



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Génétique Moléculaire

Présentée et soutenue par GRÉZY Aude
Le 6 Octobre 2015

Titre : *Implication de l'acétyltransférase TIP60 dans le maintien de l'hétérochromatine péricentromérique chez les mammifères*

JURY

Pr GLEIZES Pierre-Emmanuel (Président)
Dr KHOCHBIN Saadi (Rapporteur)
Dr JAULIN Christian (Rapporteur)
Dr DEJARDIN Jérôme (Rapporteur)
Dr SEITZ Hervé (Examineur)

Ecole doctorale : *Biologie, Santé, Biotechnologie*
Unité de recherche : *LBCMCP, CNRS UMR5088*
Directeur(s) de Thèse : *Dr TROUCHE Didier et Dr CHEVILLARD-BRIET Martine*

Je remercie le LBCMCP et l'équipe de Didier Trouche pour ce que j'ai appris, tous domaines confondus au cours de ces cinq années. En particulier Martine pour son expertise et son soutien.

Je remercie pour tout pendant ces années de thèse mais aussi pour les autres années, mes parents, mes amis (particulièrement Noémie, Anne, Clémentine et Marie), Claire, Arnaud, bébé Adam et Wifi.....

Au cours de cette thèse j'ai développé des compétences techniques, comme cultiver des cellules pour en extraire leur ADN et peut-être (je dis bien peut-être) des réponses qui vont avec. J'ai vu la ténacité qui est nécessaire aux chercheurs. J'ai appréhendé le monde de la chromatine et plus particulièrement de l'hétérochromatine et des séquences répétées. Mais appréhender est le mot juste car j'ai aussi appris à quel point on ne fait seulement qu'effleurer quelque chose, de très très loin encore. Ce que j'ai mis le plus de temps à comprendre et à admettre au cours de ces années, c'est que la vérité, la preuve infaillible, n'existent pas ; que tout est toujours une interprétation, pour donner des modèles, et juste des modèles, qui ne sont que notre perception. J'ai eu beaucoup de mal à accepter cette espèce d'inexactitude des résultats expérimentaux, et j'en ai quand même bien voulu aux cellules de ne pas toujours faire tout pareil, bref d'être vivantes. Je ne sais donc pas ce qui été a une aventure pendant ces années : travailler sur du vivant, ou avec des vivants (et oui les êtres humains aussi ont du travailler avec moi les pauvres), ou attendre que les cellules se décident à offrir un résultat. Parce que j'ai aussi appris que toute les hypothèses du monde ne valent pas la réalité et que c'est bien la cellule et l'expérimentation qui décide. J'ai là aussi eu du mal à accepter que les résultats puissent être différents de l'hypothèse ou qu'ils puissent arriver par hasard, là où on ne les cherchait pas. Quand on me demande ce que j'ai appris au cours de cette thèse, ce n'est pas la chromatine et ses techniques. J'ai appris à essayer de raisonner différemment, de manière moins bornée (là évidemment j'essaye encore) et plus ouverte. J'ai appris à ne pas attendre du monde qu'il corresponde à ce que j'en ai prévu, mais bien d'accepter qu'il puisse toujours me surprendre....

Bonne lecture...

Abbréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
rDNA : ADN ribosomique
ARN : Acide Ribonucléique
ARNr : ARN ribosomique
ARNm : ARN messenger
RNAi : interférence à l'ARN
A : Adénosine
T : Thymidine
G : Guanine
C : Cytosine
ATP : Adénosime Triphosphate
Kd : Kilodalton
nm : nanomètre
nt : nucleotide
HC : Hétérochromatine
dpc : days post-coitum
KO : Knockout
N-ter : terminaison NH₂
C-ter : extrémité carboxy-terminale
ChIP : Immunprécipitation de chromatine
TSA : Trichostatine A
HAT : Histone Acétyltransférase
HDAC : Histone déacétylase
DNMT : Méthyltransférase de l'ADN
MBD : Domaine de liaison au CpGs méthylés
BET : Bromodomaine et extra-terminal
CTM : Motif terminal CH₂
PEV : Variégation par effet de position
MYST : Moz, Ybf2/Sas3, Sas2, TIP60
SAHA : Acide suberanilohydroxamic
PCT : Péricentromères.
CT : Centromères
MAT : Locus de déterminisme sexuel
LTR : Séquence terminale longue répétée
SINE : Petit élément nucléaire intercalé
LINE : Long élément nucléaire intercalé
UTR : Région non traduite
ORF : Phase ouverte de lecture
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
Su(var) : Suppresseur de variégation
HP1 : Hétérochromatine Protein 1

PRC : Complexe répresseur Polycomb
siRNA : petits ARN interférents
RITS : Répression post-transcriptionnelle induite par les ARN
MEF : Fibroblaste embryonnaire de souris
PT : Protéine de transition
FISH : Hybridation *in situ* par fluorescence
B2m : Bêta-2 microglobuline
SDS : Dodécylsulfate de sodium
ACF : Foyers de cryptes aberrantes
RT : Transcription inverse
QPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
ES : souche embryonnaire
HIV : Virus de l'immunodéficience humaine
BSA : Albumine de sérum bovin
Kac : Lysine acétylée
H3K9 : Lysine 9 de l'histone H3
H3K9me : Méthylation de la lysine 9 de l'histone H3
H3K9me3 : tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3
H4K12ac : Acétylation de la lysine 12 de l'histone H4
H3K9ac : Acétylation de la lysine 9 de l'histone H3
H4K16ac : Acétylation de la lysine 16 de l'histone H4
H4K20me3 : Triméthylation de la lysine 20 de l'histone H4
H3K56ac : Acétylation de la lysine 56 de la l'histone H3
H3K27me3 : Triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K4me3 : Triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3
H3K4ac : Acétylation de la lysine 4 de l'histone H3
H4R12 : Histone H4 dont la lysine 12 est mutée en arginine
H4K8ac : Acétylation de la lysine 8 de l'histone H4
H4K5ac : Acétylation de la lysine 5 de l'histone H4

Sommaire

Introduction

La Chromatine

A LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE	16
B LA DYNAMIQUE DE LA CHROMATINE.....	18
• 1 LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES D’HISTONES.....	18
a <i>Présentation générale</i>	18
b <i>L’acétylation des histones</i>	22
- 1 <i>Mécanisme</i>	22
- 2 <i>Décompaction de la chromatine</i>	22
- 3 <i>Plateforme de recrutement</i>	23
- 4 <i>Activation de la transcription</i>	24
- 5 <i>HATs et HDACs</i>	24
c <i>La méthylation des histones</i>	25
- 1 <i>Mécanisme</i>	25
- 2 <i>Méthyltransférases et déméthylases</i>	25
- 3 <i>Méthylation des histones et transcription</i>	26
• 2 LA METHYLATION DE L’ADN.....	26
a <i>Les enzymes</i>	26
b <i>Méthylation de l’ADN et transcription</i>	27
• 3 LES COMPLEXES DE REMODELAGE ATP DEPENDANTS.....	27

L’hétérochromatine

A EUCHROMATINE ET HETEROCHROMATINE	30
B HDACS ET HETEROCHROMATINE	30
C HETEROCHROMATINE FACULTATIVE / CONSTITUTIVE	32
• 1 HETEROCHROMATINE FACULTATIVE	34
• 2 HETEROCHROMATINE CONSTITUTIVE.....	34
a <i>Séquences répétées en tandem</i>	34
b <i>Séquences répétées dispersées</i>	36
- 1 <i>Séquences LINEs</i>	36

L’hétérochromatine péricentromérique

A LA GENOMIQUE DES PERICENTROMERES.....	38
• 1 EVOLUTION.....	38

• 2 LES SEQUENCES.....	40
• 3 ORGANISATION SPATIALE.....	40
B LE « SQUELETTE MOLECULAIRE » : SUV39H-H3K9ME3-HP1.....	42
• 1 LES SUPPESSEURS DE VARIATION	42
• 2 LES METHYLTRANSFERASES SUV39H	44
• 3 LES PROTEINES HP1	46
C L'HETEROCHROMATINE PERICENTROMERIQUE : <i>S.POMBE</i> VS MAMMIFERES	48
• 1 L'HETEROCHROMATINE DES PERICENTROMERES CHEZ <i>S.POMBE</i>	48
<i>a</i> L'ARN interférence (RNAi).....	48
<i>b</i> Mécanisme de compaction.....	50
• 2 L'HETEROCHROMATINE DES PERICENTROMERES CHEZ LES MAMMIFERES.....	52
<i>a</i> Particularités	52
<i>b</i> Implication d'une composante ARN	52
- 1 Implication du RNAi	52
- 2 ARN et recrutement de HP1.....	54
- 3 Développement et formation « de novo » des péricentromères.....	56
- 4 Régulation des ARNs et fonctions physiologiques	56
- 5 Régulation commune entre péricentromères et séquences LINEs.....	60
D LES PERICENTROMERES ET LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES	62
• 1 LA MITOSE	62
• 2 ROLE DES PERICENTROMERES.....	64

Acétylation d'histone et hétérochromatine

A L'ACETYLATION D'H3K4 ET PERICENTROMERES	66
B L'ACETYLATION D'H4K12 ET PLASTICITE DE L'HETEROCHROMATINE.....	68
• 1 L'ACETYLATION D'H4K12.....	68
• 2 H4K12AC ET HETEROCHROMATINE	68
C COMPACTION ET PROTEINES A DOUBLE BROMODOMAINES.....	70
• 1 LES PROTEINES BETS	70
• 2 MODULATION DE LA COMPACTION DE LA CHROMATINE PAR LES PROTEINES BETS	72
<i>a</i> BRDT dans la spermatogenèse	72
<i>b</i> BRD2/4 dans la compaction de la chromatine	73

TIP60 et hétérochromatine

A ESA1/MST1/TIP60 ET HETEROCHROMATINE	76
B L'ACETYLTRANSFERASE TIP60.....	78
• 1 STRUCTURE ET ACTIVITEE.....	78
• 2 LE COMPLEXE TIP60.....	78
• 3 FONCTIONS ET INSTABILITE GENETIQUE.....	79

• 4 IMPLICATION DANS LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE.....	79
- 1 <i>Activation de la transcription</i>	79
- 2 <i>Répression de la transcription</i>	80

Conclusion et objectifs de la thèse.....82

Résultats

Partie 1: TIP60 dans la compaction de l'hétérochromatine péricentromérique dans les cellules SUV39H ½ -/-

A INTRODUCTION	86
B PUBLICATION.....	87
C RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	89
• 1 RECRUTEMENT DE TIP60 ET MECANISME	89
• 2 VOIE TIP60-H4K12AC ET CANCERS	95
• 3 IMPACT DU RECRUTEMENT DE TIP60 : HYPOTHESE DE TITRATION.....	97
• 4 FRONTIERE DE L'HETEROCHROMATINE.....	99

Partie 2: Antagonisme de TIP60/P400 dans la régulation de la carcinogénèse colorectale

A INTRODUCTION	100
• 1 TIP60 EST UN SUPPESSEUR DE TUMEUR DANS LE CADRE DU CANCER COLORECTAL.....	100
• 2 ANTAGONISME TIP60/P400	101
B PUBLICATION.....	101

Discussion

A INTRODUCTION	104
B MECANISTIQUE DE LA VOIE TIP60-H4K12AC.....	105
• 1 MECANISME DE COMPACTION	105
• 2 RECRUTEMENT DE TIP60 DANS L'HETEROCHROMATINE	107
C RELEVANCE PHYSIOLOGIQUE DU MODELE SUV39H ½ -/-.....	108
• 1 LA VOIE TIP60-H4K12AC AU COURS DU DEVELOPPEMENT PRECOCE.....	108
• 2 LA VOIE TIP60-H4K12AC DANS LES CELLULES NORMALES	109
a <i>Au cours de la phase S</i>	109
b <i>Frontières de l'hétérochromatine péricentromérique</i>	110

• 3 LA VOIE TIP60-H4K12AC AU COURS DE LA SENESCENCE	111
• 4 LA VOIE TIP60-H4K12AC DANS LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE	111
C IMPLICATIONS PHYSIO-PATHOLOGIQUES	113
• 1 LA VOIE TIP60-H4K12AC DANS LES CANCERS	113
• 2 TIP60, PERICENTROMERES, ET VIRUS HIV.....	114
• 3 TIP60, PERICENTROMERES, ET MALADIE D'ALZHEIMER	114
 Conclusion générale.....	 117
 Références.....	 119
 Matériels et Méthodes supplémentaire.....	 133

Liste des figures

<u>Figure 1</u> Schéma de la chromatine	14
<u>Figure 2</u> Représentation du cycle de la cellule	15
<u>Figure 3</u> Représentation cristallographique du nucléosome	15
<u>Figure 4</u> Les divers niveaux de compaction de la chromatine en microscopie électronique.....	17
<u>Figure 5</u> Plan schématisé de la partie dynamique de la chromatine	17
<u>Figure 6</u> Tableau récapitulant diverses modifications post-traductionnelles et leur impact sur la charge du résidu touché.....	20
<u>Figure 7</u> Exemple de modifications possibles sur les extrémités N-terminales des histones, et de leur « cross-talks »	20
<u>Figure 8</u> Mécanisme d'acétylation sur les lysines	21
<u>Figure 9</u> Schéma de l'effet de l'acétylation des histones sur la chromatine.....	21
<u>Figure 10</u> Représentation de l'acétylation de la lysine 64 de l'histone H3 au sein d'un nucléosome, illustrant le concept de modification au niveau de la surface latérale du nucléosome	21
<u>Figure 11</u> Hétérochromatine	29
<u>Figure 12</u> Schéma des deux grands états de la chromatine	29
<u>Figure 13</u> Schéma d'un chromosome de mammifère	33
<u>Figure 14</u> Composition du génome humain	35
<u>Figure 15</u> Cycle du rétro-transposon LINE.....	35
<u>Figure 16</u> Représentation des péricentromères chez différentes espèces.....	39
<u>Figure 17</u> Organisation spatiale des péricentromères et de leurs transcrits chez la souris.....	39
<u>Figure 18</u> Principe de variégation.....	41
<u>Figure 19</u> Représentation schématique du « squelette » de l'hétérochromatine péricentrique, conservé de <i>S.pombe</i> à l'Homme.....	45
<u>Figure 20</u> Structure des protéines HP1.....	45
<u>Figure 21</u> Dynamique de dissociation du complexe H3K9me3 / chromodomaine de HP1, selon les différents paralogues	45
<u>Figure 22</u> Principe simplifié de l'ARN interférence.....	47
<u>Figure 23</u> Mécanisme de formation de l'hétérochromatine péricentromérique chez <i>S.pombe</i>	49
<u>Figure 24</u> Mécanisme de formation de l'hétérochromatine péricentromérique chez la souris.....	51
<u>Figure 25</u> Modèle cellulaire des SUV39H ½ -/-	53

<u>Figure 26</u> Organisation, structure des péricentromères dans les premiers clivages du développement précoce chez la souris	55
<u>Figure 27</u> L'expression des ARNs satellites majeurs au cours du cycle cellulaire chez la souris	58
<u>Figure 28</u> Schéma simplifié d'une mitose.....	61
<u>Figure 29</u> Défauts mitotiques des MEFs SUV39H ½ -/-	63
<u>Figure 30</u> Schéma d'un complexe cohésine et des différents modèles topologiques du mécanisme de cohésion	63
<u>Figure 31</u> Modèle proposé (Ejlassi-Lassalette et al. 2011) du rôle de HAT1 dans l'apport du dimère H3/H4 à la fourche de réplication.	67
<u>Figure 32</u> Modèle proposé par (Zhou et al. 2011), du rôle d'H4K12ac sur le recrutement des complexes Sir dans l'hétérochromatine télomérique de <i>S.cerevisiae</i>	67
<u>Figure 33</u> H4K12ac dans les péricentromères de souris.....	69
<u>Figure 34</u> La famille des protéines BETs chez <i>S.cerevisiae</i> et chez la souris.....	69
<u>Figure 35</u> Modèle de travail de l'échange histones-PTs au cours de la spermatogenèse.....	71
<u>Figure 36</u> Compaction de la chromatine médiée par la protéine BRDT, en contexte d'hyperacétylation	71
<u>Figure 37</u> Structure de la protéine TIP60.....	77
<u>Figure 38</u> Le complexe TIP60 humain est issu de la fusion des complexes Nua4, et SWR1 de la levure <i>S.cerevisiae</i>	77
<u>Figure 39</u> TIP60 et hétérochromatine à travers les espèces	82
<u>Figure 40</u> P400 est impliquée dans la compaction des péricentromères dans les SUV39H ½ -/-	88
<u>Figure 41</u> BRD4 est impliquée dans la compaction des péricentromères dans les SUV39H ½ -/-	88
<u>Figure 42</u> TIP60 est impliquée dans la mise en place de l'acétylation d'H3K4, corrélée à l'activation transcriptionnelle dans les U2OS	90
<u>Figure 43</u> Comparaison des anticorps anti-H3K4ac.....	93
<u>Figure 44</u> Expression du satellite 3 du chromosome 1 lors d'une sénescence induite par un oncogène	96
<u>Figure 45</u> Hypothèse de titration de TIP60 par les péricentromères.....	96
<u>Figure 46</u> Expression de deux gènes à la frontière de l'hétérochromatine péricentrique dans les SUV39H ½ -/-	98
<u>Figure 47</u> Modèle du rôle de TIP60 au cours de la cancérogenèse <i>via</i> son rôle dans les péricentromères.....	112
<u>Figure 48</u> Amplification des ARNs satellites majeurs dans les NIH3T3	136
<u>Figure 49</u> Composition des tampons de ChIP.....	138

INTRODUCTION

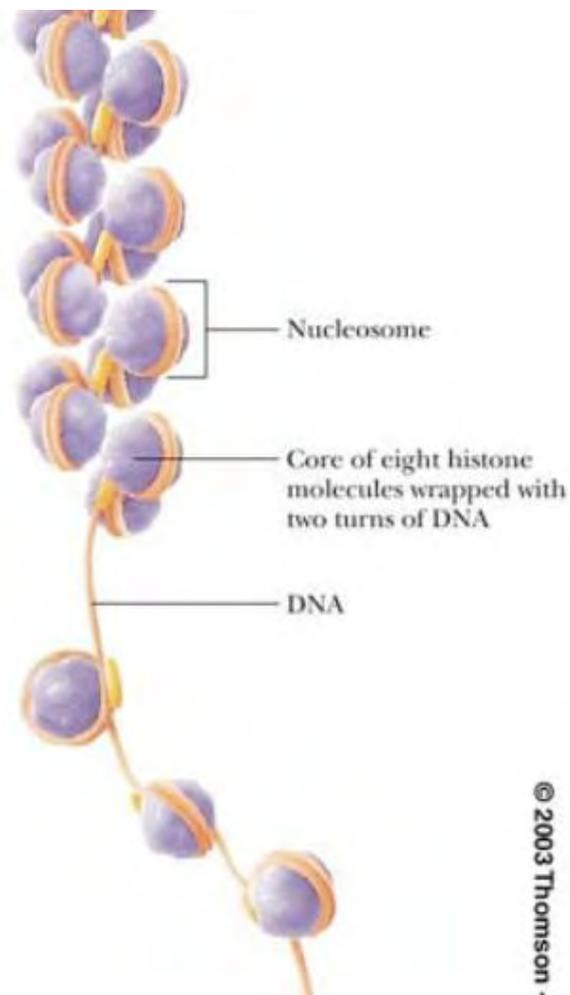
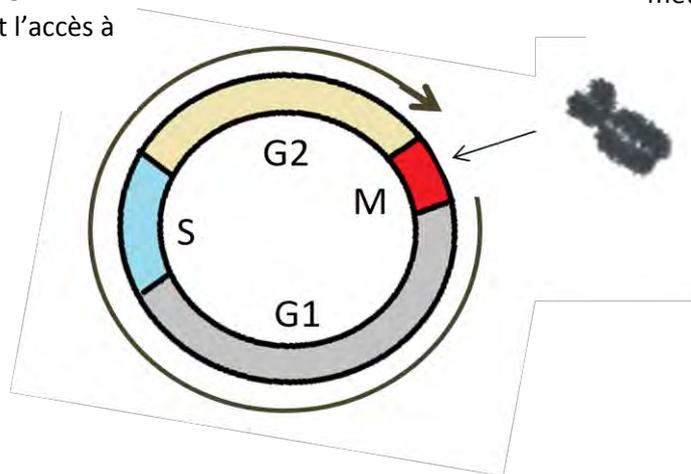
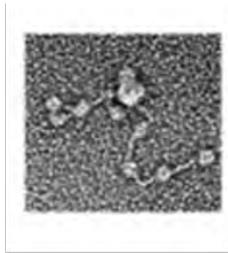


Figure 1 : Schéma de la chromatine. L'ADN s'enroule autour d'octamères de protéines histones, pour former la chromatine.

Interphase, Compaction-
Décompaction locale, régulation
de processus nécessitant l'accès à
l'ADN.



Mitose, Chromosome
métaphasique, compaction
maximale.

Figure 2 : Représentation du cycle de la cellule. La chromatine, ici une fibre de 11nm, avec une compaction locale (microscopie électronique (Trojer and Reinberg 2007)), permet la régulation de différents processus (transcription, épissage, réparation des cassures de l'ADN, etc.....) durant l'interphase. La compaction est maximale (>30nm) au cours de la mitose, dans le chromosome métaphasique.

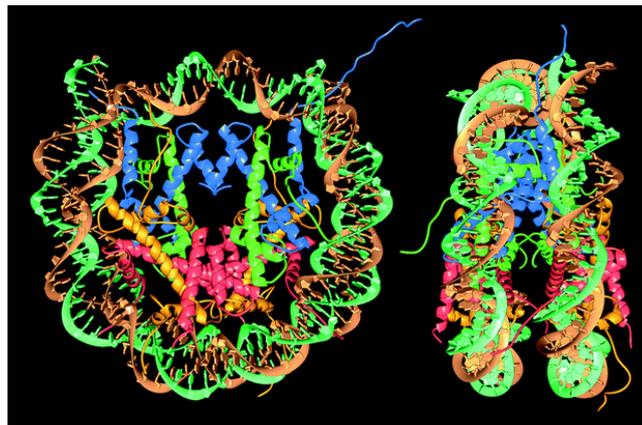


Figure 3 : Représentation cristallographique du nucléosome.

Bleu : H3, Vert : H4, jaune : H2A, rouge : H2B. D'après (Luger et al. 1997).

La chromatine

Au sein des cellules, qu'elles soient procaryotes ou eucaryotes, l'information génétique nécessaire à la production des protéines est portée par la molécule d'ADN (Acide DesoxyriboNucléique).

Avec les cellules eucaryotes apparaît une organisation spatiale particulière de l'ADN, par son association avec des protéines, les histones. Cette association « ADN-histones » forme une structure nucléo-protéique, la chromatine (Fig1).

La chromatine permet la compaction de l'ADN à l'intérieur du noyau de la cellule. A son niveau maximal de compaction, la chromatine permet la structuration des chromosomes, déterminante pour le bon déroulement du processus de division cellulaire, la mitose (Fig 2). La structure chromatinienne est donc déterminante pour le contrôle de la prolifération cellulaire et la stabilité génétique des cellules.

En plus de ce rôle structurant, la chromatine peut, localement sur le génome, par son dynamisme de compaction-décompaction, réguler l'accès à l'ADN et donc l'ensemble des processus nécessitant cet accès (transcription, épissage, réplication, réparation des cassures etc...). Elle gère également, notamment via les modifications ayant lieu sur les histones et sur l'ADN lui-même, le recrutement des protéines nécessaires à ces processus.

