9. <https://doi.org/10.3390/genes9120617>
- Lashgari, A., Fauteux, M., Maréchal, A., Gaudreau, L., 2018. Cellular Depletion of BRD8 Causes p53-Dependent Apoptosis and Induces a DNA Damage Response in Non-Stressed Cells. *Sci. Rep.* 8, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32323-3>

- Lashgari, A., Millau, J.F., Jacques, P.É., Gaudreau, L., 2017. Global inhibition of transcription causes an increase in histone H2A.Z incorporation within gene bodies. *Nucleic Acids Res.* 45, 12715-12722. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx879>
- Lewis, T.S., Sokolova, V., Jung, H., Ng, H., Tan, D., 2021. Structural basis of chromatin regulation by histone variant H2A.Z. *Nucleic Acids Res.* 49, 11379-11391. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab907>
- Liu, Y., An, Q., Li, L., Zhang, D., Huang, J., Feng, X., Cheng, S., Gao, Y., 2003. Hypermethylation of p16INK4a in Chinese lung cancer patients: Biological and clinical implications. *Carcinogenesis* 24, 1897-1901. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg169>
- Ma, J., 2011. Transcriptional activators and activation mechanisms. *Protein Cell* 2, 879-888. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1101-7>
- Magaña-Acosta, M., Valadez-Graham, V., 2020. Chromatin Remodelers in the 3D Nuclear Compartment. *Front. Genet.* 11, 1-22. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.600615>
- Marques, M., 2012. Étude De La Régulation De L'Expression De Gènes Cibles Du Récepteur Aryl Hydrocarbone Dans Des Cellules Cancéreuses De La Glande Mammaire.
- Marques, M., Laflamme, L., Gaudreau, L., 2013. Estrogen receptor α can selectively repress dioxin receptor-mediated gene expression by targeting DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* 41, 8094-8106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt595>
- Marques, M., Laflamme, L., Gervais, A.L., Gaudreau, L., 2010. Reconciling the positive and negative roles of histone H2A.Z in gene transcription. *Epigenetics* 5, 267-272. <https://doi.org/10.4161/epi.5.4.11520>
- Matsuda, R., Hori, T., Kitamura, H., Takeuchi, K., Fukagawa, T., Harata, M., 2010. Identification and characterization of the two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant. *Nucleic Acids Res.* 38, 4263-4273. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq171>
- Mattera, L., Escaffit, F., Pillaire, M.J., Selves, J., Tyteca, S., Hoffmann, J.S., Gourraud, P.A., Chevillard-Briet, M., Cazaux, C., Trouche, D., 2009. The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene* 28, 1506-1517. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.499>
- Millán-Zambrano, G., Burton, A., Bannister, A.J., Schneider, R., 2022. Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function. *Nat. Rev. Genet.* 0123456789. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>
- Miranda, K., Pace, D. a, Cintron, R., Rodrigues, J.C.F., Fang, J., Smith, A., Rohloff, P., Coelho, E., Haas, F. De, Souza, D., Coppens, I., Sibley, L.D., Moreno, S.N.J., 2011. Histone Variant H2A.Z Marks the 5' Ends of Both Active and Inactive Genes in Euchromatin. *Cell* 123, 233-248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07165.x.Characterization>

- Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S.A., Suliman, S., Mustafa, K., Vindenes, H., Idris, S.B., 2018. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res. Ther.* 9, 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>
- Monteiro, F.L., Baptista, T., Amado, F., Vitorino, R., Jerónimo, C., Helguero, L.A., 2014. Expression and functionality of histone H2A variants in cancer. *Oncotarget* 5.
- Morrison, O., Thakur, J., 2021. Molecular complexes at euchromatin, heterochromatin and centromeric chromatin. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22136922>
- Narkaj, K., Stefanelli, G., Wahdan, M., Azam, A.B., Ramzan, F., Steininger, C.F.D., Walters, B.J., Zovkic, I.B., 2018. Blocking H2A.Z incorporation via Tip60 inhibition promotes systems consolidation of fear memory in mice. *eNeuro* 5. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0378-18.2018>
- Obri, A., Ouararhni, K., Papin, C., Diebold, M.L., Padmanabhan, K., Marek, M., Stoll, I., Roy, L., Reilly, P.T., Mak, T.W., Dimitrov, S., Romier, C., Hamiche, A., 2014. ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* 505, 648-653. <https://doi.org/10.1038/nature12922>
- Park, J.H., Sun, X.-J., Roeder, R.G., 2010. The SANT Domain of p400 ATPase Represses Acetyltransferase Activity and Coactivator Function of TIP60 in Basal p21 Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2750-2761. <https://doi.org/10.1128/mcb.00804-09>
- Portillo-ledesma, S., Tsao, L.H., Wagley, M., Lakadamyali, M., Cosma, M.P., Schlick, T., Academy, C., Building, G., 2022. parameters 433, 1-34. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.001>. Nucleosome
- Rangasamy, D., 2010. Histone Variant H2A.Z Can Serve as a New Target for Breast Cancer Therapy. *Curr. Med. Chem.* 17, 3155-3161. <https://doi.org/10.2174/092986710792231941>
- Ranjan, A., Nguyen, V.Q., Liu, S., Wisniewski, J., Kim, J.M., Tang, X., Mizuguchi, G., Elalaoui, E., Nickels, T.J., Jou, V., English, B.P., Zheng, Q., Luk, E., Lavis, L.D., Lionnet, Ti., Wu, C., 2020. Live-cell single particle imaging reveals the role of RNA polymerase II in histone H2A.Z eviction. <https://doi.org/https://doi.org/10.7554/eLife.55667> Open access
- Rhee, I., Bachman, K.E., Park, B.H., Jair, K.W., Yen, R.W.C., Schuebel, K.E., Cui, H., Feinberg, A.P., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Baylin, S.B., Vogelstein, B., 2002. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416, 552-556. <https://doi.org/10.1038/416552a>
- Rispol, J., Baron, L., Beaulieu, J.F., Chevillard-Briet, M., Trouche, D., Escaffit, F., 2019. The H2A.Z histone variant integrates Wnt signaling in intestinal epithelial homeostasis. *Nat. Commun.* 10, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09899-z>