A la structure de la chromatine

Les histones sont des petites protéines, d'une dizaine de KiloDaltons (Kd), riches en acides aminés basiques et donc chargées positivement. Ceci leur permet une interaction étroite avec l'ADN, lui-même chargé négativement au niveau des phosphates. Autour d'un octamère d'histones viennent s'enrouler 146 paires de bases d'ADN, formant l'unité de base de la chromatine : le nucléosome. Deux dimères identiques formés des histones H3-H4 viennent former un tétramère, qui se retrouve encadré par deux autres dimères identiques H2A-H2B. La structure à haute résolution obtenue en cristallographie en 1997 (Fig 3) met en évidence, en plus du domaine globulaire de chaque histone, une partie N-terminale qui s'échappe à l'extérieur du nucléosome, laissant accessible de 15 à 38 acides aminés non structurés, qui peuvent subir des modifications post-traductionnelles impactant la structure de la chromatine (Luger et al. 1997).

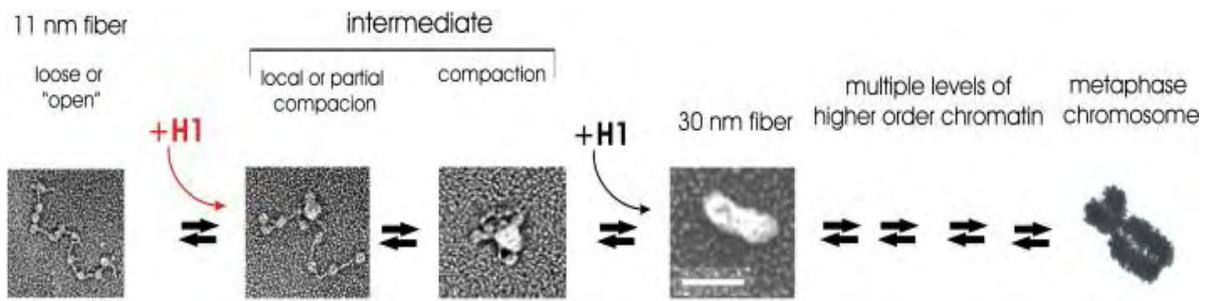


Figure 4 : Les divers niveaux de compaction de la chromatine en microscopie électronique.

Modifié d'après (Trojer and Reinberg 2007)

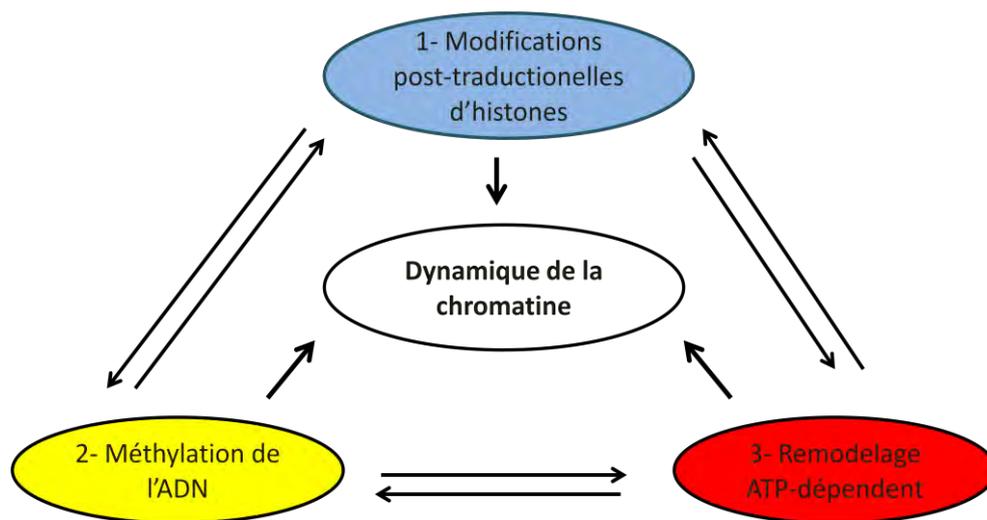


Figure 5 : Plan schématisé de la partie dynamique de la chromatine. La dynamique de la chromatine est influencée par 3 mécanismes, eux-même interconnectés.

L'enchaînement des nucléosomes constitue alors une fibre de chromatine, qui peut être ou non complétée par la présence d'une histone de plus grande taille (21Kd) l'histone H1 (Trojer and Reinberg 2007). La fibre de chromatine, de 11nm, peut alors se compacter jusqu'à une fibre de 30nm, qui va elle-même connaître des niveaux de compaction supérieurs, atteignant son maximum de compaction dans le chromosome métaphasique (Fig 4)

B la dynamique de la chromatine

Je présenterai ici les 3 grands mécanismes responsables de la dynamique de la chromatine : les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN, et le remodelage ATP-dépendant. Nous verrons au fur et à mesure du manuscrit, la forte interconnexion entre ces différents mécanismes, permettant la régulation de cette dynamique chromatinienne (Fig 5).

- **1 les modifications post-traductionnelles d'histones**

- a Présentation générale

Les histones peuvent subir différentes modifications post-traductionnelles, majoritairement dans la partie N-terminale sortant du nucléosome, mais aussi à l'intérieur de ce dernier, dans le domaine globulaire. Ces modifications chimiques, catalysées par des enzymes spécifiques, sont de différentes natures, et touchent différents résidus (Fig 6/7). Les résidus modifiés créent des sites de recrutement pour des domaines protéiques, et certaines modifications entraînent un changement de charge altérant l'interaction histone-ADN, impactant la compaction de la chromatine (Bannister and Kouzarides 2011). C'est par ces deux processus, altération de la charge et création de site de recrutement, que les modifications post-traductionnelles interviennent dans les différents processus faisant intervenir la molécule d'ADN. De plus, il est intéressant de noter qu'une modification d'histone peut agir simplement en empêchant la possibilité d'une autre modification sur le même résidu. C'est par exemple le cas de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) qui peut être soit méthylée, soit acétylée (Rea et al. 2000). Une modification peut également influencer sur la mise en place d'une autre marque sur un autre résidu, phénomène de « cross-talks » (Fig 7). Par exemple, sur des essais *in vitro*, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10P) empêche la méthylation sur la lysine 9 de cette même histone (H3K9me3) (Rea et al. 2000),(Duan et al. 2008). Le génome est couvert de ces modifications d'histones, et Il est suggéré en 2001 dans le « code des histones », que c'est la combinaison de ces modifications qui décidera localement de l'issue de tout processus ADN-dépendant d'une région génomique (Jenuwein and Allis 2001). Bien que ces modifications aient

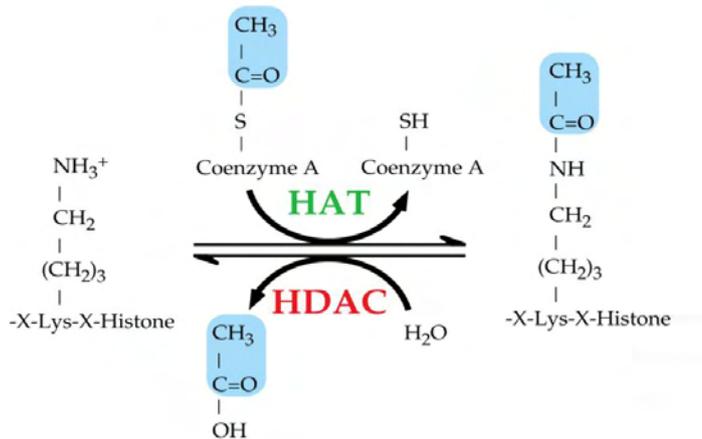


Figure 8 : Mécanisme d'acétylation sur les lysines. D'après (Kuo and Allis 1998)

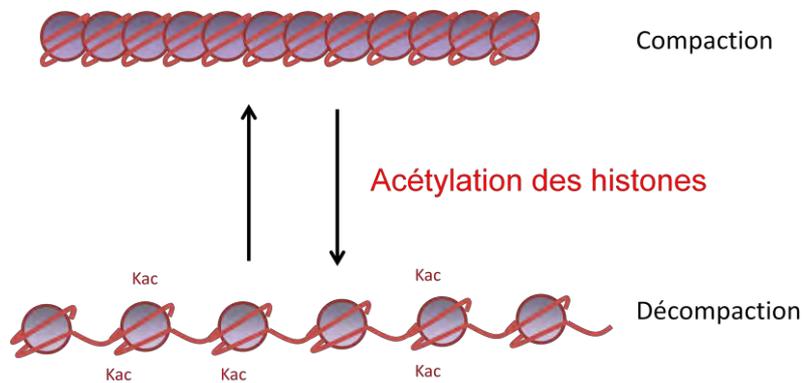


Figure 9 : Schéma de l'effet de l'acétylation des histones sur la chromatine. Kac : Lysine acétylée

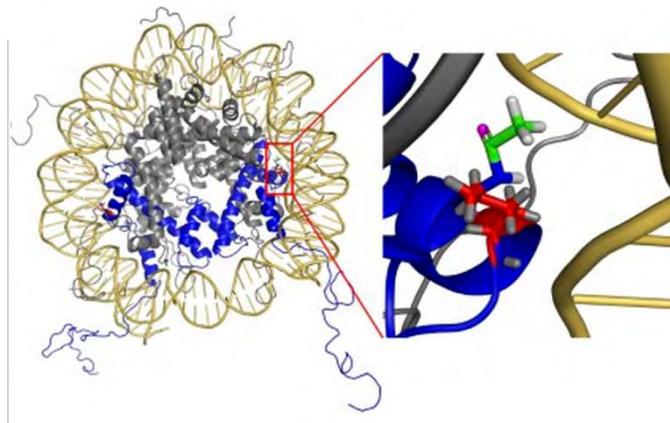


Figure 10 : Représentation de l'acétylation de la lysine 64 de l'histone H3 au sein d'un nucléosome, illustrant le concept de modification au niveau de la surface latérale du nucléosome. Alors qu'on distingue sur cette image les extrémités N-terminales sortantes des histones, H3K64ac se situe sur la surface latérale du nucléosome. Bleu : dimère d'H3. D'après (Di Cerbo et al. 2014)

principalement lieu sur les histones déjà incorporées dans la chromatine, certaines ont lieu sur les histones libres dans le cytoplasme. La plupart de ces modifications peuvent être effacées, parfois de façon extrêmement dynamique, si participant à des processus rapides, tels que l'activation d'un gène face à un stress.

Les modifications d'histones soient nombreuses (Fig6), et de nouvelles modifications ont été récemment découvertes (Tan et al. 2011),(Dai et al. 2014). Pour Le besoin de cette thèse, je décrirai uniquement les mécanismes d'acétylation et de méthylation des histones, en m'attardant plus largement sur l'acétylation.

b L'acétylation des histones

- 1 Mécanisme

Décrite dès 1964 (Allfrey et al. 1964), cette modification consiste en l'ajout sur une lysine, d'un groupement acétyl en provenance d'un acétylCoA, catalysé par des enzymes spécifiques, les HATs (Histones AcétylTransférases) ou KATs (Lysines Acétyltransférases), et réversible par une deuxième classe d'enzymes, les HDACs (HistonesDéAcétylases) (Fig8).

- 2 Décompaction de la chromatine

La lysine est un résidu chargé positivement, et son acétylation neutralise cette charge (Fig 8). L'acétylation des histones a donc pour impact d'affaiblir la liaison entre les histones et les charges négatives des phosphates de l'ADN, et de décompacter la chromatine (Fig 8/9). En 1994, une région d'hyper-acétylation est mise en évidence sur le locus de la β -globine de poulet, et coïncide avec une hypersensitivité à la DNase, c'est-à-dire à une zone décompactée, mettant en corrélation l'acétylation des histones et la décompaction de la chromatine (Hebbes et al. 1994). En 2006, il est montré que l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (H4K16ac) provoque *in vitro* la décompaction de la fibre de 30 nm (Shogren-Knaak et al. 2006). Bien que les auteurs de cette étude n'aient pas testé d'autres résidus, cette marque est considérée comme la plus associée à la décompaction, notamment car on la retrouve hyper-enrichie sur le chromosome X mâle de la drosophile, qui est hyper-décompacté et hyper-transcrit (Deng et al. 2013).

En plus des sites d'acétylation des extrémités N-terminales, différents sites d'acétylation ont été identifiés ces dernières années dans les domaines globulaires des histones, participant à faire évoluer la vision qui assignait le domaine globulaire des histones à une fonction de structuration alors que la partie N-terminale était dédiée à la signalisation (Tropberger and Schneider 2013). Ainsi, sur l'histone H3 où plusieurs acétylations ont été récemment découvertes dans le domaine globulaire, les

sites acétylables ne sont pas distribués de manière aléatoire au sein de ce domaine. Ils se trouvent concentrés sur la surface latérale, c'est-à-dire sur la région en contact proche avec l'ADN, et affaiblissent ainsi l'interaction histone-ADN (Fig 10).

Finalement, l'effet du changement de charge provoqué par l'acétylation n'affecte pas uniquement l'interaction ADN-histones. Luger et al, en 1997, proposent qu'H4K16ac affecte l'interaction entre les dimères H2A-H2B de deux nucléosomes adjacents, décompactant la chromatine (Luger et al. 1997). On peut également citer l'acétylation d'H4K91 qui est mise en place dans le cytoplasme, et se trouve à l'interface entre le tétramère H3/H4 et les dimères H2A/H2B, et qui affecterait l'assemblage du nucléosome (Ye et al. 2005).

- 3 Plateforme de recrutement

La lysine acétylée constitue un site de recrutement pour les protéines, au nombre de 46 chez l'homme, comprenant un ou plusieurs bromodomaines. Ces domaines se retrouvent dans des complexes d'enzyme de remodelage de la chromatine, des régulateurs transcriptionnels, ou chez des HATs elles-mêmes (par exemple P300 ou Gcn5) (Filippakopoulos et al. 2012). On trouve également un double bromodomaine dans la protéine TAF1 (TBP-associated factor 1), une sous-unité du complexe TFIID, qui intervient dans l'assemblage de la machinerie de transcription de la RNA polII, liant l'acétylation à l'initiation de la transcription (Jacobson et al. 2000). Des tests de liaison *in vitro* de protéines à bromodomaine, sur des puces de peptides de fragments des différentes histones avec diverses combinaisons d'acétylations, de méthylations et de phosphorylations, révèlent dans la liaison spécifique de ces bromodomaines, l'importance des combinaisons de modifications, plutôt que la reconnaissance d'une seule acétylation (Filippakopoulos et al. 2012). Ces dernières années ont été identifiées deux protéines contenant chacune un domaine « bromodomaine-like », qui diffèrent des bromodomaines canoniques, mais sont néanmoins capables de lier des lysines acétylés (Wang et al. 2015),(Qian et al. 2013). L'une de ces protéines (PA200) se trouve être une sous-unité dans des complexes protéasomes. Cette étude confère un nouveau rôle à l'acétylation des histones qui est d'agir comme signalisation pour la dégradation des histones de manière indépendante de l'ubiquitination (Qian et al. 2013). En 2010, la protéine DPB3b, une protéine à domaine PHD, domaine plutôt connu pour se lier aux lysines méthylées, a également été identifiée comme capable de reconnaître l'acétylation de la lysine 14 de l'histone H3, élargissant le champ des « readers » des lysines acétylées au-delà du champ des protéines à bromodomaines (Zeng et al. 2010)

- 4 Activation de la transcription

La décompaction de la chromatine, en permettant l'accès à l'ADN, correspond à un état permissif à l'activation de processus tels que la transcription, liant implicitement l'acétylation des histones à l'activation de la transcription. En 1991, une étude dans la levure montre que la mutation des résidus acétylés de l'histone H4 (les lysines 5, 8, 12 et 16), provoque la diminution de la transcription d'un gène rapporteur (Durrin et al. 1991). C'est en fait de nombreuses études qui ont confirmé de manières diverses, l'importance de l'acétylation des histones, et des HATs dans la transcription. L'apparition de l'analyse à grande échelle, par immunoprécipitation de chromatine couplée à du séquençage (ChIP-seq), a permis en 2008, d'étudier dans des cellules humaines, la corrélation entre la présence de différentes modifications d'histones au niveau des promoteurs et l'état transcriptionnel des gènes (Wang et al. 2008), corrélant largement les acétylations d'histones à l'activation transcriptionnelle. De plus ces données démontrent une nouvelle fois la complexité résidu-spécifique puisque différentes acétylations sont réparties sur différentes parties des gènes. Par exemple la lysine 12 de l'histone H4 (H4K12ac) se trouve plutôt enrichie au niveau du promoteur mais également sur le corps du gène transcrit, alors que l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9ac) se trouve spécifiquement enrichie sur les promoteurs de ces gènes (Wang et al. 2008). Un an après, en 2009, une autre étude en ChIP-seq du même groupe, cette-fois ci portant sur les HATs et les HDACs, renforce ce lien entre acétylation et transcription (Wang et al. 2009).

- 5 HATs et HDACs

Il existe deux classes de HATs : les HATs de type A et de type B (Parthun 2011). Les HATs de type B sont majoritairement cytoplasmiques, bien que des données récentes suggèrent leur présence et fonctions dans le noyau de la cellule. Elles acétylent ainsi les histones libres nouvellement synthétisées. Les HATs de type A, sont quand à elles nucléaires et acétylent des histones déjà incorporées. Chez les mammifères, Les HATS de type A sont divisées en 3 classes principales, la famille Gcn5/PCAF, les MYSTs, et la famille P300/CBP, basées sur leur homologie avec les HATs trouvées chez la levure à bourgeon *S.cerevisiae*. Toutes ces HATS ont des spécificités de résidus, de répartition sur le génome, et sont impliquées dans différents processus cellulaires.

Les HDACS sont réparties en 4 classes : I, II, III et IV, là aussi basées sur leur conservation avec la levure ; la classe trois étant la seule à utiliser du NAD⁺ comme cofacteur, au lieu du Zn²⁺ pour les autres classes. On peut donc inhiber, à visée médicale ou pour étude, ces deux catégories de HDACs de manière indépendante via différents inhibiteurs (les mieux caractérisés étant la TSA ou le SAHA pour la classe I et II, et le nicotinamide pour la classe III). En effet, les HDACS sont actuellement des cibles thérapeutiques pour le traitement de certains cancers (Eot-Houllier et al. 2009).

Chimiquement, l'acétylation est un cas particulier d'acylation, et diverses acylations d'histones, encore moins connues ont été découvertes ces dernières années, et sont des substrats pour les HDACs (Rousseaux and Khochbin 2015). Or, deux cas d'acylations, la propionylation et la butyrylation, sont mises en place sur des lysines par les acétyltransférases P300 et CREB-binding protein (Chen et al. 2007). Le fait que des HATs/HDACs puissent mettre en place et éliminer d'autres modifications que l'acétylation, et ce sur des lysines, entraîne une compétition entre ces différentes marques, et fait apercevoir un nouveau niveau de complexité de la spécificité des HATs/HDACs. Finalement, il ne faut pas oublier que la plupart de ces HATs et HDACs, ciblent également des protéines non-histones, jouant en fait sur un « acétylome » cellulaire conséquent (Choudhary et al. 2009).

c la méthylation des histones

- 1 Mécanisme

La méthylation des histones a lieu sur les lysines, les arginines, ou dans un seul cas connu sur un résidu glutamine, et consiste en l'ajout d'un groupement méthyle en provenance d'un S- adénosylméthionine. Contrairement à l'acétylation, elle ne modifie pas la charge des histones. Elle agit donc uniquement comme plateforme de recrutement (les lysines méthylées recrutant des protéines possédant des domaines TUDOR, WD40, PHD, MBT, PWWD et chromodomaines, et les arginines méthylées des domaines TUDOR) ou en empêchant une autre modification du même résidu. Elle peut également empêcher une autre modification sur un résidu adjacent : phénomène de « cross-talk ». Ce phénomène est bien illustré par le cas de la méthylation des lysines 4 et 9 de l'histone H3 qui sont mutuellement exclusives (Nishioka et al. 2002). Comme précédemment mentionné pour le recrutement des bromodomaines sur les lysines acétylées, le recrutement d'une protéine semble dépendre d'une combinaison de modifications et non d'un seul résidu, et la présence d'une méthylation pourrait empêcher ou favoriser le recrutement d'une autre enzyme de modification sur un résidu adjacent. Néanmoins, les mécanismes qui expliquent ces « cross-talks » sont encore à l'étude (Verrier et al. 2011).

- 2 Méthyltransférases et déméthylases

La méthylation des lysines est mise en place par des KMT (Lysine Méthyltransférases) et réversée par des KDM (Lysine Déméthylases). Une même lysine peut être mono, di, ou tri méthylée, et les KMT et KDM sont spécifiques non seulement du résidu, mais également du niveau de méthylation de ce dernier. Par exemple l'enzyme SUV39H1 va catalyser l'ajout de deux groupements méthyle sur la lysine 9 de l'histone H3 déjà monométhylée (H3K9me), pour la transformer en H3K9me3 (Peters et al. 2003). Une arginine peut être mono ou di-méthylée, la di-méthylation pouvant être a- ou -

disymétrique, par une PRMT (Protein Arginine N-méthyltransférase), puis déméthylée ou transformée en citruline par une enzyme PAD.

- 3 Méthylation des histones et transcription

La cas de la méthylation d'H3K4/K9 illustre le rôle résidu-dépendant des méthylations des lysines dans la régulation de la transcription puisque, quand présentes sur un promoteur, ces méthylations sont associées à l'activation de la transcription pour la triméthylation de K4, et à la répression pour la triméthylation de K9 (Verrier et al. 2011). La rôle de la méthylation des arginines dépend elle aussi du résidu modifié (Litt M 2009). Quand à la méthylation de la glutamine, il n'existe qu'un résidu connu sur l'histone H2A, associé à la régulation de la transcription d'un ARNr de manière encore discutée (Leonhardt and Hake 2014).

• **2 La méthylation de l'ADN**

La méthylation a lieu sur le carbone 5 des cytosines. Cette méthylation a lieu au niveau des dinucléotides Cytosine-Guanine (CpG).

a les enzymes

Les enzymes responsables de cette méthylation sont les DNMT (DNA Méthyl-Transférases). Les DNMT3A et DNMT3B sont à elles deux (leur fonctions n'étant pas totalement redondantes (Okano et al. 1999) responsables de la méthylation « *de novo* ». En effet, elles mettent en place le patron de méthylation en fonction du type cellulaire au cours de l'embryogenèse. La méthylation de l'ADN est indispensable lors du développement de la souris, et affecter de manière drastique sa mise en place est létal (Li et al. 1992). L'enzyme DNMT3L interagit avec DNMT3 a et b, pour augmenter leur activité. DNMT1, quant à elle, est la DNMT « de maintenance », qui maintient le patron de méthylation mis en place par les DNMT3, en ciblant l'ADN hémi-méthylé au moment de la réplication du génome. Il existe également une DNMT2, mais qui semble avoir peu d'activité catalytique, et sa délétion dans des cellules ES ne cause aucun effet sur le taux de méthylation global (Klose and Bird 2006). Les trois autres modifications de l'ADN, l'hydroxyméthylation (5hmC), la formylation (5fC) et la carboxylation (5caC), sont en fait le résultat d'une métabolisation d'une cytosine méthylée (5mC), par des enzymes TETs, par hydroxylation de la 5mC en 5hmC, puis par l'oxydation de la 5hmC en 5fC et 5caC. Ces modifications semblent avoir des implications propres dans la régulation transcriptionnelle, et des mutations et translocations impliquant les gènes codant pour les TETs ont été associées à certaines pathologies hématologiques (Dawson and Kouzarides 2012). Ces modifications représentent le principal mécanisme de déméthylation actif de l'ADN. Une déméthylation passive peut avoir lieu par

dilution lors de la réplication semi-conservative de l'ADN, lors de l'absence, ou de l'inhibition (par une drogue comme la 5azacytidine par exemple) de la DNMT de maintenance DNMT1.

b Méthylation de l'ADN et transcription

Les régions du génome riches en GC constituent des cibles particulières appelées îlots CpG. Ces îlots couvrent environ 65% des régions promotrices des gènes dans les cellules humaines, et la méthylation de ces promoteurs est corrélée à la répression de la transcription, alors que les promoteurs non méthylés sont généralement associés à des gènes transcriptionnellement actifs. Dans de nombreux cancers est observée une méthylation anormale de 5-10% de promoteurs normalement non méthylés, affectant ainsi l'expression des ARNm, mais aussi de nombreux ARN non codants. Des inhibiteurs de DNMT (par exemple la 5-azacytidine), sont actuellement utilisés en clinique dans les traitements de certains cancers (Dawson and Kouzarides 2012). Au-delà des gènes, la méthylation de l'ADN est en fait principalement présente au niveau des séquences répétées du génome, qui correspondent à de la chromatine condensée et inactive transcriptionnellement (décrites de manière extensive plus tard dans ce manuscrit), et est notamment impliquée dans la répression des transposons. La méthylation de l'ADN est donc clairement associée à la répression transcriptionnelle. Premièrement, la méthylation de l'ADN pourrait empêcher le recrutement de certains facteurs d'activation de la transcription sur l'ADN. Deuxièmement, les CpG méthylés sont reconnus par des protéines MBD (Méthyl-CpG binding domain), qui elles-mêmes recrutent des enzymes de modifications de la chromatine. De plus, les DNMT3, en plus de leur rôle catalytique de méthylation, interagissent avec des histones méthyltransférases et des HDACs, permettant leur ciblage sur les zones d'ADN méthylé (Klose and Bird 2006). Cependant, on retrouve également un haut niveau de méthylation de l'ADN dans le corps de certains gènes activement transcrits, venant apporter un nouveau niveau de complexité, par la distribution spatiale de cette méthylation (Dawson and Kouzarides 2012).

- **3 Les complexes de remodelage ATP-dépendant**

Les complexes ATP-dépendant peuvent, grâce à leur activité ATPase, déplacer les nucléosomes (par relâchement, glissement ou éjection de ces derniers), et ainsi moduler l'accès à l'ADN. Les ATPases de ces complexes sont classées en 4 classes basées sur leur structure. On note qu'elles possèdent des domaines tels que bromodomaine ou chromodomaine pouvant lier respectivement lysines acétylées ou méthylées, appuyant l'interconnexion entre tous ces mécanismes de dynamique de la chromatine. En 2004, Cosgrove et al proposent que les enzymes de remodelage ATP-dépendant fonctionnent en coopération avec les modifications post-traductionnelles d'histones sur la surface latérale du nucléosome. Dans ce modèle, les enzymes de remodelage utilisent l'énergie de

l'hydrolyse de l'ATP pour exposer les sites modifiables de la surface latérale du nucléosome, normalement « cachés » par la conformation de l'ADN. Les modifications qui ont alors lieu, telles que H3K56ac ou H3K122ac, affectent l'interaction histone-ADN, et permettent le glissement du nucléosome (Cosgrove et al. 2004). Ces complexes de remodelage peuvent également, en coordination avec des protéines chaperons, permettre l'échange des histones H1, H2A, H2B, H3 et H4, qui sont les histones dits « canoniques » avec des « variants » de ces histones. Alors que les histones canoniques sont produites et incorporées pendant la phase de réplication de l'ADN (phase S), les variants d'histones peuvent l'être à d'autres phases du cycle cellulaire. Les variants d'histones peuvent différer de leur histone canonique de manière importante comme c'est le cas pour macroH2A, qui a une taille trois fois supérieure à celle d'H2A ; ou en être très proche, comme H3.3, qui ne varie d'H3 (H3.1) que par 5 acides aminés. Ces variants d'histones sont impliqués dans des processus cellulaires variés, tels que la régulation de la transcription, ou encore la réparation des dommages de l'ADN. Dans cette thèse je m'intéresserai particulièrement au variant d'histone H2Az, pour son implication dans l'instabilité génétique. En effet, H2Az, qui diffère d'H2A par sa partie C-terminale, est présent au niveau des péricentromères (Boyarchuk et al. 2014), et la diminution de son expression dans des cellules de mammifères provoque une anomalie de ségrégation des chromosomes lors de la mitose (Rangasamy et al. 2004).

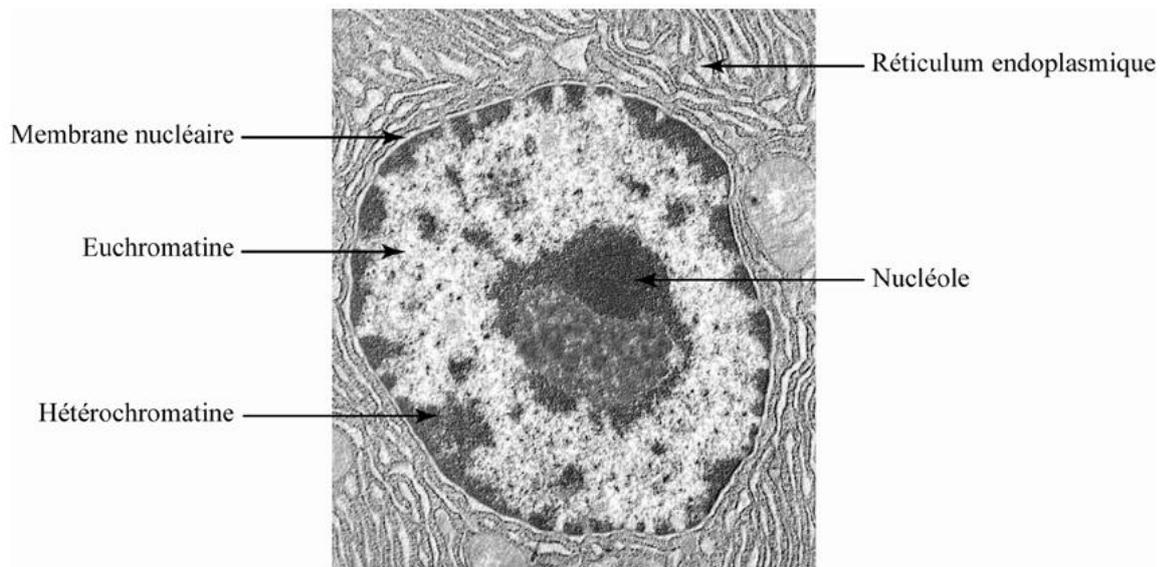


Figure 11 : Hétérochromatine. Dans un noyau en interphase vu en microscopie électronique, on distingue l'euchromatine (claire, décondensée, active transcriptionnellement) de l'hétérochromatine (sombre, condensée, inactive transcriptionnellement).

(tiré de <http://academics.hamilton.edu/biology/kbart/image/nucleus.jpg>).

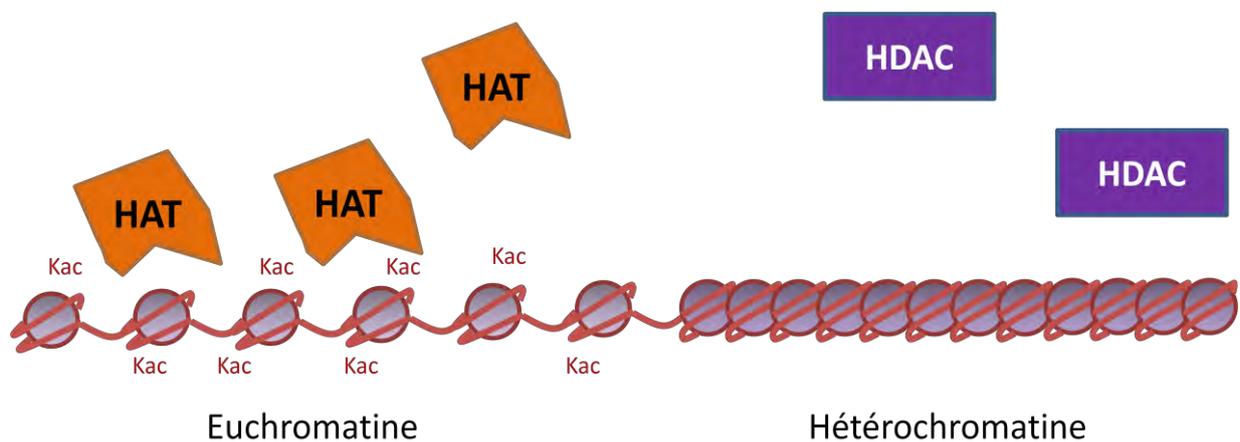


Figure 12 : Schéma des deux grands états de la chromatine. L'euchromatine est décompactée, et les histones sont acétylées sur les lysines (Kac) par des Histones Acétyltransférases (HAT). L'hétérochromatine est compactée et riche en Histone DéAcétylases (HDACs).

L'hétérochromatine

A **Euchromatine et hétérochromatine**

La chromatine atteint son niveau de condensation maximale en mitose, et se décondense en partie pendant le reste du cycle cellulaire, l'interphase (Fig 2), où de nombreux processus ont lieu, qui nécessitent une régulation fine de l'accès à l'ADN. En 1928, le botaniste allemand Emil Heitz observe que certaines régions chromosomiques ne subissent pas cette décondensation post-mitotique, et sont visibles comme des régions denses en microscopie dans le noyau de la cellule (Fig 11). Il nomme cet état l'hétérochromatine, qui correspond à un état inactif transcriptionnellement, condensé, où l'ADN est peu accessible. Il l'oppose à l'euchromatine, qui est décondensée et accessible pendant l'interphase. Ces deux états se confirment lors de digestions à la nucléase, révélant le caractère inaccessible des séquences hétérochromatiniennes. Dans les années 1960, plusieurs études montrent l'absence de transcription dans ces régions compactées. On considère alors l'hétérochromatine comme du « garbage DNA » (déchet génomique), soit de l'ADN inutile, à l'époque où toutes les attentions se focalisent sur les gènes dont les transcrits codent pour des protéines. Cette vision a beaucoup évolué, puisqu'on sait aujourd'hui que seulement 2% environ du génome humain contient des gènes codant pour des protéines, 98% du génome étant donc non-codant, mais pas pour autant non-transcrit. La découverte de nombreux ARN non-codants et de leur fonctionnalité témoigne de l'importance de cet ADN non codant. Une distinction principale entre hétérochromatine et euchromatine est le niveau d'acétylation des histones, hyperacétylées dans l'euchromatine (puisque chromatine décondensée) et hypoacétylées dans l'hétérochromatine (puisque chromatine compactée) (Fig 12). L'hétérochromatine, qui sera la structure qui nous intéresse dans ce manuscrit se caractérise donc par sa richesse en HDACs, maintenant le niveau d'acétylation des histones au minimum.

B **HDACS et hétérochromatine**

L'hétérochromatine est caractérisée par un taux d'échange des histones lent, permettant une stabilisation de la structure, alors que l'euchromatine est caractérisée par un taux d'échange rapide. Chez la levure à fission *S.pombe*, l'HDAC Clr3 participe à la suppression des échanges d'H3 au niveau de l'hétérochromatine, et il est proposé un modèle dans lequel les HDACS, en plus de maintenir le

taux d'acétylation des histones au plus bas, participeraient de manière générale au maintien de l'hétérochromatine en limitant ce taux d'échange des histones (Aygün et al. 2013). La levure à bourgeon *S.cerevisiae* représente un paradigme du rôle des HDACs dans l'hétérochromatine. Elle y est médiée par le complexe des protéines Sir, composé des HDACs Sir2, Sir3 et Sir4, qui recouvre l'intégralité de l'hétérochromatine. En effet, la frontière entre télomère et euchromatine adjacente est dépendante de l'équilibre entre Sir2 et l'acétyltransférase Sas2, toutes deux particulièrement spécifiques de H4K16ac (Wang et al. 2014). Ainsi, c'est l'équilibre entre des HATs et HDACs qui détermine la frontière euchromatine/hétérochromatine dans ce modèle. Un autre exemple de l'importance des HDACs dans l'hétérochromatine a été mis en relief par l'utilisation d'inhibiteurs d'HDACs (HDACi), notamment la trichostatine A (TSA), qui provoque une hyper-acétylation d'H4 aux péri-centromères, provoquant une déstructuration de cette hétérochromatine, avec des défauts mitotiques (Taddei et al. 2001).

C Hétérochromatine facultative / constitutive

On distingue aujourd'hui deux classes d'hétérochromatine : constitutive et facultative. L'hétérochromatine constitutive correspond aux régions qui sont compactées de manière permanente au cours du cycle, quel que soit le type cellulaire, et à tous les stades du développement à partir de sa mise en place. Ces régions sont effectivement globalement dépourvues de gènes, mais ne sont plus vues comme des régions « inutiles », mais bien comme des régions qui révèlent des fonctions cellulaires encore en cours d'investigation. L'hétérochromatine facultative permet la compaction et la répression transcriptionnelle de régions qui contiennent généralement des gènes codants pour des protéines. Contrairement à l'hétérochromatine constitutive, cette compaction « facultative » diffère en fonction du type cellulaire, et dépendamment du contexte temporel et spatial. Bien que toutes deux condensées, et partageant certaines inter-connexions moléculaires, ces deux hétérochromatines constituent vraiment deux champs d'investigation distincts. Leur mise en place semble mutuellement exclusive, et les mécanismes qui permettent de passer de l'une à l'autre sont encore en cours d'investigation (Saksouk et al. 2014). Néanmoins, qu'elle soit facultative ou constitutive, une distinction principale entre hétérochromatine et euchromatine reste le niveau d'acétylation des histones. Les exceptions et les nuances à ce dogme feront l'objet de la partie D de cette introduction. De plus, il arrive parfois que la frontière entre ces différents états soit floue, et certaines régions génomiques, ou situations, peuvent être difficiles à classer de manière si stricte.

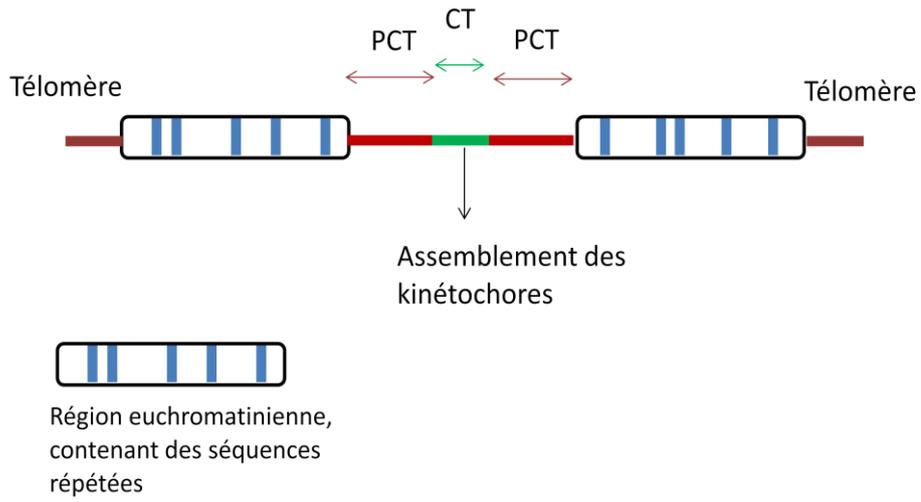


Figure 13 : Schéma d'un chromosome de mammifère (ici métacentrique, avec le centromère au centre du chromosome). PCT : Péricentromères. CT : Centromères.

- **1 Hétérochromatine facultative**

Cette hétérochromatine se situe sur des régions qui ne doivent pas être réprimées de manière définitive, mais qui ont besoin d'une compaction spatio-temporelle dépendante du contexte. Cette hétérochromatine est impliquée dans la régulation des processus développementaux par l'extinction de gènes lors de la différenciation cellulaire. Elle permet notamment l'extinction d'un large cluster de gènes développementaux, les gènes homéotiques « Hox ». Mais le cas le plus connu d'hétérochromatine facultative est l'extinction du chromosome X, qui chez les mammifères a lieu sur l'intégralité d'un chromosome, dans chaque cellule chez les femelles. Moléculairement on retrouve de manière générale l'hypoacétylation des histones, la méthylation de l'ADN, la mono ou tri-méthylation de la lysine 20 de l'histone H4, l'implication des complexes Polycombs (PRC1 et PRC2) qui participent entre autre à la mise en place de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3, ainsi qu'une composante ARN (généralement un long ARN non-codant).

- **2 Hétérochromatine constitutive**

- a Séquences répétées en tandem

L'hétérochromatine constitutive est toujours basée sur des séquences répétées dans le génome, et est répliquée en fin de phase S. Chez les mammifères, on distingue principalement 3 grandes structures. Les télomères, qui protègent les extrémités des chromosomes ; les centromères, zone de constriction du chromosome, qui représente le site d'assemblage du complexe de protéines nécessaire à la ségrégation des chromosomes (le kinétochore) ; et les péricentromères, qui encadrent les centromères et participent à la ségrégation des chromosomes (Fig 13). Génomiquement, ces régions constituent des larges blocs de séquences répétées (satellites, pour les centromères et péricentromères, mini-satellites pour les télomères), pauvres en gènes, et ont longtemps été considérées comme inertes transcriptionnellement. En réalité, elles ont toutes en commun la transcription de ces séquences répétées en longs ARN non codants, impliqués de différentes manières dans leur propre formation et maintien. Bien que ces structures soient différentes, on retrouve une signature épigénétique assez caractéristique, avec notamment la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1), la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, ainsi que bien sur une hypoacétylation des histones et une méthylation de l'ADN. Ces trois régions représentent à elles seules une proportion importante du génome. Par exemple, chez la souris, les séquences péricentromériques peuvent représenter jusqu'à 10% du génome. De plus, le génome des mammifères contient plusieurs centaines de copies de gènes codant pour les ARN ribosomiques (rDNA) regroupés en large clusters. La proportion des rDNA qui sont transcrits dans une cellule est dépendante des besoins métaboliques de la cellule.

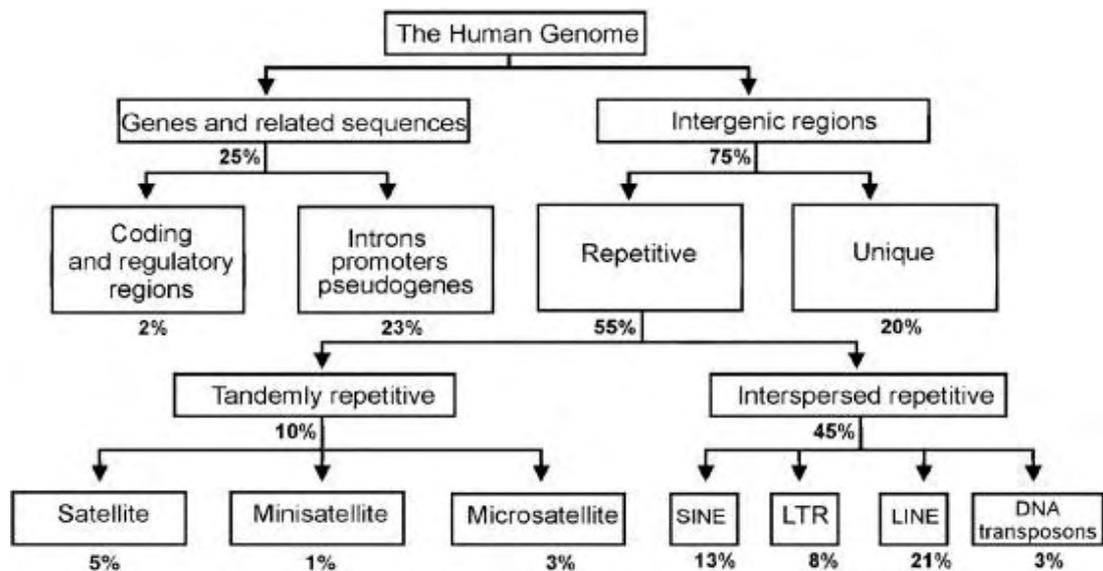


Figure 14 : Composition du génome humain. D'après (Jasinska and Krzyzosiak 2004)

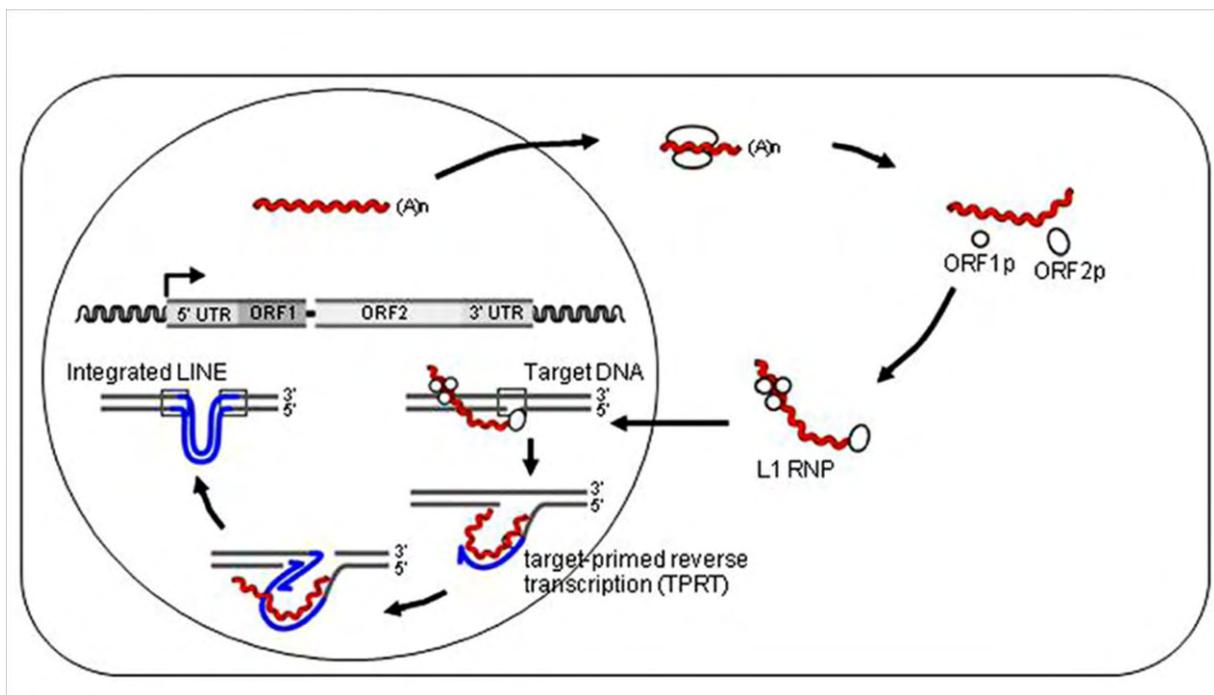


Figure 15 : Cycle du rétro-transposon LINE. Les protéines traduites de l'ORF1/2 (ORF1p et ORF2p) s'associent avec leur propre ARN, formant un complexe RNP (RNP complexe). La synthèse de l'ADN L1 dans le noyau est ensuite basée sur une transcription inverse par génération de primers (TPRT). D'après (Koito and Ikeda 2013)

Néanmoins même dans une cellule métaboliquement très active, il existe toujours une proportion de ces gènes qui se trouvent réprimés sous une forme d'hétérochromatine. Ces copies sont également répliquées tardivement, en fin de phase S, et font également intervenir dans leur répression transcriptionnelle un ARN non codant via le complexe de remodelage NoRC. S'ajoute à ces régions le locus MAT (Mating type locus), le locus de déterminisme du sexe chez la levure *S.pombe* (organisme modèle qui a été et est très utilisé dans l'étude de l'hétérochromatine constitutive)

b Séquences répétées dispersées

On trouve également des séquences répétées dispersées dans le génome, qui sont aussi sous forme d'hétérochromatine, mais dont le statut d'hétérochromatine constitutive peut être discuté. Ce sont essentiellement des transposons, c'est-à-dire des séquences capables de se multiplier dans le génome. On trouve des transposons à ADN, qui se coupent et se réintègrent ailleurs dans le génome, et les rétrotransposons à ARN, qui utilisent un intermédiaire ARN et sont donc sujet à une régulation transcriptionnelle. Parmi ces derniers, on retrouve entre autre les séquences SINEs (Short interspersed nuclear elements), dont la plus connue est la séquence Alu, et les LINEs (Long interspersed nuclear elements), dont je ferai une description plus complète. Dans le génome existent d'autres séquences qui ne sont pas nécessairement sous forme d'hétérochromatine, les micro-satellites, qui sont des séquences de 1 à 6pb, répétées sur environ 150 pb maximum, et qui peuvent se trouver dans des exons ou des introns de gènes, aussi bien que dans l'hétérochromatine, et les mini-satellites hypervariables (entre 9 et 24pb) (Fig 14).