- Rose, N.R., Klose, R.J., 2014. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1839, 1362-1372. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.007>
- Sainsbury, S., Bernecky, C., Cramer, P., 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 129-143. <https://doi.org/10.1038/nrm3952>
- Sandhu, R., Rivenbark, A.G., Coleman, W.B., 2012. Enhancement of chemotherapeutic efficacy in hypermethylator breast cancer cells through targeted and pharmacologic inhibition of DNMT3b. *Breast Cancer Res. Treat.* 131, 385-399. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1409-2>
- Sapountzi, V., Logan, I.R., Robson, C.N., 2006. Cellular functions of TIP60. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1496-1509. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.03.003>
- Schachner, L.F., Jooß, K., Morgan, M.A., Piunti, A., Meiners, M.J., Kafader, J.O., Lee, A.S., Iwanaszko, M., Cheek, M.A., Burg, J.M., Howard, S.A., Keogh, M.-C., Shilatifard, A., Kelleher, N.L., 2021. Decoding the Protein Composition of Whole Nucleosomes with Nuc-MS Luis. *Nat. Methods* 18, 303-308. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01052-9>
- Sharma, S., Kelly, T.K., Jones, P.A., 2009. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27-36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
- Shen, T., Ji, F., Wang, Y., Lei, X., Zhang, D., Jiao, J., 2018. Brain-specific deletion of histone variant H2A.z results in cortical neurogenesis defects and neurodevelopmental disorder. *Nucleic Acids Res.* 46, 2290-2307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1295>
- Song, C., Zhang, S., Huang, H., 2015. Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Front. Microbiol.* 6, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01049>
- Squatrito, M., Gorrini, C., Amati, B., 2006. Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol.* 16, 433-442. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.07.007>
- Subramanian, V., Fields, P.A., Boyer, L.A., 2015. H2A.Z: A molecular rheostat for transcriptional control. *F1000Prime Rep.* 7. <https://doi.org/10.12703/P7-01>
- Thiriet, C.C., 2006. Histone dynamics during transcription : exchange of H2A/H2B dimers and H3/H4 tetramers during pol II elongation. *Results Probl Cell Differ.* 41, 77-90. https://doi.org/doi:10.1007/400_009.
- Wang, Y., Stumph, W.E., 1995. RNA polymerase II/III transcription specificity determined by TATA box orientation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8606-8610. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8606>

- Wang, Z., Chivu, A.G., Choate, L.A., Rice, E.J., Miller, D.C., Chu, T., Chou, S.P., Kingsley, N.B., Petersen, J.L., Finno, C.J., Bellone, R.R., Antczak, D.F., Lis, J.T., Danko, C.G., 2022. Prediction of histone post-translational modification patterns based on nascent transcription data. *Nat. Genet.* 54, 295-305. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01026-x>
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., Schübeler, D., 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 457-466. <https://doi.org/10.1038/ng1990>
- Witcher, M., Emerson, B.M., 2009. Epigenetic Silencing of the p16INK4a Tumor Suppressor Is Associated with Loss of CTCF Binding and a Chromatin Boundary. *Mol. Cell* 34, 271-284. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.001>
- Wu, C., Bassett, A., Travers, A., 2007. A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. *EMBO Rep.* 8, 1129-1134. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401115>
- Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F.M., Martinez, E., 2007. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes & DNA motifs enriched in TATA-less core promoters_Gene_2007.pdf. *Gene* 1, 52-65.
- Yang, X., Noshmehr, Houtan, Noshmehr, Han, Andreu-Vieyra, C., Liang, G., Jones, P.A., 2012. Gene reactivation by 5-aza-2'-deoxycytidine-induced demethylation requires srcap-mediated H2A.Z insertion to establish nucleosome depleted regions. *PLoS Genet.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002604>
- Yong, W.S., Hsu, F.M., Chen, P.Y., 2016. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics and Chromatin* 9, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0075-3>
- Zhang, J., Yang, C., Wu, C., Cui, W., Wang, L., 2020. DNA methyltransferases in cancer: Biology, paradox, aberrations, and targeted therapy. *Cancers (Basel)*. 12, 1-22. <https://doi.org/10.3390/cancers12082123>
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., Henikoff, S., 2008. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125-129. <https://doi.org/10.1038/nature07324>