- 1 Séquences LINEs

Ces sont des séquences de 6 Kb environ présentes dans tous les génomes de mammifère. Elles contiennent une 5'UTR, une 3'UTR, deux promoteurs (le promoteur sens qui permet l'expression, et un antisens impliqué dans la régulation), ainsi que les séquences nécessaires pour la polyadénylation et la maturation de l'ARN. Sont ainsi transcrits (ensemble ou séparément ((Kines and Belancio 2012)) deux cadres ouverts de lecture (ORFs), L'ORF1 codant pour une l'endonucléase, et l'ORF2 pour une transcriptase inverse. Ainsi, une fois la séquence LINE transcrite, son ARN est rétrotranscrit grâce à la transcriptase inverse, et l'ADN complémentaire obtenu peut être réintégré ailleurs dans le génome grâce à l'endonucléase (Fig 15). Autrement dit cette séquence possède, et ne possède d'ailleurs que cela, tout ce qu'il est nécessaire pour se répliquer et s'insérer de manière autonome dans le reste du génome. C'est d'ailleurs le seul rétrotransposon à posséder une rétrotranscriptase et de ce fait à être autonome. Les autres rétrotransposons, comme par exemple les SINEs, utilisent la rétrotranscriptase des LINEs, et la régulation des LINEs influe donc sur l'activité des autres rétrotransposons. Les LINEs représentent 21% du génome humain, bien qu'une faible proportion semble être véritablement

capable de rétro-transposition (Belan 2013). En effet, on estime qu'une centaine de LINEs est vraiment capable de rétro-transposition dans le génome humain. Outre leur éventuelle insertion dans le corps des gènes, qui pourrait perturber la transcription de ces derniers, les séquences LINEs pourraient également avoir un impact sur cette transcription lorsqu'elles sont simplement insérées à proximité de gènes codants (Ting et al. 2011). Les séquences LINEs représentent donc une potentielle source d'instabilité génétique pour la cellule. Ainsi ces séquences sont normalement transcriptionnellement réprimées, répression qui est perdue dans certains cancers (Ting et al. 2011). Pourtant, cette transposition des séquences LINEs ne doit pas être considérée comme uniquement néfaste. En effet, cette transposition est particulièrement active dans les cellules progénitrices neuronales, et on leur propose un rôle important dans la diversification neuronale (Upton et al. 2015). De plus, ces séquences sont enrichies au niveau du chromosome X, et il est proposé qu'elles joueraient un rôle dans son extinction (Bailey et al. 2000). Cette transposition des séquences LINEs doit donc être éventuellement considérée comme fonctionnellement utile.

L'hétérochromatine péricentromérique

Les péricentromères (PCT) sont des régions d'hétérochromatine constitutive importantes pour la stabilité génétique via leur rôle dans la division cellulaire. Ils participent également à la suppression des recombinaisons pendant la méiose, et à la limitation des centromères. Ils constituent un modèle pour comprendre la formation et la maintenance de l'hétérochromatine constitutive, qui s'avère complexe. Longtemps perçus comme des blocs d'hétérochromatine inertes, les PCT apparaissent en réalité comme des structures plastiques. C'est notamment à travers l'étude des ARN transcrits dans cette région malgré la compaction, que les PCT révèlent de nouvelles fonctions potentielles.

A La génomique des péricentromères

- **1 Evolution**

Les péricentromères constituent une structure conservée puisqu'on les retrouve chez presque tous les organismes eucaryotes, où ils se forment sur des séquences répétées. Néanmoins, ces séquences sont extrêmement divergentes entre les espèces, laissant penser que la séquence primaire n'a pas d'importance capitale pour l'établissement de l'hétérochromatine, et que le ciblage de ces régions se fait de manière épigénétique. La même problématique se pose pour les centromères qui ont été plus étudiés que les péricentromères de ce point de vue. Chez la levure à fission *S.pombe* comme dans des cellules humaines, l'apport d'une séquence d'ADN contenant des séquences centromériques, peut conduire à la création de mini-chromosomes, contenant des « néocentromères » fonctionnels. Néanmoins des chromosomes ne contenant pas de séquences centromériques arrivent à compenser ce manque et à créer des « néocentromères » sur des séquences non-centromériques. La séquence serait donc potentiellement suffisante mais pas nécessaire. On trouve également chez le cheval, l'orang-outang, ou encore le poulet, des centromères basés sur des séquences non répétées sur certains chromosomes (Fukagawa and Earnshaw 2014). Il a été proposé pour les centromères, que l'épigénétique permette d'agir comme un tampon pour les variations de séquences, offrant une marge de variation pouvant éventuellement être bénéfique d'un point de vue évolutif (Murphy and Karpen 1998). En effet, les séquences satellites qu'elles soient centromériques ou péricentromériques, sont parmi les régions qui évoluent le plus rapidement des génomes. Il est proposé que cette divergence participe à l'isolement reproductif entre les espèces (Ferree and Prasad 2012). Néanmoins Gilliland et al, en 2015, rapporte une ségrégation chromosomique normale

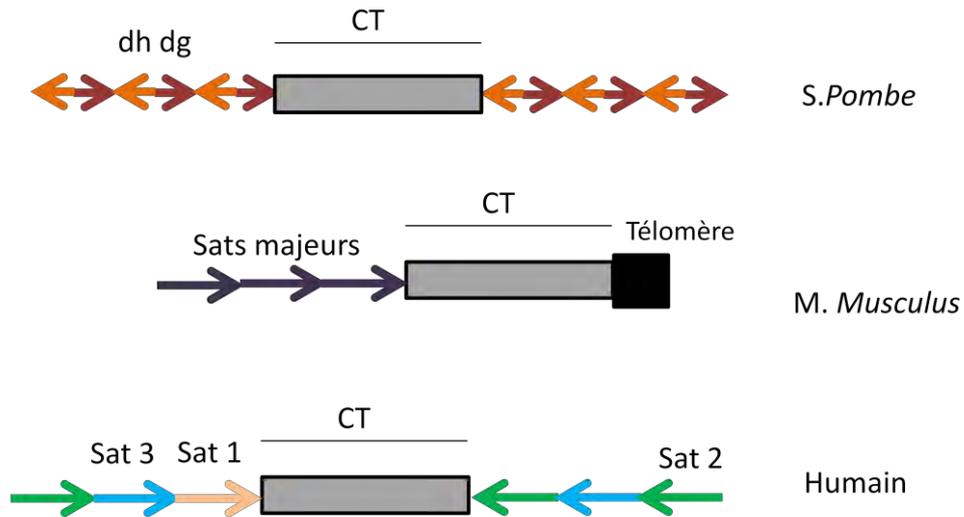


Figure 16 : Représentation des péricentromères chez différentes espèces. CT : centromères.

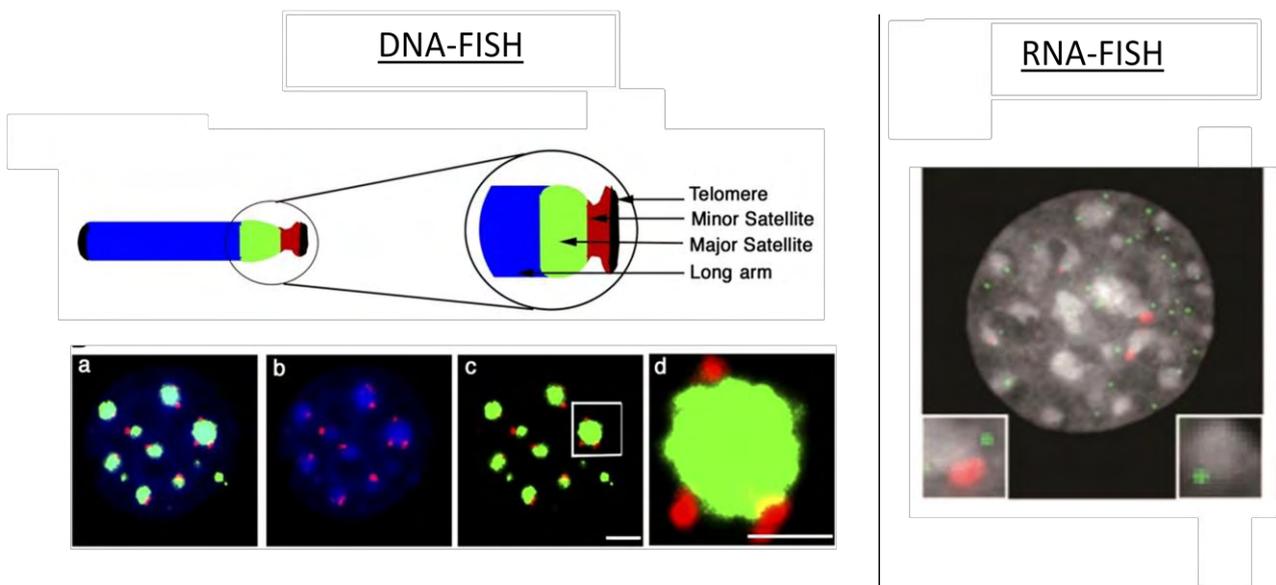


Figure 17 : Organisation spatiale des péricentromères et de leurs transcrits chez la souris. DNA-FISH d'après (Guenatri et al. 2004). L'ADN satellite majeur, soit les péricentromères, est marqué en vert, et l'ADN satellite mineur, soit les centromères, est marqué en rouge. a : DAPI + Sats majeurs + sats mineurs. b : DAPI + sats mineurs. c : Sats majeurs + sats mineurs. d : grossissement de c. RNA-FISH d'après (Maison et al. 2011). Des sondes contre les ARN satellites majeurs brin-spécifiques (sens en vert, antisens en rouge) sont utilisées en plus d'un marquage DAPI en gris.

lors de la méiose, entre des chromosomes provenant de deux espèces de drosophile dont l'hétérochromatine est extrêmement divergente (Gilliland et al. 2015).

- **2 Les séquences**

S.pombe est un organisme très utilisé pour l'étude des PCTs. Les séquences qui composent les péricentromères sont les « outers repeats », composées de deux types de séquences, les dh et les dg, de 4,4Kb et 4,8Kb, répétées en tête-bêche (Fig 16). Ces séquences contiennent elles-mêmes un certain nombre de courtes séquences répétées. Elles sont toute deux riches en bases A et T (adénine et thymidine), mais ne possèdent pas d'homologie entre elles. En revanche les répétitions dh possèdent 80% d'homologie entre elles et les dg 99%. Chez la souris, c'est une seule séquence, les satellites majeurs (234pb) répétée sur 6 Mb, également riche en AT, qui constitue les péricentromères. Chez l'humain on distingue les satellites Beta (68pb), 1 (42pb, enrichie en AT), 2 (5pb) et 3 (5pb), qui sont répartis de manière différentielle selon les chromosomes, plus ou moins dégénérées entre ces derniers, et parfois séparées par des séquences « spacer ». Chez ces 3 espèces, on rapporte une transcription de ces séquences en ARN non-codant, qui sera commentée plus tard dans ce manuscrit. Chez la levure *S.cerevisiae*, qui n'a pas de péricentromères à proprement parler, on observe néanmoins, une homologie entre les séquences qui entourent les centromères (séquences CDE) et les satellites humains (Grady et al. 1992). Ces observations montrent bien à quel point les organisations et les séquences divergent, en revanche nous allons voir que les structures moléculaires présentent certaines conservations.

- **3 Organisation spatiale**

Chez la souris, les séquences satellites majeurs sont très riches en A et T et répétées sur environ 6 mégabases à côté du centromère. Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), une molécule fluorescente classiquement utilisée pour marquer l'ADN, se lie à ces bases. Ainsi les régions péricentromériques sont fortement marquées par ce colorant. Un marquage en DAPI sur des cellules de souris permet donc de visualiser directement les péricentromères, qui s'organisent en foyers : les chromocentres, décrits par Hsu et al, en 1971 (Fig 17). Plusieurs péricentromères de différents chromosomes s'associent dans un seul chromocentre (Guenatri et al. 2004), et les centromères (composés de « satellites mineurs »), y sont retrouvés en périphérie, tout comme les transcrits des satellites (majeurs et mineurs) (Fig 17). Alors que chez *S.pombe*, les 3 chromosomes se regroupent en 1 seul chromocentre, on retrouve entre 8 et 30 chromocentres dans un noyau de cellule de souris. Cette organisation spatiale en chromocentres est conservée chez l'homme, bien que non détectable en DAPI.

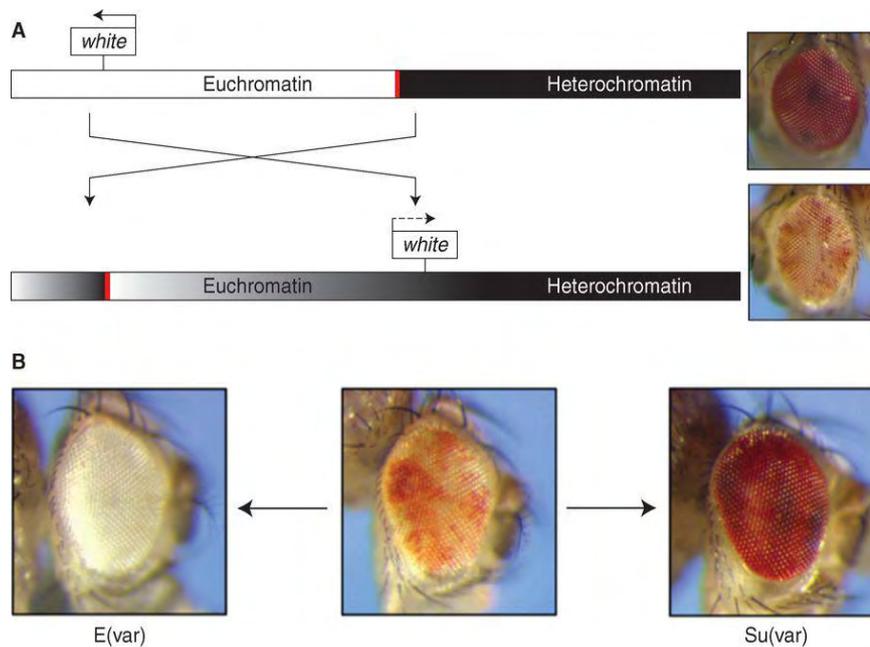


Figure 18 : Principe de variégation. A) Schéma de réarrangement attribuable à l'inversion provoqué par les rayons X qui place le locus *White*, normalement localisé dans l'euchromatine du chromosome X, à environ 25Kb de la cassure, dans l'hétérochromatine péricentrique. Les photos montrent les phénotypes associés au niveau de la couleur des yeux. B) Phénotypes associés aux enhanceurs *E(var)* ou supprimeurs de variégation *Su(var)*. D'après (Elgin and Reuter 2013).

En effet, on peut l'observer en réalisant des immunofluorescences contre les composants principaux des péricentromères, la protéine HP1alpha, H3K9me3, ou la méthyltransférase SUV39H1. A noter que la répartition spatiale des chromocentres à l'intérieur du noyau est dynamique en fonction du contexte. Par exemple, une modification de positionnement des péricentromères, ainsi que des réarrangements des chromocentres, peuvent être détectés dans certaines pathologies (Dupont et al. 2012), ou au cours de processus de différenciation cellulaire (Beil et al. 2002),(Almouzni and Probst 2011). En effet, l'extinction transcriptionnelle à long terme nécessaire aux processus de différenciation cellulaire, semble impliquer des repositionnements de certains gènes dans des compartiments hétérochromatiniens (Beil et al. 2005).

B Le « squelette moléculaire » : SUV39H-H3K9me3-HP1

- **1 Les supprimeurs de variégation**

Les péricentromères de la drosophile sont très larges, et sont répartis de part et d'autres des centromères (Ho et al. 2014). Ces régions sont riches en éléments transposables, mais contiennent aussi des gènes (Fedoseyeva and Alexandrov 2014),(Smith et al. 2007). Les séquences satellites semblent varier d'un chromosome à l'autre, et même si quelques séquences ont été identifiées (Andreyeva et al. 2007), et que l'hétérochromatine de la drosophile a été annotée en 2007 (Smith et al. 2007), les séquences péricentromériques sont assez mal connues. Néanmoins la drosophile a fourni un modèle d'étude très efficace pour l'étude des péricentromères, puisqu'elle a permis d'identifier les composants majeurs de cette structure par étude de variégation. La mutation « white » a été découverte en 1910 par Thomas Morgan : elle provoque une absence de pigmentation des yeux à facettes, normalement rouges, de la drosophile. Le gène touché par cette mutation a donc été appelé white. En 1930, Muller observe un phénotype nouveau, qu'il appelle phénotype de variégation. Après avoir soumis des drosophiles à des rayons X comme agent mutagène, certaines facettes de l'œil de la drosophile restent rouges, alors que d'autres perdent leur pigmentation, formant un œil mosaïque, comme si le gène white avait été transcriptionnellement réprimé dans certaines cellules. Après étude plus approfondie, il est apparu qu'un réarrangement chromosomique avait eu lieu, provoquant le repositionnement du gène white à proximité d'une région péricentrique (Fig 18). Ainsi, la propagation de l'hétérochromatine adjacente conduit à l'extinction transcriptionnelle ou non de white, comme si le réarrangement permettait l'éjection d'une zone barrière. Quoi qu'il en soit ce phénotype constitue le PEV (Position-Effect Variegation). Une lignée de drosophile au phénotype PEV, a pu être utilisée pour cribler des mutations, capables d'augmenter ou de diminuer le PEV. Ces mutations sont nommées respectivement E(var), pour

enhancer de variégation, ou Su(var), pour supprimeur de variégation, et ont conduit à l'identification de protéines qui jouent des rôles structurants dans l'hétérochromatine péricentrique, impactant sur la propagation de cette dernière (Elgin and Reuter 2013). Près de 150 protéines ont ainsi été identifiées, mais les plus connues sont Suv(var)2-5, ou Hétérochromatin protein 1 a (HP1a), et la méthyltransférase Su(var)3-9. Ces deux protéines sont aujourd'hui considérées comme deux constituants majeurs de l'hétérochromatine, et ce de manière conservée de *S.pombe* à l'homme. Leur co-localisation au niveau de l'hétérochromatine a d'abord été montrée par marquage immunohistochimique au niveau des chromosomes polytènes de drosophile, avant d'être confirmée dans toutes ces espèces de diverses manières, et notamment grâce à l'apparition de la technique de l'immunoprécipitation de chromatine (ChIP).

- **2 Les méthyltransférases SUV39H**

La protéine SU(VAR)3-9 est conservée de *S.pombe* à l'homme, puisqu'on la retrouve sous la dénomination de Clr4 chez *S.pombe* et SUV39H chez la souris et l'homme. SUV39H est la première méthyltransférase d'histone identifiée chez les mammifères. En 2000, Rea et al démontrent, par un essai *in vitro* sur des histones, qu'elle méthyle spécifiquement la lysine 9 de l'histone H3. Ils identifient son domaine catalytique, le domaine SET (Rea et al. 2000). Ce domaine étant le domaine catalytique que l'on va retrouver dans la quasi-totalité des méthyltransférases par la suite. Il existe 7 familles de méthyltransférases chez les mammifères, une de ces familles étant la famille SUV39H. Dans cette famille, qui contient 7 membres, le domaine SET est entouré par des régions Pré-SET et Post-SET, indispensables pour l'activité méthyltransférase (Völkel and Angrand 2007). SUV39H en est le membre fondateur, et la même année que la découverte de SUV39H, a été découverte SUV39H2, qui lui partage 59% d'identité. Chez la souris, SUV39H1 et SUV39H2 ont des profils d'expression superposables au cours du développement embryonnaire, mais SUV39H2 a une expression réduite aux testicules chez l'adulte, où elle semble jouer un rôle dans la spermatogenèse (O'Carroll et al. 2000). SUV39H1/2 ne sont pas les seules méthyltransférases capables de méthyle H3K9, puisque EHMT1, EHMT2, PRDM2, et SETDB1 le sont également, SETDB1 étant même spécifique de ce résidu. En revanche, chez la souris, SUV39H1 est bien celle qui méthyle H3K9 spécifiquement aux péricentromères (Peters et al. 2003). En effet, H3K9 est mono-méthylée dans le cytoplasme par les méthyltransférases Prdm3 et Prdm16, puis après incorporation dans la chromatine des péricentromères, SUV39H provoque leur tri-méthylation (Pinheiro et al. 2012). La protéine SUV39H1 possède un chromodomaine, capable de se lier notamment à H3K9me3, c'est-à-dire à la modification

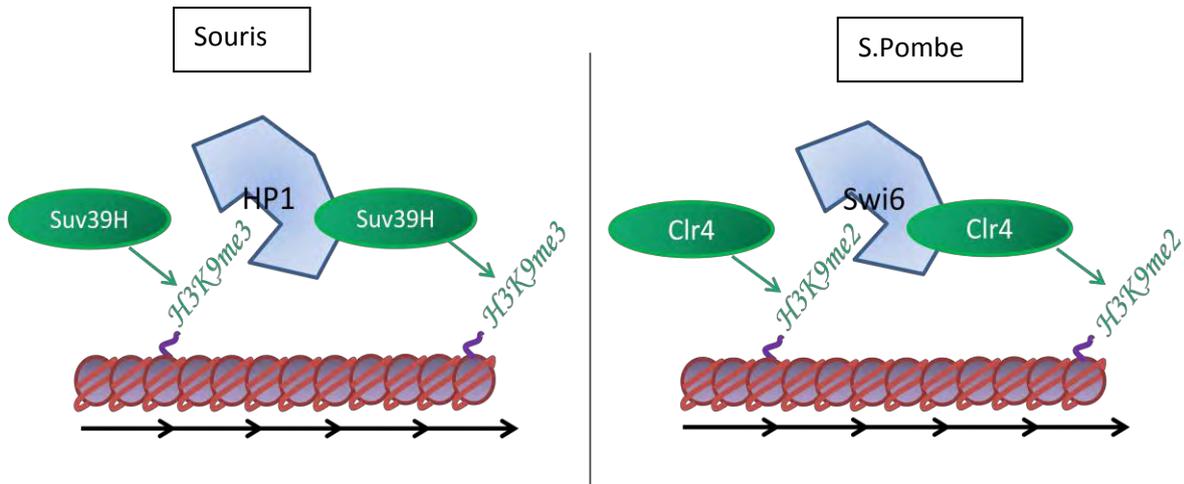


Figure 19 : Représentation schématique du « squelette » de l'hétérochromatine péricentrique, conservé de *S.pombe* à l'homme. Les flèches noires représentent les séquences d'ADN répétées. Les protéines SUV39H et HP1 sont les protéines de mammifères et possèdent des orthologues chez les autres espèces telles que *S.pombe* ou la drosophile.



Figure 20 : Structure des protéines HP1. NTE : N-terminale extension, CD : Chromodomaine, H : Hinge domaine, CSD : Chromoshadow domaine, CTE : C-terminale extension.

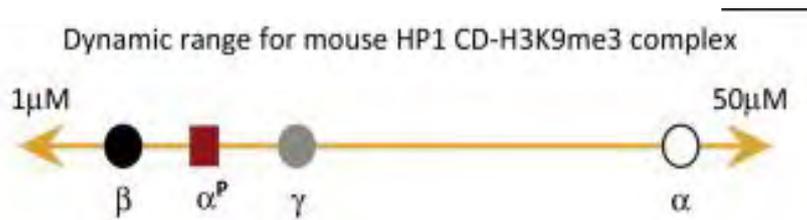


Figure 21 : Dynamique de dissociation du complexe H3K9me3 / chromodomaine de HP1, selon les différents paralogues. Modifié d'après (Canzio et al. 2014).

qu'elle met elle-même en place, permettant ainsi le renforcement de son propre recrutement ou sa propagation au niveau de l'hétérochromatine. Au delà de son rôle dans les péricentromères, SUV39H est retrouvé dans d'autres structures hétérochromatiniennes, par exemple dans les télomères (Garcia-Cao et al. 2004), mais aussi dans de l'hétérochromatine parfois facultative, comme par exemple sur le chromosome X mis sous silence (Peters et al. 2002). SUV39H est aussi impliquée au niveau de l'euchromatine, notamment par son recrutement au niveau de régions promotrices où elle participe à la répression transcriptionnelle de gènes. En effet, H3K9me3 est une marque clairement associée à la répression de la transcription. SUV39H intervient notamment dans la régulation de la transcription des gènes cibles du facteur de transcription E2F, et donc dans la régulation du cycle cellulaire (Vandel et al. 2001). Les protéines SUV39H jouent donc des rôles importants dans la cellule et pourtant de façon surprenante les souris double KO SUV39H1-/-, SUV39H2-/- sont viables (Peters et al. 2001).

- **3 Les protéines HP1**

La protéine HP1a ou (heterochromatin Protein 1), a été identifiée en 1986 chez la drosophile, comme une protéine localisée à l'hétérochromatine (James and Elgin 1986). Elle possède un chromodomaine capable de se lier à H3K9me2/3 (Nielsen et al. 2002). Ainsi, le trio « SUV39H-H3K9me2/3-HP1 » constitue le squelette de l'hétérochromatine péricentromérique (Fig 19), qui se retrouve de *S.pombe* à l'homme, et autour duquel viennent se greffer des nuances moléculaires espèce-spécifiques. Il n'a pas été décrit d'orthologue chez *S.cervisiae*, ce qui va de pair avec son absence de réels péricentromères. Chez *S.pombe*, il existe deux protéines HP1 : Swi6 et Chp2. Chez les mammifères, HP1alpha (α) possède deux paralogues, HP1 beta (β) et HP1 gamma (γ). Toutes ces protéines HP1 ont la même structure, à savoir en plus de leur chromodomaine, un domaine Hinge, capable de lier les acides nucléiques, ainsi qu'un domaine « chromoshadow » (Fig 20). Le domaine chromoshadow permet l'homodimérisation de HP1, et potentiellement le rapprochement de deux nucléosomes adjacents, participant à la compaction. Il peut également se lier à d'autres protéines telles que SUV39H, permettant le ré-enforcement et la propagation de l'hétérochromatine (Fig 19). Ces trois paralogues partagent des pourcentages d'identité importants, mais ont pourtant des localisations et des fonctions bien distinctes (Canzio et al. 2014). Alors que HP1alpha et beta se retrouvent majoritairement à l'hétérochromatine, le recrutement d'HP1 gamma se retrouve majoritairement aux régions euchromatiniennes. HP1 gamma est par exemple impliquée dans la régulation de l'expression des gènes euchromatiniens, de manière négative, mais aussi positive. L'affinité de liaison d'HP1 α , β , et γ pour H3K9me2/3 est également différente, et on note que la phosphorylation d'HP1 alpha dans sa partie N-ter, augmente considérablement cette affinité qui est sinon assez faible (Fig

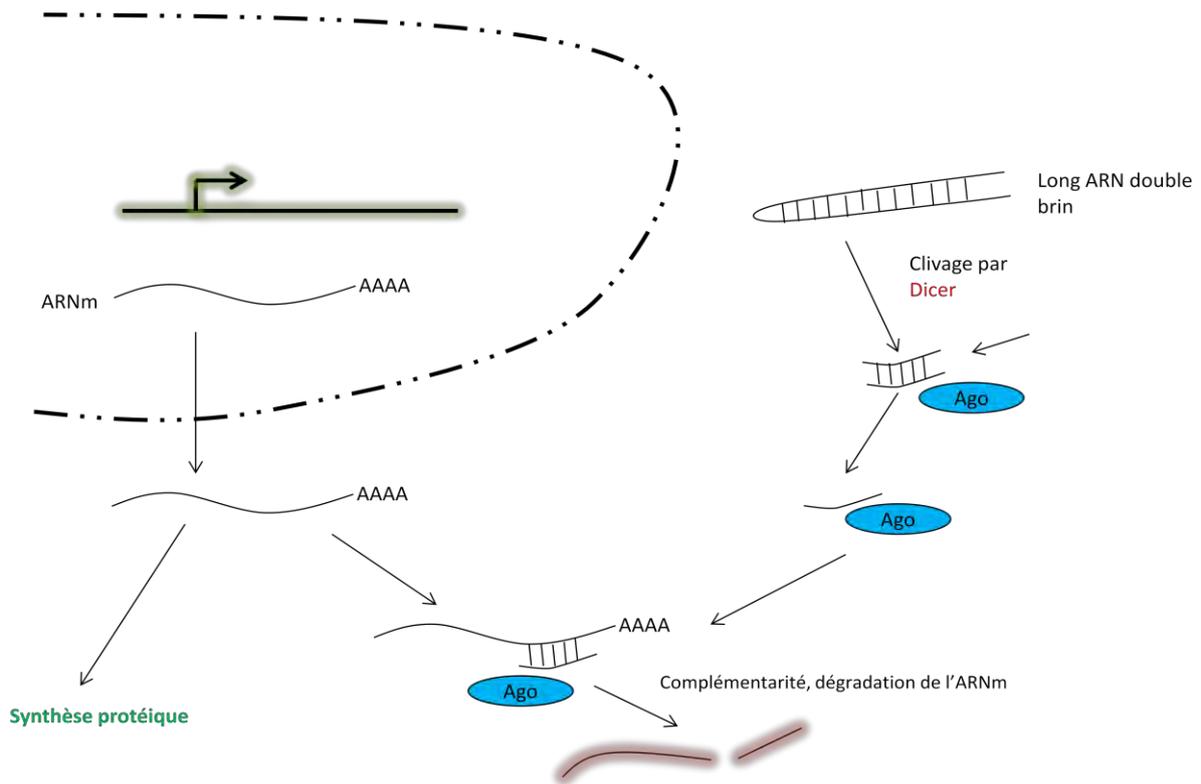


Figure 22 : Principe simplifié de l'ARN interférence. La prise en charge d'un long ARN double brin par l'enzyme Dicer mène à la génération d'un petit ARN double brin. Celui-ci est directement introduit dans le cadre expérimental des siRNA. Sa prise en charge par la protéine Ago mène à la dégradation d'un ARNm cible.

21). La vision figée de l'hétérochromatine a d'ailleurs été ébranlée par les expériences montrant que la présence de la protéine HP1 dans l'hétérochromatine est extrêmement dynamique, c'est-à-dire qu'elle n'est pas recrutée de manière stable, mais présente une dynamique dissociation-recrutement importante (Festenstein et al. 2003),(Cheutin et al. 2003),(Verreault 2003). Chez la drosophile, il existe 5 protéines HP1 qui révèlent des fonctions très diverses, laissant penser que les protéines HP1 ont encore beaucoup à révéler au delà de l'hétérochromatine. De plus, l'expression des gènes HP1 est dérégulée dans un certain nombre de cancers (Dialynas et al. 2008). Par exemple, dans le cancer du colon, la diminution de l'expression d'HP1alpha est associée avec un mauvais pronostic, puisqu'elle corrèle avec une augmentation du caractère invasif et métastatique des tumeurs (Ruginis et al. 2006).

C L'hétérochromatine péricentromérique : *S.pombe* vs mammifères

- **1 L'hétérochromatine des péricentromères chez *S.pombe***

S.pombe est un modèle d'étude de l'hétérochromatine péricentromérique qui a permis de mieux en cerner sa formation. On y découvre surtout le rôle de la machinerie de RNAi (ARN interférence).

a L'ARN interférence (RNAi)

L'interférence à ARN est un phénomène qui a été pour la première fois observé en 1990 par une équipe américaine, qui cherchait à augmenter la pigmentation chez des pétunias. Suite à l'introduction dans des pétunias d'une copie supplémentaire du gène CHS (chalcone synthase), responsable de la pigmentation des pétales afin d'en augmenter la coloration, la moitié des pétunias sont devenues blancs ou anormalement pâles. En analysant le contenu en ARN des fleurs blanches, ils ont observé que le taux d'ARNm produit par le gène CHS avait fortement diminué, alors que le gène lui-même n'avait pas été altéré. Ainsi l'introduction d'une copie d'un gène déjà exprimé de manière endogène chez la plante, a provoqué l'inhibition de son expression. Ce phénomène a tout d'abord été nommé « co-suppression » (Napoli et al. 1990). C'est plus tard, chez *C.elegans* que le phénomène a pris le nom d'interférence à ARN, quand il a été compris que c'est l'introduction d'ARN double brin complémentaire à l'ARNm qui provoquait la disparition de celui-ci. En effet l'ARN double brin introduit est clivé en petits duplex par l'enzyme Dicer (enzyme appartenant à la famille de la RNaseIII). Ces petits duplex sont alors chargés par l'enzyme Dicer sur une protéine de la famille Argonaute et de la sous-famille Ago, possédant des propriétés de clivage des ARNm. Une fois chargé sur Ago, un des deux brins du duplex va être dégradé, l'autre étant conservé en tant que « brin

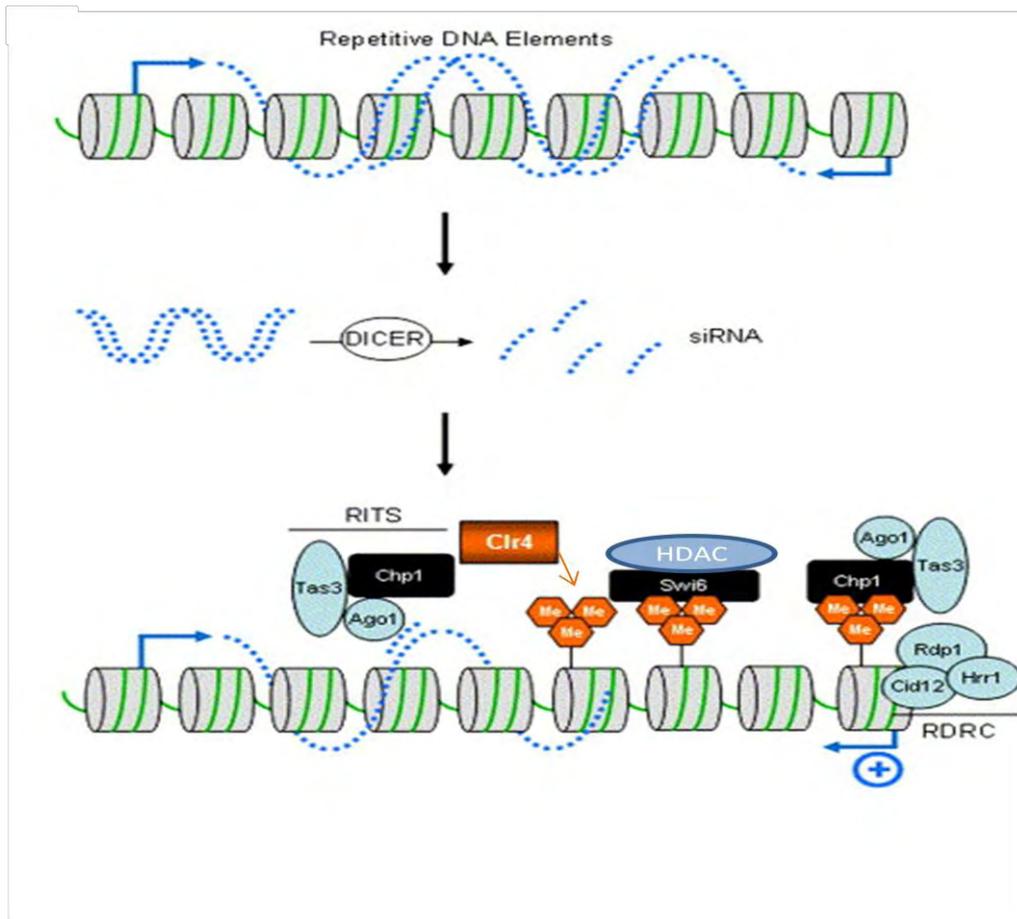


Figure 23 : Mécanisme de formation de l'hétérochromatine péricentromérique chez *S.pombe*.
D'après (Völkel and Angrand 2007)

guide » qui va amener la protéine Ago à l'ARNm cible qui lui est complémentaire pour le cliver. C'est cette machinerie que l'on détourne pour les expériences de siRNA (small interfering RNAs), où l'on provoque la diminution de l'expression d'un gène de manière ciblée (Fig 22). Ceci constitue le cas le plus connu de la mise sous silence transcriptionnelle, TGS (transcriptional gene Silencing), mais on retrouve cette machinerie ou une partie de celle-ci dans divers phénomènes de mises sous silence, comme par exemple la génération des miRNA. Dans l'hétérochromatine, cette machinerie est utilisée pour réaliser une mise sous-silence post-transcriptionnelle, ou PTGS (Post-transcriptional Gene Silencing).

b Mécanisme de compaction

La formation de l'hétérochromatine chez *S.pombe* implique la transcription bidirectionnelle par l'ARN Polymérase II des séquences dh et dg en phase S, générant un ARN double brin. Celui-ci est pris en charge par Dicer, et clivé en siRNAs, qui sont ensuite chargés, via la protéine Ago, dans le complexe RITS (RNA-induced transcriptional post-silencing). Ceci permet le ciblage de ce complexe au niveau des péricentromères, par appariement entre les siRNA avec les ARN dh/dg naissants. Or, le complexe RITS contient l'orthologue de SUV39H, Clr4, qui va catalyser la di-méthylation de H3K9, et permettre le recrutement de Swi6 (l'orthologue de HP1). Celui-ci peut alors recruter différentes protéines, entre autre des HDACs, maintenant l'hyoacétylation de la région. De plus la méthylation d'H3K9 mise en place par le ciblage de Clr4 par le complexe RITS, stabilise le recrutement du complexe RITS lui-même, puisque ce dernier contient une protéine à chromodomaine Chp1, capable de s'y lier. On voit alors la notion de propagation de cette hétéochromatine par ce système d'auto-entretien. De plus, le complexe RITS favorise en retour le recrutement du complexe RDRC (RNA-directed RNA polymerase activity complex), augmentant la production des ARN doubles-brins (Fig 23). Cette hétérochromatine est donc dépendante de la transcription de ses séquences, et des mutations dans des sous-unités de la Polymérase II affectent sa formation. On note que Swi6 est lui-même capable de recruter Epe1, une protéine qui déstabilise l'hétérochromatine (Zofall and Grewal 2006). Il y aurait donc un équilibre entre des protéines aux effets opposés, afin d'obtenir une fine régulation autorisant une chromatine ouverte, et donc la transcription, nécessaire à la mise en place du PTGS, pour obtenir une chromatine compactée. Cette problématique de la nécessité de la transcription/décompactation pour permettre la compaction va se retrouver chez la souris, même si le rôle de l'ARN interférence y est discuté.

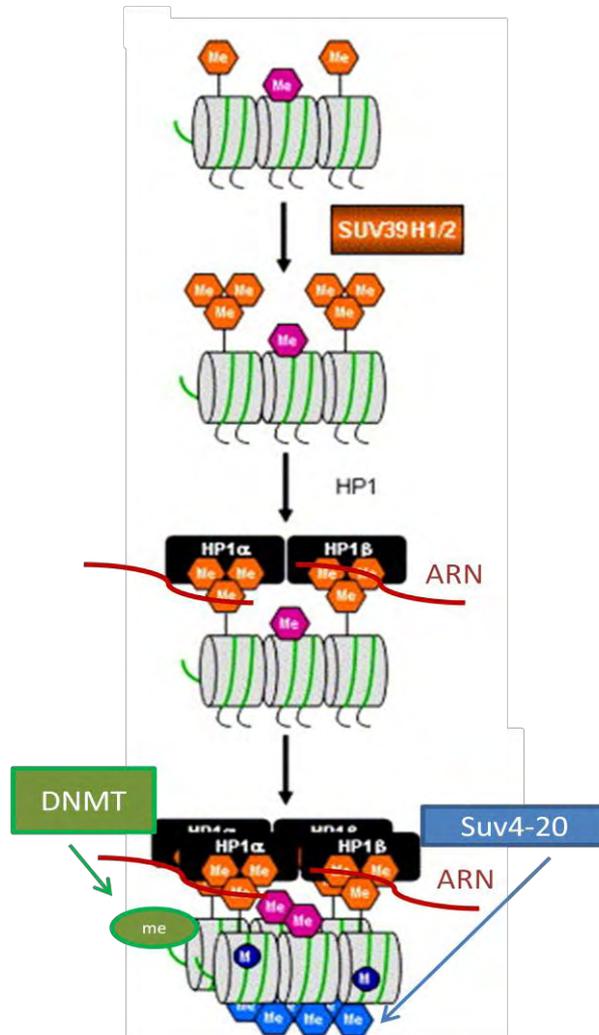


Figure 24 : Mécanisme de formation de l'hétérochromatine péricentromérique chez la souris.

Modifié d'après (Völkel and Angrand 2007).

- **2 L'hétérochromatine des péricentromères chez les mammifères**

- a Particularités

D'autres modifications jouent des rôles importants dans les péricentromères (PCTs) chez les mammifères, notamment la méthylation de l'ADN, absente chez la levure, et la tri-méthylation d'H4K20. Les méthyltransférases responsables d'H4K20me3 (Suv4-20H1/2, qui sont identifiées comme supresseurs de variégation), ainsi que les DNMTs responsables de la méthylation de l'ADN, y sont recrutées par les protéines HP1 (Fig 24). Dans les PCTs de la souris, SUV39H tri-méthyle également H3K56 (Jack et al. 2013). De nombreux autres facteurs semblent être impliqués pour sa maintenance notamment au cours de la réplication, tel que CAF-1 ou NP95 (Quivy et al. 2008),(Papait et al. 2007). Ce degré de complexité pourrait éventuellement rendre l'existence du RNAi inutile. Chez les plantes, on trouve aux PCTs à la fois l'existence de la méthylation de l'ADN et une composante ARN, mais pas de HP1. Ainsi différentes combinaisons des facteurs impliqués pourraient être suffisantes à la maintenance des péricentromères.

- b Implication d'une composante ARN

- 1 Implication du RNAi

L'implication de l'ARN interférence dans les péricentromères (PCTs) chez les mammifères est encore en cours d'investigation. En 2005, une équipe a généré une lignée de cellules souches embryonnaires de souris déficientes pour la protéine Dicer (Kanellopoulou et al. 2005). Ces cellules voient la transcription des satellites majeurs augmenter en comparaison aux cellules sauvages. Or, les transcrits issus des séquences satellites s'avèrent exister en différentes tailles, et alors que les fragments supérieurs à 200nt augmentent dans les Dicer^{-/-}, la fraction de 25-30nt disparaît. Ceci suggère que Dicer pourrait être responsable de la génération de ces petits fragments, par clivage des transcrits de longue taille, bien que les produits de clivage de Dicer sont normalement de 21-25nt. En effet, une expérience de traitement à la RNase One (spécifique des ARN simple brin), permet de révéler la présence d'ARN satellite double brin dans les cellules ES sauvages, renforçant cette possibilité. Ces résultats se retrouvent également à l'identique pour les transcrits centromériques. De plus les cellules Dicer^{-/-} présentent globalement une diminution d'H3K9me3 et de la méthylation de l'ADN aux péricentromères, mais de manière curieuse, cette diminution s'accompagne d'une augmentation de la présence d'HP1 beta et gamma. Néanmoins, ces cellules ne présentent pas de phénotypes révélant des anomalies de ségrégation des chromosomes, comme on peut en observer

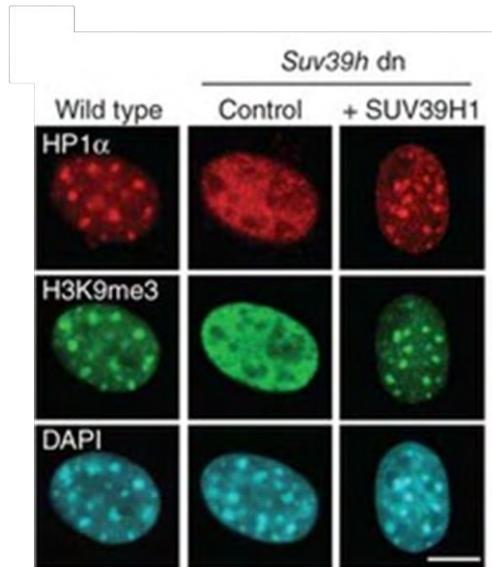


Figure 25 : Modèle cellulaire des SUV39H $\frac{1}{2}$ -/-. La surexpression de SUV39H dans les SUV39H $\frac{1}{2}$ -/- provoque la reformation des foyers H3K9me3 et HP1alpha. D'après (Maison et al. 2011).

par exemple dans les cellules double KO pour les protéines SUV39H1 et 2. Ceci semble laisser penser que les régions centromériques et péri-centromériques ne sont pas dramatiquement altérées par la perte de Dicer, alors qu'au contraire, chez *S.pombe*, la perte de Dicer entraîne des défauts de ségrégation (Volpe et al. 2003). On note qu'au niveau de l'hétérochromatine télomérique chez la souris, qui est aussi régulée par SUV39H, il existe des petits ARN de 24nt, les tel-sRNAs, qui sont générés indépendamment de Dicer (Cao et al. 2009).

- 2 ARN et recrutement de HP1

Quoi qu'il en soit de la présence de l'ARN interférence, une composante ARN est nécessaire au recrutement de HP1 sur H3K9me3, et à la structuration des péri-centromères chez la souris (Fig 23). Cette composante ARN nécessaire semble être simple-brin, et non double-brin comme chez la levure, ou comme suggéré par l'expérience de RNase One. En effet, alors qu'un traitement des cellules à la RNaseA délocalise HP1alpha des chromocentres, la RNaseH (spécifique de l'ARN double brin et des duplexes ARN-ADN) n'a aucun effet (Maison et al. 2002). HP1alpha possède un domaine Hinge, dans lequel la région de 23 acides aminés impliquée dans sa liaison à l'ARN a été identifiée. Cette région plus le chromodomaine de HP1, sont tous deux nécessaires pour le recrutement des protéines HP1 surexprimées dans les cellules aux chromocentres (Muchardt et al. 2002). Ainsi, ce recrutement nécessiterait à la fois une composante ARN et H3K9me3. En 2011, HP1alpha sous une forme sumoylée dans son domaine Hinge, est co-précipitée depuis des extraits nucléaires de cellules de souris, avec de l'ARN issu de la transcription des satellites majeurs, confirmant leur interaction (Maison et al. 2011). Dans cette étude, les auteurs étudient la formation « *de novo* » de l'hétérochromatine. Pour cela, ils utilisent des fibroblastes embryonnaires issus de souris (MEFs) doubles KO pour les protéines SUV39H1/2, qui ne possèdent plus de H3K9me3 ni de HP1 aux péri-centromères, et où ils peuvent provoquer la reformation correcte de l'hétérochromatine par ajout d'un plasmide codant pour la protéine SUV39H (Fig 25). Ils montrent alors que lors de cette formation « *de novo* », le domaine Hinge de HP1 est nécessaire pour le recrutement de HP1 aux péri-centromères. Ils posent un modèle, dans lequel l'ARN permettrait le recrutement *de novo* d'HP1, avant qu'H3K9me3 en permette la stabilisation. En effet, la souris est un modèle intéressant pour étudier la formation « *de novo* » de l'hétérochromatine péri-centrique en étudiant des stades précoces du développement embryonnaire. Là aussi, nous allons voir que les ARN satellites sont nécessaires.

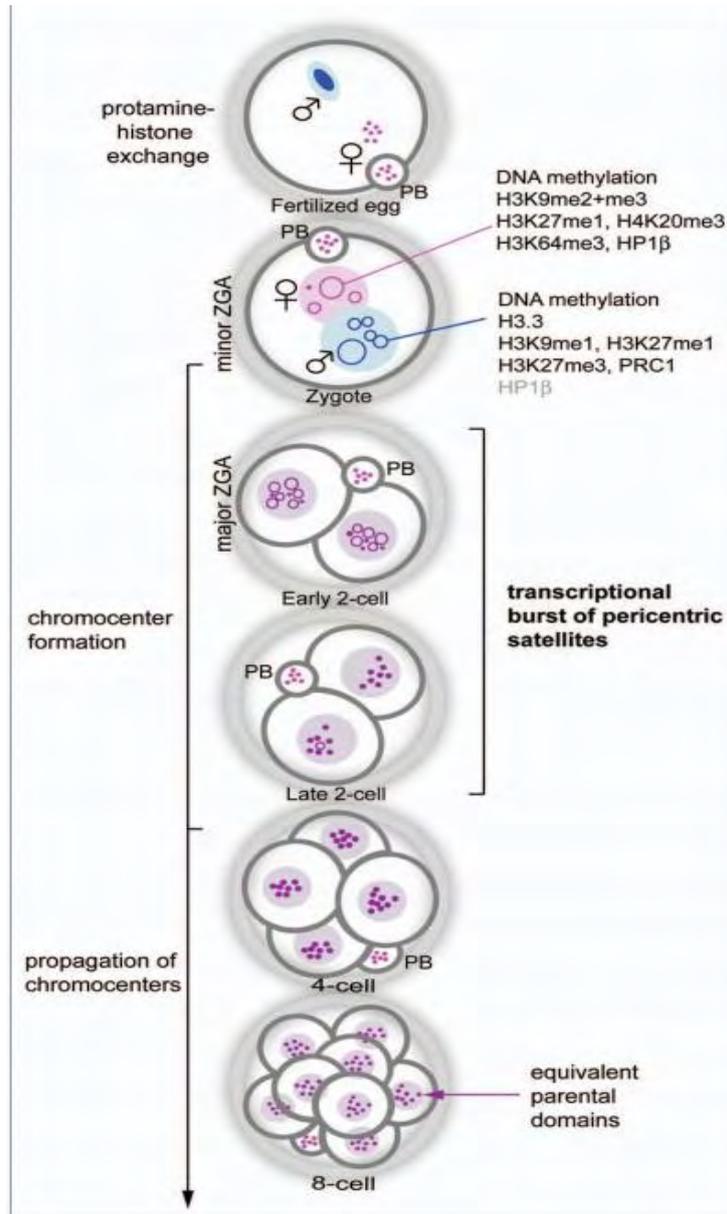


Figure 26 : Organisation, structure des péricentromères dans les premiers clivages du développement précoce chez la souris. Après la fertilisation, l’oocyte finit la méiose et rejette un génome haploïde constituant le globule polaire (PB (Polar Body)). ZGA : minor Zygotic Gene Activation (première activation du génome zygotique). D’après (Almouzni and Probst 2011).

- 3 Développement et formation « de novo » des péricentromères

Dans les gamètes mâles chez la souris, les histones sont majoritairement remplacées par des protamines, ou des variants d'histones spécifiques du sperme. Après la fertilisation, une organisation chromatinienne nucléosomale doit donc se remettre en place dans le génome paternel, et l'hétérochromatine péricentrique doit s'organiser « de novo ». Ainsi, dans l'œuf fécondé, les pronucléus mâles et femelles sont épigénétiquement différents (Fig 26). Tandis que le pronucléus femelle possède déjà les marques typiques des PCTs des cellules somatiques : méthylation de l'ADN, H3K9m3, H3K27me, HP1bêta..., le pronucléus mâle est déficient en SUV39H et H3K9me3, et est dominé par la présence du complexe polycomb PRC1 et de H3K27me3, plus typique de l'hétérochromatine facultative (Puschendorf et al. 2008). Cette situation ne sera résolue véritablement qu'au stade 8 cellules. Ainsi les cellules souches embryonnaires double KO SUV39H1/2 -/- pourraient en partie récapituler cette chromatine du pronucléus mâle, puisqu'une forte présence d'H3K27me3 et de PRC2 est décrit aux péricentromères de ces cellules (Saksouk et al. 2014). Dans l'œuf fécondé, les péricentromères forment des anneaux autour des précurseurs des nucléoles. Au stade « 2 cellules » a alors lieu un pic de transcription des séquences satellites majeurs, d'abord du brin sens au niveau du génome paternel puis du brin anti-sens dans tout le noyau. L'expression des deux brins se trouve réprimée au stade 4 cellules, quand les chromocentres sont formés. Une interférence de la transcription de ces ARN au stade 2 cellules, empêche la formation des chromocentres et provoque un arrêt du développement (Probst et al. 2010), mettant certainement en exergue un rôle des ARN satellites dans la formation « de novo » de PCTs. De plus, un œuf fertilisé mutant pour la lysine 27 du variant H3.3 connaît le même arrêt du développement, ainsi qu'une délocalisation d'HP1bêta des péricentromères. Or de manière intéressante, l'injection d'un ARN satellite majeur double brin, mais non d'un simple brin reverse ces effets, suggérant de nouveau une possible fonction du RNAi aux PCTs (Santenard et al. 2010).

- 4 Régulation des ARNs et fonctions physiologiques

Les satellites majeurs sont transcrits par la RNA PolIII de façon cycle-dépendante. En effet, alors que chez *S.pombe*, la transcription des séquences péricentromériques a majoritairement lieu en phase S, chez la souris elle a principalement lieu en G1/S, où la taille des ARNs détectés se situe alors entre 200 et 800 nucléotides (nt). De façon inexplicée, au cours de la mitose, on observe une apparition d'ARN de 200 nt uniquement (Fig 27). De nombreuses études mettent en parallèle une décompaction des péricentromères et une surexpression des satellites majeurs, comme par exemple dans les cellules SUV39H 1/2 -/- (Peters et al. 2001). Ceci met en avant l'idée que la transcription des satellites soit uniquement régulée par la compaction de la chromatine aux PCTs. Néanmoins, le fait

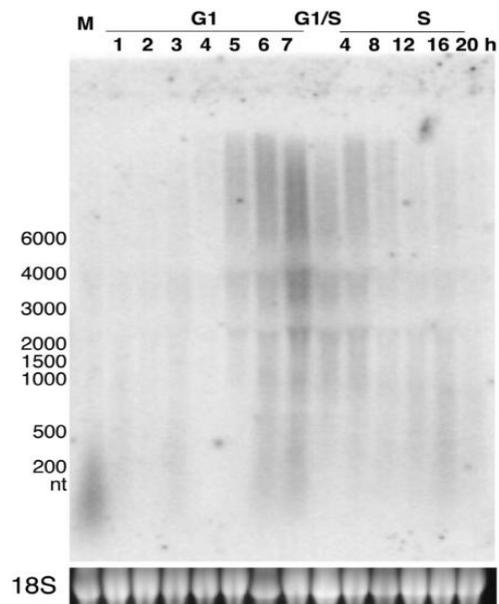


Figure 27 : L'expression des ARNs satellites majeurs au cours du cycle cellulaire chez la souris. Northern blot, réalisé avec une sonde contre les satellites majeurs, sur des cellules de souris, synchronisées dans le cycle. L'ARN ribosomique 18S est utilisé comme contrôle de charge. D'après (Lu and Gilbert 2007)

que les deux brins ne soient pas transcrits de manière équivalente laisse envisager une régulation plus spécifique. En effet, la détection des ces ARNs dans des cellules non synchronisées est très difficile, et dans des cellules Hela, seules les transcrits riches en G, correspondant au brin sens, sont détectés (Valgardsdottir et al. 2008). Une expression antisens est détectée dans le système nerveux central embryonnaire chez la souris au 11,5 dpc, remplacé par la suite par une expression sens. Dans des tissus adultes, les satellites ne sont détectés qu'en expression antisens dans les testicules et dans le foie (Eymery et al. 2009),(Saksouk et al. 2015). L'observation d'expression brin-spécifique dans différents contextes, comme par exemple décrit précédemment au cours du développement embryonnaire, appuie l'idée d'une régulation fine et éventuellement d'une implication physiologique. En effet, on observe un pic d'expression brin spécifique du satellite III du chromosome 1 au cours de la sénescence répliquative dans de cellules humaines. Les satellites III sont également fortement exprimés lors de différents stress, notamment lors d'un choc thermique, où ils semblent participer à la formation des NSBs (Nuclear stress bodies), et cette transcription est associée à la présence du facteur de transcription Hsf1 (Heat Shock factor 1) (Eymery et al. 2010). Effectivement, différents sites de liaison de facteurs de transcription ont été identifiés aux péricentromères de souris (Shestakova et al. 2004), notamment pour Pax3 et Pax9, les facteurs Pax étant des régulateurs développementaux (Bulut-Karslioglu et al. 2012). On observe également une surexpression des satellites majeurs au cours de la différenciation musculaire ou neuronale (Kishi et al. 2012),(Terranova et al. 2005), ou encore dans des échantillons de cellules tumorales vs des tissus sains (Eymery et al. 2009),(Ting et al. 2011).

- 5 Régulation commune entre péricentromères et séquences LINEs

Il existe certainement de nombreux liens encore sous-estimés de régulation entre les différentes structures hétérochromatiniennes. Un exemple intéressant en est, qu'*in vitro*, des ARN ribosomiques font compétition à la liaison du domaine Hinge d'HP1alpha aux ARN satellites majeurs (Muchardt et al. 2002). Parmi les liens qui existent entre ces diverses structures, celle qui nous intéressera ici est la régulation commune entre la transcription des séquences péricentromériques et des séquences LINEs. Tout d'abord, il est à noter que chez la levure *S.pombe*, les séquences péricentromériques pourraient résulter d'une très ancienne incorporation de rétrotransposons (Schramke and Allshire 2004). De manière générale les rétrotransposons semblent évolutivement liés aux zones de séquences répétées du génome. Par exemple, chez la drosophile, où la télomérase est absente, les

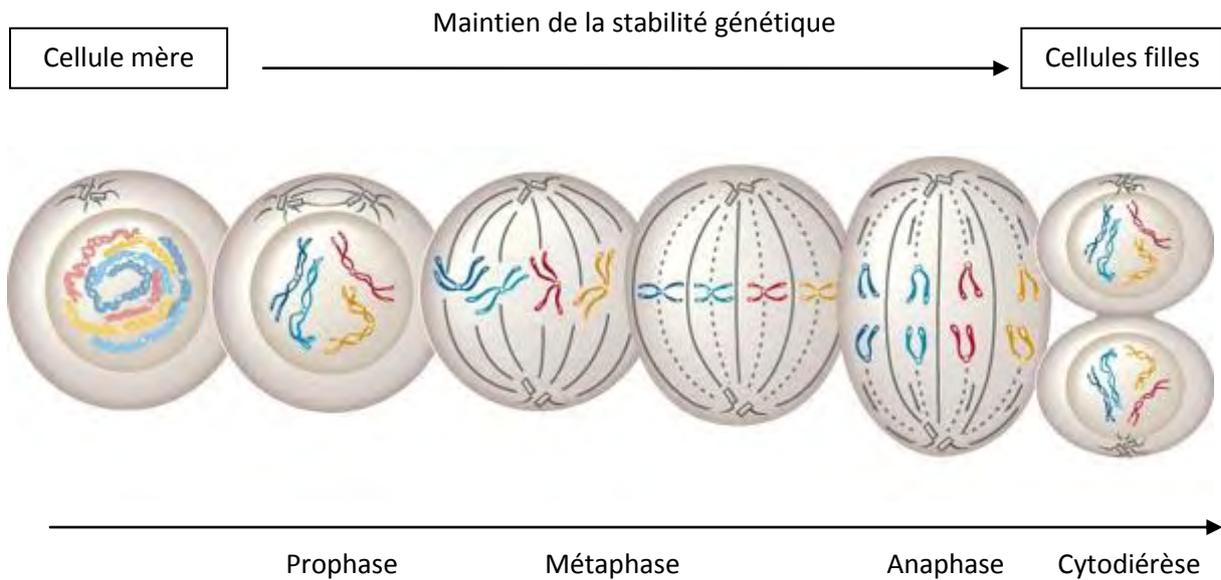


Figure 28 : Schéma simplifié d'une mitose. Une « cellule mère » subit une répartition équitable de son ADN précédemment répliqué pour donner deux « cellules filles » identiques. Le déroulement correct de la mitose assure le maintien de la stabilité génétique de la « cellule mère » aux « cellules filles ». Modifié d'après <http://www.larousse.fr/encyclopedie>.

extrémités des chromosomes sont protégées par des rétrotransposons. Chez la souris, les séquences LINEs semblent clairement posséder un mécanisme de régulation commun avec l'hétérochromatine péricentromérique. En 2011, Ting *et al.* observent une surexpression des transcrits satellites majeurs dans certaines tumeurs épithéliales. Ils y identifient les LINE-1 comme les principaux transcrits dérégulés de façon corrélée avec les transcrits des satellites majeurs, suggérant une régulation commune (Ting *et al.* 2011). En 2014, il est montré que les séquences LINEs sont enrichies en SUV39H et H3K9me3 à leurs promoteurs, et que leur transcription est dérégulée dans des cellules souches embryonnaires SUV39H $\frac{1}{2}$ *-/-* (Bulut-Karslioglu *et al.* 2014), comme c'est le cas pour les satellites majeurs. De plus, l'injection d'oligonucléotides antisens des LINEs dans le pronucléus mâle dans le zygote de la souris, tout comme une inhibition pharmacologique de la rétro-transcription de l'ARN, provoque un arrêt irréversible du développement au stade « 2 cellules » (Sciamanna *et al.* 2011). Il est intéressant de rappeler qu'un arrêt du développement est également observé par interférence avec les transcrits satellites majeurs au même stade (Probst *et al.* 2010). Le fait qu'il existe dans les cellules humaines une régulation des séquences LINEs par RNAi (Yang and Kazazian 2006), repose alors la question d'une telle similarité dans les péricentromères, étant donné leur régulation commune.

D Les péricentromères et la ségrégation des chromosomes

- **1 La mitose**

Le rôle physiologique majeur des PCTs reste leur implication dans la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire. Toutes les cellules prolifératives progressent dans un cycle cellulaire (Fig2). La division de la cellule, pour donner deux cellules filles identiques, a lieu durant la phase M ou mitose (Fig 28). Elle implique que l'ADN génomique ait été totalement répliqué en phase S ou phase de réplication, et que la cellule ait passé différents points de contrôle ou « check-points », vérifiant notamment l'intégrité de l'ADN. La mitose est une phase critique, puisque des anomalies de répartition des chromosomes au moment de la division conduit à des cellules filles aneuploïdes, c'est à dire contenant une quantité erronée d'ADN, par défaut de chromosomes ou par excès. Il existe donc des checks-point mitotiques, visant à empêcher de telles erreurs. Ce phénomène d'aneuploidie est largement retrouvé dans les cancers. La mitose se décompose en plusieurs phases. Lors de la prophase, les chromosomes issus de la réplication et donc possédant deux chromatides identiques se condensent. En prométaphase et métaphase, ils se positionnent sur la plaque métaphasique et s'attachent aux microtubules au niveau de leur centromère, par l'intermédiaire de complexes

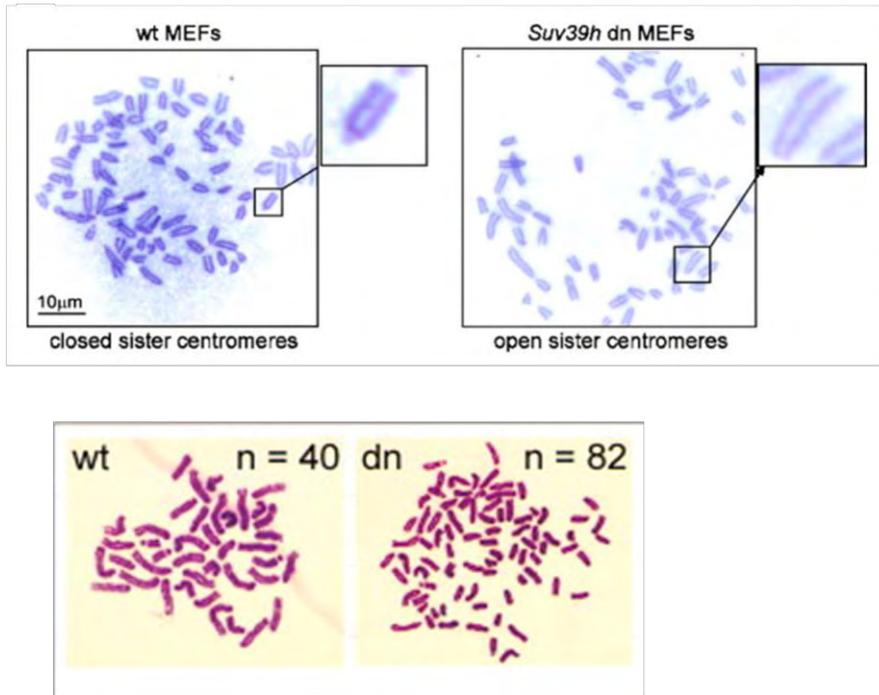


Figure 29 : Défauts mitotiques des MEFs *SUV39H* ½ -/-. L'écart entre les péricentromères augmente entre deux chromatides sœurs et les cellules présentent des caryotypes avec doublement du nombre de chromosomes. D'après (Koch et al. 2008) et (Peters et al. 2001).

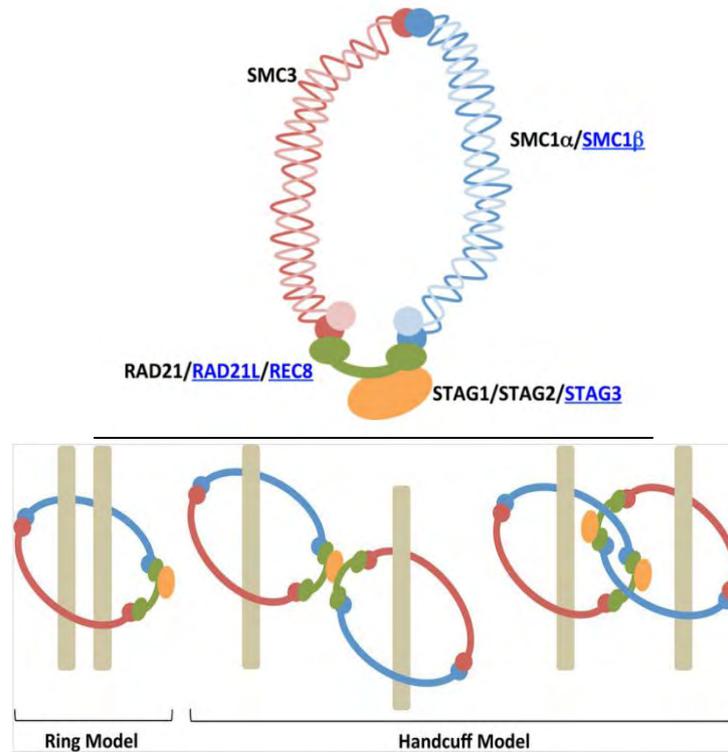


Figure 30 : Schéma d'un complexe cohésine et des différents modèles topologiques du mécanisme de cohésion. D'après (Brooker and Berkowitz 2014)

protéiques, les kinétochores. Même si les étapes précédentes sont décisives pour son déroulement correct, c'est lors de l'anaphase qu'a lieu la ségrégation des chromosomes à proprement parler, c'est-à-dire que les microtubules vont tirer chaque lot de chromosomes de part et d'autre de la cellule. La télophase et la cytotélorèse vont achever cette migration et permettre la formation des deux cellules filles, notamment par la reformation de l'enveloppe nucléaire autour des lots de chromosomes issus de la ségrégation, enveloppe qui avait été rompue en proméphase.

- **2 Rôle des péricentromères**

Les péricentromères jouent un rôle dans le contrôle de la ségrégation. En effet, chez la souris, les cellules SUV39H $\frac{1}{2}$ $-/-$ présentent un écartement anormal des péricentromères des chromatides sœurs en mitose (Fig 29) (Koch et al. 2008). Ces cellules présentent également des caryotypes tétraploïdes, c'est-à-dire une multiplication du génome dans son intégralité, comme si l'anomalie de ségrégation avait touché le lot entier de chromosomes (Peters et al. 2001). Ce défaut pourrait résulter d'une anomalie de métaphase ou de cytotélorèse. La ségrégation correcte des chromosomes dépend de l'attachement correct des microtubules et du bon fonctionnement de ces derniers. Mais il dépend aussi de la cohésion des chromatides sœurs qui, jusqu'au dernier moment, va permettre d'exercer des forces de résistance aux microtubules, générant une tension qui sert de signal attestant que les chromosomes sont correctement attachés à ces derniers. Cette cohésion est principalement médiée par des complexes protéiques, les cohésines, qui forment des anneaux encadrant topologiquement les deux chromatides issues de la réplication (Fig 30). Au cours de la mitose, des protéines appelées séparases vont provoquer le clivage des cohésines. Les péricentromères seront temporellement les derniers à perdre leur cohésion, puisque les cohésines y sont protégés des séparases par des protéines de la famille des Shugoshins, jusqu'à l'anaphase (Marston 2015). Moléculairement, le recrutement des cohésines au niveau des péricentromères est discuté. Chez *S.pombe*, des cohésines peuvent être co-immunoprécipitées avec Swi6 (orthologue de HP1), et un mutant pour ce dernier connaît des défauts de ségrégation et une perte de recrutement de cohésines. Chez la souris, les cellules doubles KO pour SUV39H $\frac{1}{2}$ présentent des défauts d'enrichissement en cohésines aux péricentromères, ainsi que des défauts de ségrégation des chromosomes. Mais c'est également le cas des cellules doubles KO pour SUV4-20h $\frac{1}{2}$ qui n'ont pourtant pas perdu l'enrichissement d'HP1 à l'hétérochromatine. En effet, SUV4-20h2 semble être plus stablement recrutée aux péricentromères qu'HP1, et interagit avec deux sous-unités du complexe des cohésines, alors qu'une interaction HP1-cohésines chez les mammifères n'a à ma connaissance pas été montrée (Hahn et al. 2013). Le lien entre les protéines HP1 et le recrutement des cohésines chez l'homme est quand à lui encore discuté, même si une délocalisation d'HP1 des

péricentromères provoque des défauts de ségrégation correcte des chromosomes et de l'instabilité génétique (Serrano et al. 2009) (Shimura et al. 2011).

Acétylation d'histone et hétérochromatine

J'ai présenté dans la première partie de cette introduction les acétylations d'histones, qui participent à la décompaction de la chromatine. Dans la deuxième partie J'ai présenté la notion d'hétérochromatine comme une structure compactée, et par conséquent hypoacétylée sur ses histones et riche en HDACs. En troisième partie, les péricentromères sont venus illustrer cette notion, puisque leur structure moléculaire présente effectivement ces caractéristiques. Néanmoins, il semble que leur transcription soit nécessaire à leur propre maintien. Cette nécessité transcriptionnelle révèle une plasticité dans la compaction, qui remet en question la notion d'hypoacétylation absolue dans les structures hétérochromatiniennes. Nous verrons des exemples d'acétylation d'histones dans des structures hétérochromatiniennes qui viendront appuyer cette notion de besoin de plasticité médiée par l'acétylation. Mais nous verrons également qu'il existe un lien entre acétylation et compaction notamment via les protéines à double bromodomaines.

A L'acétylation d'H3K4 et péricentromères

Cette modification a été identifiée par spectrométrie de masse en 2007 chez la souris et l'humain (Garcia et al. 2007). Elle a été depuis détectée chez *S. cerevisiae* et *S.pombe* (Guillemette et al. 2011), (Xhemalce and Kouzarides 2009). Cette marque a été corrélée à l'activation de la transcription chez l'humain par sa présence au niveau de promoteurs de gènes actifs (Wang et al. 2008). Chez *S.cerevisiae*, la même conclusion a été établie à la fois par cette présence au niveau de tels promoteurs, et par le croisement d'analyses à grandes échelles d'expression transcriptionnelle chez des souches mutées pour cette lysine ou différentes enzymes. A noter que la méthylation d'H3K4 est largement impliquée dans l'activation transcriptionnelle dans l'ensemble de ces modèles. Le fait que l'acétylation et la méthylation du même résidu aient tous deux un effet d'activateur transcriptionnel est assez étonnant. Néanmoins, chez *S.cerevisiae*, comme chez l'humain, H3K4ac est retrouvée en amont de H3K4me3 au niveau des promoteurs, et chez *S.cerevisiae*, alors que tous les promoteurs présentant H3K4ac présentent H3K4me3, l'inverse n'est pas vrai. La relation entre ces deux marques n'est donc pas claire. Xhemalce *et al.* décrivent chez la levure *S.pombe*, la présence d'H3K4ac au niveau de l'hétérochromatine des péricentromères en fin de phase S. Dans cette étude, les auteurs suggèrent qu'H3K4ac facilite l'éviction de Chp1, et donc du complexe RITS, en affectant sa liaison au

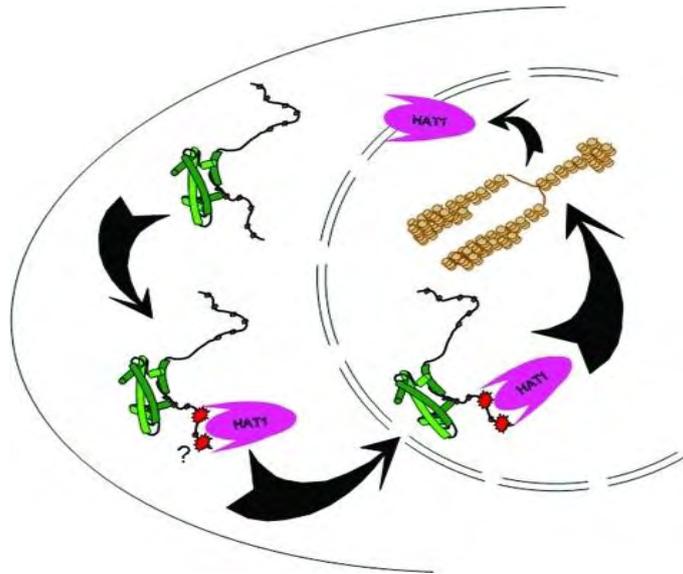


Figure 31 : Modèle proposé (Ejlassi-Lassalette et al. 2011) du rôle de HAT1 dans l'apport du dimère H3/H4 à la fourche de réplication. Au cours de la phase S, les dimères d'histones H3/H4 nouvellement synthétisés s'associent avec HAT1 dans le cytoplasme, où H4 est acétylé sur la lysine 12. De manière concomitante à la réplication, le complexe HAT1/H3/H4 est transféré dans le noyau et se localise à proximité de la chromatine en cours de réplication pour fournir les dimères H3/H4.

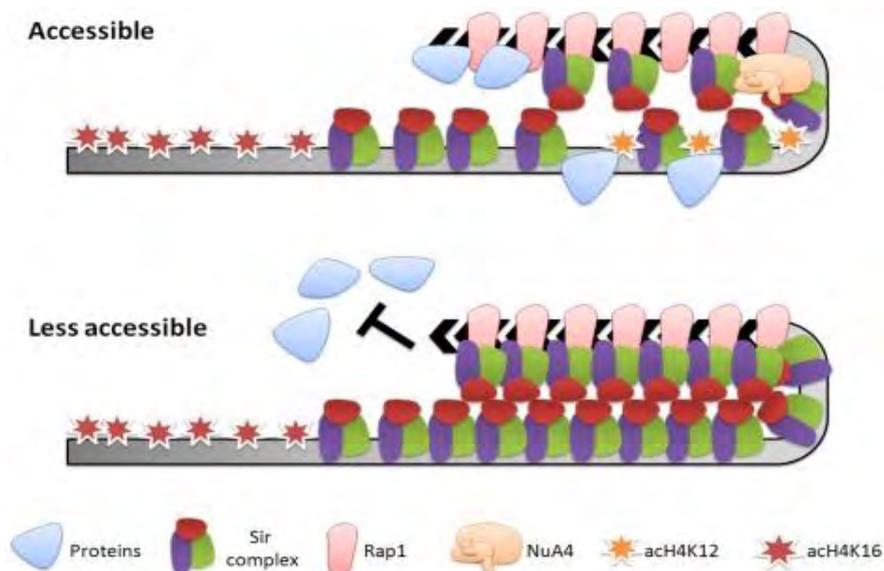


Figure 32 : Modèle proposé par (Zhou et al. 2011), du rôle d'H4K12ac sur le recrutement des complexes Sir dans l'hétérochromatine télomérique de *S.cerevisiae*. L'hétérochromatine télomérique est enrichie en H4K12ac, permettant l'accessibilité de la chromatine aux protéines, comme la télomérase. Lorsque cette acétylation est éliminée chez un mutant H4R12, les complexes Sir sont fortement enrichis aux télomères, et la chromatine n'est plus accessible.

résidu H3K9me2. Cette éviction faciliterait le recrutement des protéines Swi6 et Chp2 lors de la reformation de l'hétérochromatine en fin de réplication.

B L'acétylation d'H4K12 et plasticité de l'hétérochromatine

• 1 L'acétylation d'H4K12

H4K12ac peut être mise en place dans le noyau par des HATs de type A, mais également mise en place par HAT1, soit une HAT de type B, dans le cytoplasme sur les histones nouvellement synthétisées. En effet, le motif de di-acétylation des lysines 5 et 12 de l'histone H4 mis en place dans le cytoplasme se retrouve de manière conservé chez les eucaryotes (Parthun 2011), et semble être nécessaire à l'import nucléaire des histones nouvellement synthétisées (Fig 31) (Ejlassi-Lassalette et al.), (Alvarez et al. 2011). De plus, les lysines 5 et 12 de l'histone H4 et la lysine 56 de l'histone H3, participeraient à l'incorporation même des histones dans la chromatine, aux sites de cassures de l'ADN (Chen et al. 2008), (Ge et al. 2013). De manière générale, H4K12ac est une acétylation qui semble se comporter de manière indépendante des autres acétylations de l'extrémité N-terminale de l'histone H4. On la retrouve par exemple impliquée de manière très spécifique par rapport aux autres acétylations d'H4 dans des processus cognitifs, comme dans le contrôle de l'expression de gènes liés à la mémorisation dans l'hippocampe, ou encore dans des phénotypes émotionnels associés au comportement maternel (Peleg et al. 2010), (Schmauss et al. 2014).

• 2 H4K12ac et hétérochromatine

L'acétylation d'H4K12 se retrouve à plusieurs reprises associée à des structures hétérochromatiniennes. L'hétérochromatine des télomères de la levure *S. cerevisiae* est maintenue par la présence des histones déacétylases Sir, qui assurent un état hypoacétylé des histones. Néanmoins en 2011, Zhou *et al.* décrivent la présence d'H4K12ac au niveau de ces télomères. Un mutant H4R12, présentant une arginine à la position de la lysine 12, présente un sur-enrichissement en protéines Sir aux télomères lorsque comparé à une souche sauvage, ainsi qu'une diminution de la présence de la télomérase et un raccourcissement des télomères. Les auteurs proposent un modèle où H4K12ac empêche une présence trop importante des protéines Sir aux télomères, maintenant une plasticité qui est nécessaire à l'accès de la télomérase, et surtout à un maintien basal du niveau de transcription (Fig 32) (Zhou et al. 2011). Ainsi cette acétylation semble amener à l'hétérochromatine télomérique une plasticité nécessaire au maintien de la structure.

	NIH3T3	MEFs SUV39H 1/2 -/-	NIH3T3 + 5azacytidine
méthylation de l'ADN	Intermédiaire	Intermédiaire	Absent
H3K9me3	Enrichi	Absent	Enrichi
H3K4me2	Absent	Absent	Enrichi
H4K12ac	Absent	Enrichi	Enrichi
HP1 alpha	Enrichi	Absent	Enrichi
H3K4me3	Absent	Absent	Absent
H3K9ac	Absent	Absent	Absent
H3K27me3	Absent	Absent	Absent

Figure 33 : H4K12ac dans les péricentromères de souris. Récapitulatif proposé par (Boyarchuk et al. 2014), des principaux éléments de la structure chromatinienne des péricentromères de cellules NIH3T3, MEFs SUV39H 1/2 -/-, et des NIH3T3 traitées à la 5-azacytidine. Modifié d'après (Boyarchuk et al. 2014).

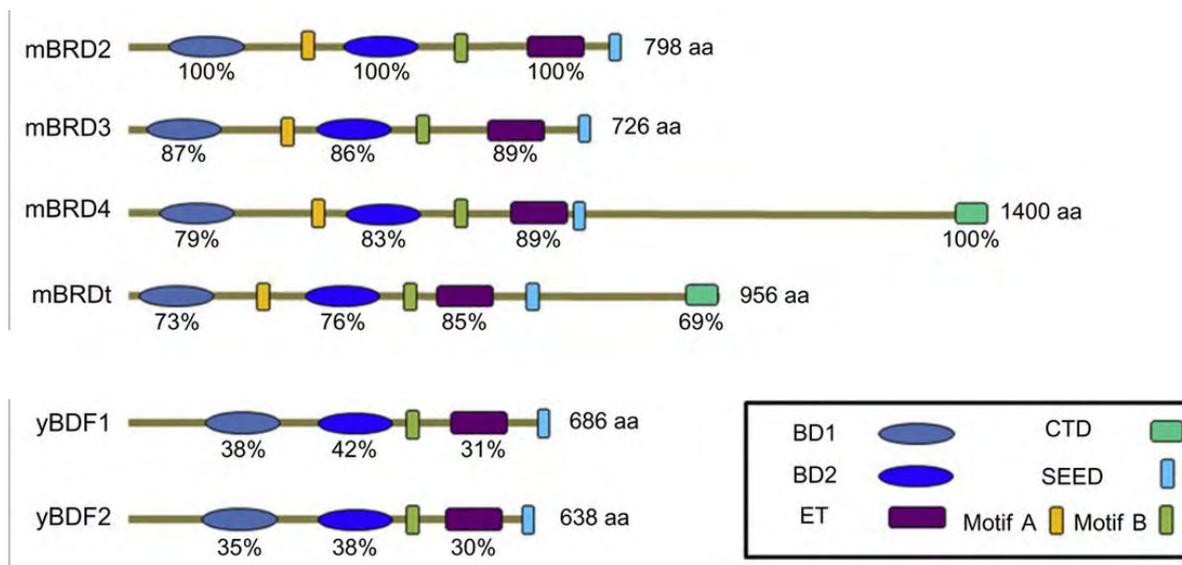


Figure 34 : La famille des protéines BETs chez *S.cerevisiae* et chez la souris. Les pourcentages d'identités sont indiqués en comparaison à BRD2 pour les domaines BD1, BD2 et ET, et en comparaison à BRD4 pour le domaine CTD. Modifié d'après (Berkovits and Wolgemuth 2013)

H4K12ac est également présente au niveau des cassettes de déterminisme sexuel HML et HMR, hétérochromatinisées chez *S.cerevisiae*. Ce n'est pas le cas des autres lysines de l'extrémité N-terminale de l'histone H4, K5, K8 et K16 (Braunstein et al. 1996). H4K12ac a aussi été détectée au niveau des péricentromères des chromosomes polytènes de drosophile (Turner et al. 1992), ainsi qu'au niveau de l'unique chromocentre dans le spermatide en élongation au cours de la spermatogenèse chez la souris, avec H4K8ac (van der Heijden et al. 2006). Une anomalie de dé-acétylation d'H4K12 lors de la méiose est observée dans des oocytes âgés, menant à des défauts de ségrégation (van den Berg et al. 2011). H4K12ac est également enrichie dans l'hétérochromatine des péricentromères chez la souris, lorsque celle-ci est altérée (mais néanmoins toujours présente), comme c'est le cas dans les MEFs SUV39H $\frac{1}{2}$ $-/-$, ou lors d'un traitement de fibroblastes de souris à la 5-azacitidine (Fig 33) (Peters et al. 2001),(Boyarchuk et al. 2014).

Ces deux cas particuliers d'acétylation d'histones, H3K4ac et H4K12ac, constituent un exemple de la complexité résidu-dépendante des modifications d'histones. Ces acétylations semblent apporter dans ces structures hétérochromatiniennes une plasticité. Que ce soit, comme pour H4K12ac, en empêchant un trop fort recrutement d'HDACs, ou en permettant un niveau basal de transcription aux télomères, ou dans le cas d'H3K4ac, en apportant une régulation fine de la compaction. La mécanistique du rôle des acétylations d'histone dans les phénomènes de compaction de la chromatine est encore énigmatique, mais pourrait reposer sur leur association avec des protéines à double bromodomaines.

C Compaction et protéines à double bromodomaines

- **1 les protéines BETs**

Il existe 46 protéines contenant des bromodomaines capables de reconnaître les lysines acétylées, certaines protéines possédant de multiples bromodomaines (Filippakopoulos et al. 2012). La famille des protéines BETs (Bromodomain and Extra-terminal) se caractérise par la présence de deux bromodomaines (BD1 et BD2) dans leur partie N-terminale, et d'un domaine extra-terminal (ET) spécifique de cette famille, dans leur partie C-terminale. Le domaine ET est considéré comme un domaine d'interaction protéine-protéine, mais ses fonctions restent mal connues (Lin et al. 2008). Il existe deux protéines BETs chez la levure *S.cerevisiae*, Bdf1 et Bdf2, et 4 chez les mammifères, BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT (Fig 34). BRD4 et BRDT se distinguent par la présence supplémentaire d'un motif C-terminal (CTM). Les protéines BETs sont largement associées à l'activation transcriptionnelle

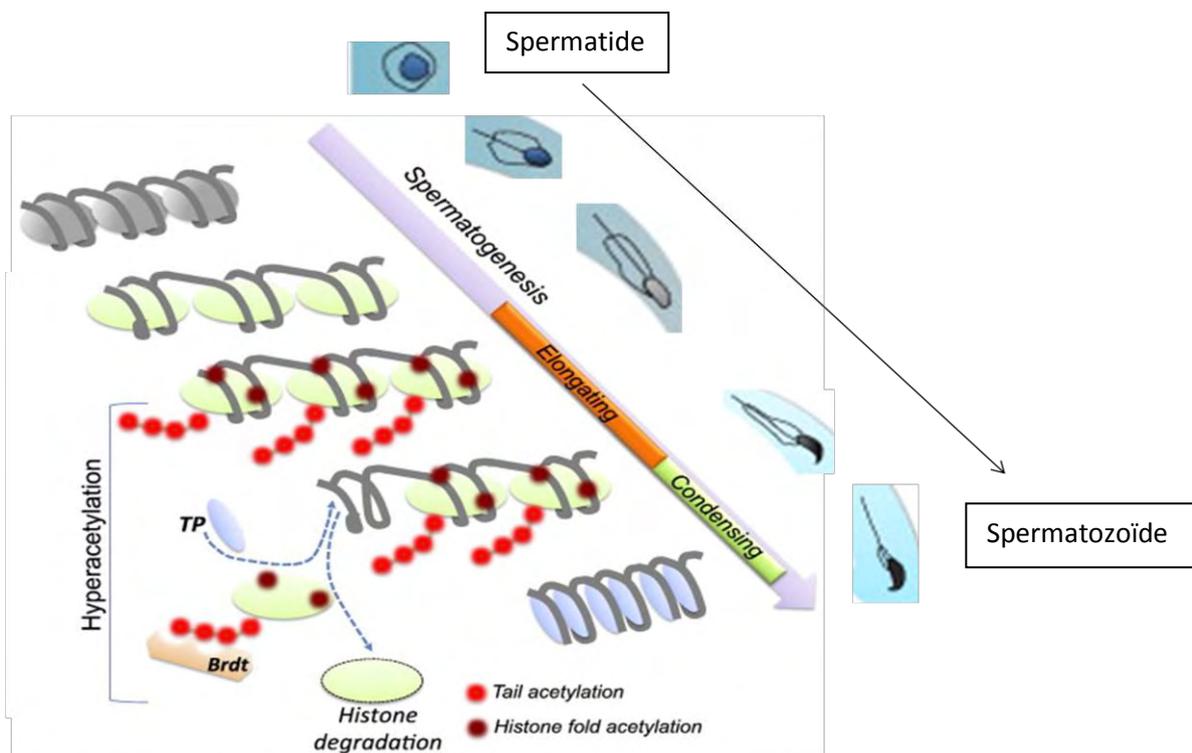


Figure 35 : Modèle de travail de l'échange histones-PTs au cours de la spermatogénèse. L'acétylation de sites critiques tels que H3K122 ou H3K64 déstabilisent le nucléosome, tandis que l'acétylation de l'extrémité N-terminale de l'histone H4 permet le recrutement de BRDT qui peut commencer le processus d'éviction et de remplacement des histones. Les histones acétylées sont alors dégradées via entre autre l'action du spermatoprotéasome. Modifié d'après (Goudarzi et al. 2014)

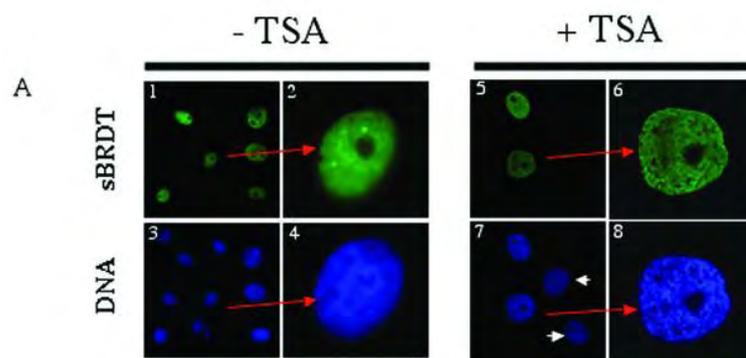


Figure 36 : Compaction de la chromatine médiée par la protéine BRDT, en contexte d'hyperacétylation. Des cellules de primates sont traitées ou non à la TSA, avec en parallèle une surexpression par ajout d'un plasmide, de la protéine BRDT pleine taille taguée (S-BRDT). Le marquage vert permet de suivre l'expression de la protéine surexprimée, et le marquage au DAPI permet de visualiser l'ADN. Les images à faibles grossissements permettent de voir des cellules non transfectées, qui montrent que le seul traitement à a TSA n'induit pas la compaction. D'après (Pivot-Pajot et al. 2003).

(voir à l'élongation de la transcription pour BRD4 et BRDT), et surtout à la régulation de cycle cellulaire (Wang and Filippakopoulos 2015),(Belkina and Denis 2012). Des translocations chromosomiques des gènes *BRD4* et *BRD3* sont impliqués dans des cancers, et différents inhibiteurs des protéines BETs sont en phase d'essais cliniques (Wang and Filippakopoulos 2015). BRD2 comme BRD4 sont essentielles au développement embryonnaire et le KO de l'un ou l'autre est létale chez la souris (Shang et al. 2009),(Houzelstein et al. 2002).

- **2 Modulation de la compaction de la chromatine par les protéines BETs**

- a BRDT dans la spermatogenèse

BRDT est spécifiquement exprimée dans les testicules, bien qu'un groupe ait détecté une faible expression dans le cerveau (Shang et al. 2004). Le domaine BD1 de BRDT reconnaît l'histone H4 simultanément acétylée sur K5 et K8 (Moriniere et al. 2009), ce qui est considéré comme un indicateur de l'acétylation globale de la queue N-terminale de l'histone H4 (Goudarzi et al. 2014). Au cours du processus de spermatogenèse, des cellules progénitrices (les spermatogonies) subissent une différenciation, donnant des spermatocytes, qui vont rentrer en méiose pour donner des cellules haploïdes, les spermatides, qui subiront ensuite une série de transformations pour donner le spermatozoïde. Ce dernier possède une compaction de l'ADN très particulière, puisque lors de la spermatogenèse, les histones se voient remplacées par des protéines de transition (PTs) puis par des protamines, pour former une chromatine hautement compactée, bien que la contribution des protamines à ce haut degré de compaction soit encore mal comprise. Ce processus constitue un remaniement drastique de la chromatine, faisant de la spermatogenèse un modèle d'étude particulièrement intéressant (Fig 35). Or, une vague d'acétylation massive de l'histone H4 survient lors de l'élongation des spermatides, au moment de cet échange histone-PTs, acétylation qui est nécessaire à cet échange (Oliva et al. 1987),(Lu et al. 2010),(Goudarzi et al. 2014). Néanmoins, le mécanisme moléculaire qui sous-tend cet échange et la compaction qui s'en suit est resté assez énigmatique. En 2003, il est observé qu'un traitement à la TSA, et donc une hyper-acétylation des histones, associée à une surexpression de la protéine BRDT, conduit à une compaction globale de la chromatine dans des cellules de mammifères (Fig 36) (Pivot-Pajot et al. 2003). Les deux bromodomains ainsi que leurs régions flanquantes sont nécessaires à cette compaction médiée par la TSA. La liaison de ces deux bromodomains aux lysines acétylées suivie d'interactions BRDT-BRDT pourrait être à la base de ce phénomène de compaction par l'acétylation, en rapprochant les nucléosomes adjacents. Ainsi, la protéine BRDT pourrait faire le lien entre cette vague d'acétylation et ce remodelage chromatinienn, amenant un premier lien entre protéine à double bromodomains et compaction chromatinienn. En effet, les souris mutantes pour le domaine 1 de BRDT, présentent

des défauts de spermatogénèse, qui semblent coïncider avec le moment de cet échange d'histone (Shang et al. 2007), et ces souris échouent dans l'échange histones-PTs (Gaucher et al. 2012). Un modèle peut être posé, où cette vague d'acétylation de l'histone H4, serait reconnue par BRDT, qui entrainerait la compaction de la chromatine, menant à l'échange histones-PTs, par un mécanisme encore mal compris. L'acétylation des histones sur les lysines du domaine globulaire permettrait ensuite le ciblage des histones au protéasome pour leur dégradation une fois retirées de la chromatine (Qian et al. 2013).

Alors que l'acétylation des histones disparaît dans la quasi-totalité du génome à la suite de l'échange histones-protamines, elle persiste au niveau de la chromatine péricentromérique, où on observe l'acétylation d'H4 sur K12 et K8 (van der Heijden et al. 2006). Or, en modulant le fond génétique dans des souris mutantes pour le domaine BD1 de BRDT, une équipe révèle une anomalie de formation de l'unique chromocentre qui se forme normalement au premier stade du spermatide, avec une localisation de BRDT qui suggère qu'il joue un rôle de barrière entre le péricentromère et le reste de la chromatine (Berkovits and Wolgemuth 2011). Ce rôle des protéines à double bromodomaines dans la barrière hétérochromatine/euchromatine, se retrouve chez *S.cerevisiae*, où BDF1 permet la barrière hétérochromatine/euchromatine au niveau des télomères ainsi qu'au niveau du locus Mat (Ladurner et al. 2003).

- b BRD2/4 et compaction de la chromatine

Le domaine BD1 de BRD2 se lie en dimère à H4K12ac (Umehara et al. 2009), alors que le domaine BD2 se lie à H4 acétylé simultanément sur K5 et K12 (Umehara et al. 2010). BRD4 se lie *in vitro* à des peptides di-acétylés sur H4K5 et H4K12 (Dey et al. 2003). La présence de BRD2 et BRD4 persiste sur les chromosomes mitotiques, et donc fortement compactés, dans des cellules humaines (Kanno et al. 2004),(Dey et al. 2009). En effet alors que les chromosomes métaphasiques se retrouvent globalement hypo-acétylés, il y reste un niveau significatif de H4K5ac et H4K12ac. On voit ici apparaître un lien entre protéines à double bromodomaines, compaction chromatinienne, et H4K12ac *via* les protéines BRD2 et BRD4. En 2012, une étude rapporte que l'utilisation d'ARN interférence contre BRD4 dans des cellules humaines, conduit à une décompaction globale de la chromatine, faisant un nouveau lien entre acétylation d'histones et compaction, *via* une protéine à double bromodomaines (Wang et al. 2012). En revanche la surexpression d'un dominant négatif de BRD4 muté pour le domaine CTD entraîne une fragmentation de la chromatine. En 2013, une autre étude rapporte l'effet du siRNA BRD4 sur la compaction globale de la chromatine, mais uniquement lors du ciblage d'une isoforme délétée pour la partie CTD. En effet, dans cette étude, l'utilisation d'un siRNA contre l'isoforme pleine taille n'a pas d'effet (Floyd et al. 2013). Or, lors des expériences de

surexpression de BRDT avec traitement à la TSA par pivot-pajot *et al.*, la surexpression d'une forme de BRDT tronquée pour sa partie C-terminale entraînait une compaction de la chromatine plus marquée qu'avec la forme pleine taille (cette dernière étant la plus exprimée au niveau ARNm dans les gonades) (Pivot-Pajot et al. 2003). En 2013, une équipe montre le rôle d'une isoforme de BRD4 tronquée pour le domaine CTD dans l'insulation des sites de cassures de l'ADN et par conséquent la régulation de la signalisation des dommages. Les condensines sont des complexes moléculaires, assez proches structurellement des complexes cohésines, qui permettent la structuration des chromosomes mitotiques et interphasiques. Cette insulation est médiée par le recrutement de condensines par la protéine BRD4, empêchant la formation d'ilôt gammaH2AX, une modification d'un variant d'histone nécessaire à la signalisation des dommages (Floyd et al. 2013). Ainsi, alors que toutes ces données appuient une connexion entre protéines BETs et compaction de la chromatine, le domaine CTD présent chez BRD4 et BRDT semble plutôt antagoniste à cette fonction.

TIP60 et hétérochromatine

Ce rôle des acétylations d'histones, et des protéines BETs dans des structures hétérochromatiniennes sous-entend l'implication d'enzymes les mettant en place dans ces structures, et donc l'implication de HATs dans des structures hétérochromatiniennes.

A Esa1/Mst1/TIP60 et hétérochromatine

Aux péricentromères de *S.pombe*, H3K4ac est mise en place par l'acétyltransférase Mst1. H4K12ac est quand à elle mise en place par la HAT Esa1 au niveau des télomères de *S.cerevisiae*. Ce sont donc deux HATs ayant des rôles décrits dans des structures hétérochromatiniennes. Un mutant thermosensible pour Esa1 présente une augmentation de la transcription des séquences télomériques, mais aussi des ARN ribosomiques, deux structures hétérochromatinisées chez *S.cerevisiae* (Clarke et al. 2006). De plus, au-delà de son rôle sur l'acétylation d'H4K12, Esa1 participe également à l'acétylation du variant H2Az au télomère de *S.cerevisiae*. En effet, H2AZac maintient la barrière entre l'hétérochromatine télomérique et l'euchromatine adjacente, et le mutant Esa1 présente une diminution d'expression des gènes à proximité des télomères (Babiarz et al. 2006). Finalement chez *S.pombe*, une souche mutante conditionnelle pour Mst1, présente un défaut de compaction des régions péricentromériques (Xhemalce and Kouzarides 2009). Dans une autre étude, le mutant diploïde hétérozygote pour Mst1 présente des défauts de ségrégation chromosomique, pouvant éventuellement résulter de ce défaut de compaction (Gomez et al. 2008). Dans cette même étude, la combinaison d'un mutant thermosensible Mst1 avec des mutants pour Clr4, Clr3 ou Swi6, c'est-à-dire des composantes de l'hétérochromatine péricentromérique, révèle une interaction génétique entre Mst1 et ces protéines, puisque le taux de croissance de ces souches est inférieur à celui des souches parentales séparément. Mst1 et Esa1 sont toutes deux des orthologues de la même protéine chez les mammifères : TIP60.

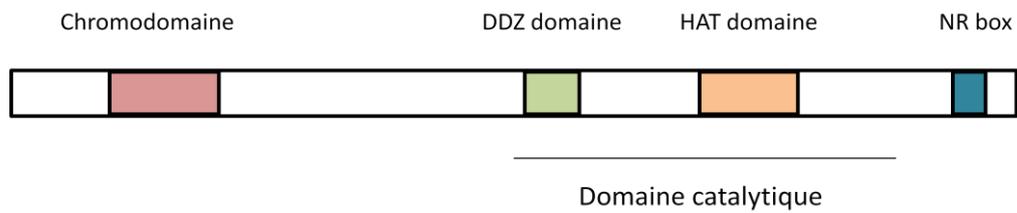
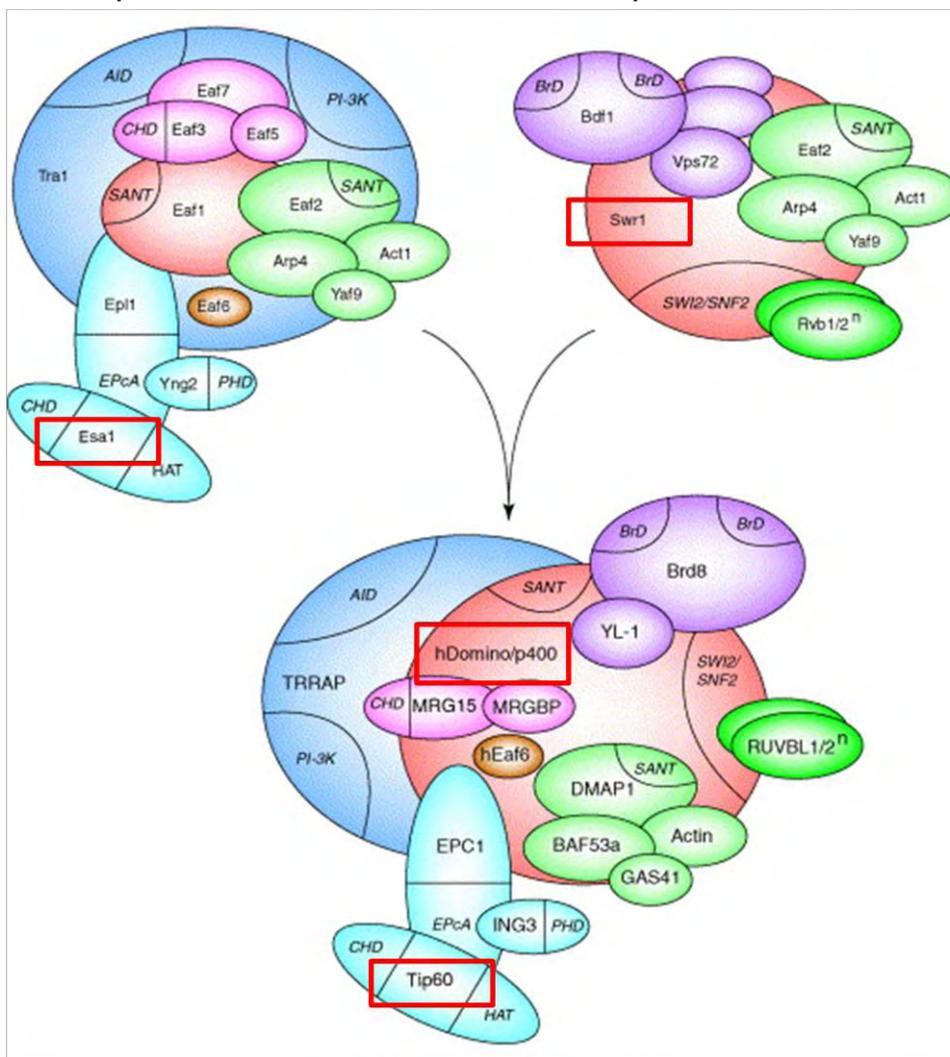


Figure 37 : Structure de la protéine TIP60. DDZ : Doigt de zinc. NR box : Domaine de liaison aux récepteurs nucléaires.

Complexe Nua4 de levure + Complexe SWR1 de levure



Complexe Tip60 humain

Figure 38 : Le complexe TIP60 humain est issu de la fusion des complexes Nua4, et SWR1 de la levure *S.cerevisiae*. Modifié d'après (Doyon and Côté 2004)

B L'acétyltransférase TIP60

- **1 Structure et activité**

En 2007, une nouvelle nomenclature des enzymes de modification de la chromatine renomme TIP60 « KAT5 », néanmoins je garderai la dénomination de TIP60 dans cette thèse dans un soucis de clarté (Allis et al. 2007). L'acétyltransférase TIP60 (TAT Interactive Proteine 60 KDa) a été isolée en 1996, comme interagissant avec le virus HIV humain (Kamine et al. 1996). Deux ans plus tard, une étude *in vitro* révèle son activité enzymatique d'acétyltransférase sur des histones purifiées, avec comme principales cibles les lysines 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4, la lysine 5 de l'histone H2A, et la lysine 14 de l'histone H3 (Kimura and Horikoshi 1998). En 2013, une étude souligne que TIP60 semble acétyler H2Az *in vivo* (Dalvai et al. 2013), comme c'est le cas pour Esa1 chez *S. cerevisiae*. TIP60 possède également un certain nombre de cibles non-histones, les plus connues étant le facteur de transcription p53, la kinase ATM, ou encore le récepteur Notch (Sapountzi et al. 2006). Il existe plus d'une quinzaine de HATs différentes chez l'humain et TIP60 fait partie de la famille des MYSTs, très conservée de la levure à l'homme, dont le nom est issu des membres fondateurs de la famille Moz, Ybf2/Sas3, sas2, TIP60. Chez les mammifères il existe 5 membres dans cette famille, qui ont en commun un domaine catalytique Myst, conservé à plus de 95% entre ces membres, contenant un domaine acétyltransférase et un domaine à doigt de zinc (Fig 37). TIP60 constitue un sous-groupe avec l'acétyltransférase Mof, notamment car elles possèdent toutes deux un chromodomaine (Thomas and Voss 2007). Il est à noter que, chez la drosophile, le chromodomaine de l'orthologue de Mof a une capacité de liaison à l'ARN (Akhtar et al. 2000).

- **2 Le complexe TIP60**

TIP60 semble agir au sein d'un complexe protéique stable, classiquement au sein du complexe TIP60 qui contient une vingtaine de protéines. En effet, c'est uniquement au sein de son complexe que TIP60 est capable d'acétyler *in vitro* des histones dans un contexte nucléosomal (Ikura et al. 2000). Chez la drosophile, ainsi que chez les mammifères, le complexe TIP60 est issu de la fusion de deux complexes de levure *S.cerevisiae*, le complexe HAT Nua4 contenant Esa1, et le complexe SWR1 contenant une ATPase (Fig 38). Ainsi le complexe TIP60 de mammifère contient à la fois une activité de modification d'histones via TIP60, et de remodelage de la chromatine via l'ATPase P400. Cette dernière catalyse entre autre l'incorporation du variant d'histone H2Az dans la chromatine. *In vitro*, l'acétylation d'H2A ou d'H4 par la complexe Nua4 facilite l'incorporation d'H2Az par Swr1 dans la chromatine (Altaf et al. 2010). Chez la levure, Esa1 acétyle H2Az après son incorporation dans la chromatine au niveau de promoteurs, ce qui en faciliterait son éviction et participerait à l'activation

transcriptionnelle. Ainsi la fusion de ces deux complexes pourrait viser à une coopération entre ces enzymes. Néanmoins la déplétion par RNAi de TIP60 ou P400 conduit la plupart du temps à des phénotypes antagonistes (Mattera et al. 2009), comme par exemple sur l'expression de l'inhibiteur de CDK/cycline p21 en absence de dommages (Tyteca et al. 2006b). Des expériences *in vitro* montrent que P400 est capable, via son domaine SANT d'inhiber l'activité acétyltransférase de TIP60 (Park et al. 2009). Il existe donc une relation complexe entre ces deux sous-unités du complexe TIP60.

- **3 Fonctions et instabilité génétique**

De la levure à l'homme, TIP60, comme ses orthologues, est une protéine essentielle au niveau de la cellule. Les souris déplétées en homozygotes pour les 2 copies de TIP60 ne sont non viables, puisqu'elles meurent au stade blastocyste (Hu et al. 2009). De manière générale, plusieurs études suggèrent des rôles de TIP60 dans des processus développementaux, notamment au niveau du système nerveux et cardiaque (Lorbeck et al. 2011),(Lough 2002). En 2007, TIP60 est caractérisée comme suppresseur de tumeur dans des souris, face un stress oncogénique induit par l'expression du facteur myc (Gorrini et al. 2007). Un suppresseur de tumeur est, par opposition à un oncogène, un régulateur négatif de la prolifération cellulaire, dont la fonction est souvent perdue dans les cancers. En effet, TIP60 est nécessaire à la signalisation et à la réparation des dommages à l'ADN, et surtout à l'arrêt du cycle ou à l'apoptose en réponse à ces dommages. De plus, l'expression de TIP60 est effectivement décrite comme diminuée dans différents cancers. TIP60 est une protéine pléiotropique, qui a de nombreuses fonctions cellulaires majoritairement associées à la sauvegarde de la stabilité génétique de la cellule (Sapountzi et al. 2006).

- **4 Implication dans la régulation transcriptionnelle**

- a **Activation de la transcription**

TIP60 est largement impliquée dans l'activation transcriptionnelle. En effet, elle a été découverte en 1996 comme un transactivateur du facteur de transcription tat du virus HIV humain (Kamine et al. 1996). TIP60 est recrutée au niveau des promoteurs des gènes comme co-activateur pour divers facteurs de transcription. On peut citer notamment le recrutement de TIP60 avec le facteur de transcription E2F, participant ainsi à l'activation des gènes nécessaires à la transition G1/S, ou encore avec UBF, facteur de transcription spécifique des ARN ribosomiques, participant à la transcription de ces derniers (Sapountzi et al. 2006). TIP60 participe à l'activation transcriptionnelle par l'acétylation de l'histone H4 au niveau du promoteur. Mais elle peut aussi acétyler un facteur de transcription et moduler son activité. C'est le cas pour le facteur de transcription P53, dont l'acétylation par TIP60

facilite la transcription de ces gènes cibles, notamment des gènes pro-apoptotiques *BAX* et *PUMA*, jouant un rôle prépondérant dans l'activation de l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN (Tyteca et al. 2006a). TIP60 a donc majoritairement, et par différents mécanismes, un rôle d'activateur transcriptionnel. Néanmoins dans un certain nombre de cas, TIP60 peut avoir un effet répresseur sur la transcription.

b Répression de la transcription

TIP60 peut également agir co-répresseur lorsque recrutée avec certains facteurs de transcription. Ce phénomène a été décrit pour les facteurs de transcription CREB (cyclic AMP element response binding proteine) et STAT3. Dans le cas de CREB, il semble que TIP60 se lie physiquement à ce dernier, et indépendamment de son activité HAT, empêche la phosphorylation de CREB par la kinase PKA, nécessaire à son activation. Ainsi TIP60 réprime les gènes cible de CREB, en empêchant l'activation de ce dernier (Gavaravarapu and Kamine 2000). D'autre part, TIP60 est capable d'interagir *via* son domaine à doigt de zinc avec HDAC7, et c'est ce mécanisme qui est mis en avant pour son rôle de co-répresseur de STAT3 (Xiao et al. 2003). A noter que TIP60, comme HDAC7, sont toutes deux capables, d'après des tests double hybrides, de liaison avec le récepteur ETA (internalised endothelin receptor A). Dans des cellules de mammifères, lorsque ce récepteur est activé via son ligand (ET1), il est internalisé, et TIP60 comme HDAC7 sont exportées du noyau et colocalisent avec ETA, TIP60 potentialisant fortement l'activation de la voie de signalisation provoquée par la liaison ETA-ET1 (Lee et al. 2001). Cette étude, sans lien apparent avec un phénomène de régulation transcriptionnelle, appuie néanmoins l'existence de ce couple TIP60-HDAC7. Chez *S.cerevisiae*, un mutant pour l'HDAC rpd3 présente une augmentation de la mise sous silence des télomères, ce qui correspond à l'effet inverse attendu pour une HDAC. En réalité il semble qu'Esa1 et rpd3 agissent en coopération pour réguler la présence d'H4K12ac, renforçant une nouvelle fois ce lien TIP60-HDAC (Chang and Pillus 2009). Finalement, dans des cellules de drosophile, une étude d'expression à grande échelle après siRNA dirigé contre TIP60 couplée à une étude du recrutement par CHIP, révèle qu'une large proportion de gènes liée par TIP60 au niveau de leur promoteur, est réprimée par TIP60 dans ce système. En croisant ces données avec de études d'expression après traitement à la TSA, les auteurs proposent un modèle où TIP60 répriment de nombreux gènes, en recrutant un complexe contenant une HDAC à leur promoteur (Schirling et al. 2010). Le lien entre TIP60 et HDAC, est cohérent avec un rôle éventuel de TIP60 dans l'hétéochromatine, classiquement médiée par la présence des HDACs. Il faut également noter qu'il existe un lien entre TIP60 et une protéine à bromodomaine puisque une étude récente montre que l'acétylation de Twist par TIP60, est responsable du recrutement de BRD4 sur le promoteur et

l'enhancer du gène *WNT5A*, permettant son expression, participant ainsi à un phénomène de tumorigenèse dans un cancer du sein (Shi et al. 2014)

Conclusion et objectifs de la thèse

Au vu de l'ensemble de ces données bibliographiques liant acétylation d'histones et hétérochromatine, protéines BETs, et TIP60 (Fig 39), l'objectif de mon travail de thèse a donc été d'évaluer un éventuel lien entre TIP60 et hétérochromatine péri-centromérique dans les cellules de mammifères.

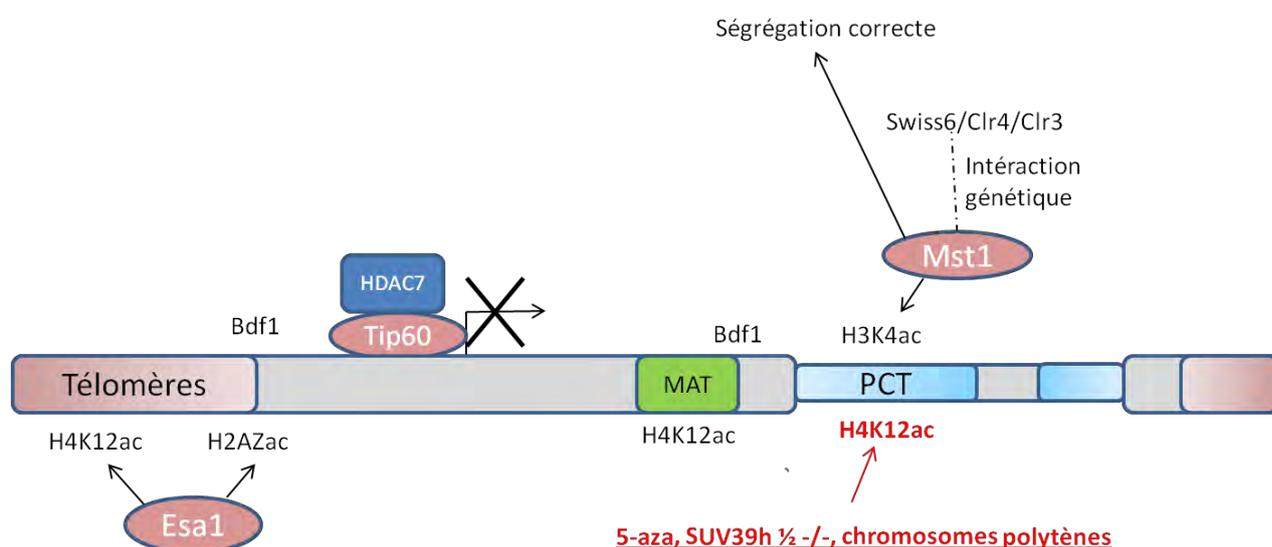


Figure 39 : TIP60 et hétérochromatine à travers les espèces. Sans être exhaustif, de nombreux éléments lient entre eux TIP60, hétérochromatine et acétylations d'histones. PCT : Péricentromères.

RÉSULTATS

Partie 1 : TIP60 dans la compaction de l'hétérochromatine péricentromérique dans les cellules SUV39H ½ -/-

A **Introduction**

Au cours de mon travail de thèse, j'ai mis à jour un rôle de la protéine TIP60 dans l'hétérochromatine des péricentromères de mammifères.

Les MEFs SUV39H ½ -/- présentent une légère déstructuration des péricentromères, et des défauts de ségrégation des chromosomes lors de la mitose (Peters et al. 2001). Leur chromatine péricentromérique est privée d'H3K9me3 et de HP1, et se trouve enrichie en H4K12ac. Dans l'hétérochromatine des télomères de la levure, cette acétylation est mise en place par Esa1, l'orthologue de TIP60, et H4K12ac est une cible *in vitro* de cette dernière. Effectivement, mes résultats montrent que TIP60 est recrutée aux péricentromères dans ces cellules SUV39H ½ -/-, où elle participe à la mise en place d'H4K12ac. L'utilisation d'un siRNA TIP60 augmente les phénotypes de déstructuration ainsi que les défauts de ségrégation déjà observés dans ces cellules, impliquant TIP60 dans le maintien de cette chromatine. Cette implication de TIP60 dans un phénomène de maintien de la compaction pourrait s'expliquer par le recrutement intermédiaire de BRD2 via l'acétylation d'H4K12. En effet, un siRNA BRD2 phénocopie le phénotype de décompaction induit par le siRNA TIP60. De nombreux liens existent entre TIP60 et hétérochromatine chez la levure. Cette étude représente le premier lien entre TIP60 et une structure hétérochromatinienne, et à plus forte raison dans les péricentromères, dans des cellules de mammifères.

B **Publication**

Control of genetic stability by a new heterochromatin compaction pathway involving the Tip60 histone acetyltransferase

Aude Grézy^{1,2}, Martine Chevillard-Briet^{1,2}, Didier Trouche^{1,2,*}, Fabrice Escaffit^{1,2,*,#}

¹; LBCMCP; Center for Integrative Biology (CBI); Université de Toulouse ; UPS; F-31062 Toulouse, France

²LBCMCP; Center for Integrative Biology (CBI); CNRS; F-31062 Toulouse, France

Short title : Tip60-dependent chromatin compaction

Corresponding author: Fabrice ESCAFFIT, LBCMCP-UMR5088, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France. Phone: +33-5-61-55-62-10; E-mail: fabrice.escaffit@univ-tlse3.fr

* These authors contributed equally to this work

Abstract

Pericentric heterochromatin is a highly compacted structure required for accurate chromosome segregation in mitosis. In mammals, it relies on methylation of histone H3K9 by Suv39H enzymes, which provides a docking site for HP1 proteins, therefore mediating heterochromatin compaction. Here, we show that, when this normal compaction pathway is defective, the histone acetyltransferase Tip60 is recruited to pericentric heterochromatin where it mediates acetylation of histone H4K12. Furthermore, in such context, depletion of Tip60 leads to derepression of satellite transcription, to decompaction of pericentric heterochromatin and to defects in chromosome segregation in mitosis. Finally, we show that depletion of BRD2, a double bromodomain containing protein which binds H4K12ac, phenocopies the Tip60 depletion with respect to heterochromatin decompaction and defects in chromosome segregation. Taken together, in this manuscript, we have identified a new compaction pathway of mammalian pericentric heterochromatin relying on Tip60 and which may be dependent on BRD2 recruitment by H4K12 acetylation. We propose that the underexpression in Tip60 expression observed in many human tumours can promote genetic instability through defective pericentric heterochromatin.

Introduction

The structuration of mammalian heterochromatin around centromeres - *i.e.* in pericentric regions of each chromosomes - plays a central role in genomic integrity: it silences the expression of deleterious sequences, such as transposons, prevents deleterious recombination events which can occur in repeated sequences, and allows correct chromosomes segregation (Elgin and Grewal, 2003). Thus, the factors which are involved in the formation of such condensed structures or in their maintenance are crucial for genetic stability. Among these factors, Suv39H1 and Suv39H2 proteins methylate histone H3 on lysine 9, thus promoting the recruitment of Heterochromatin Protein 1 α (HP1 α) (Peters *et al.*, 2001) and thereafter, heterochromatin compaction. This heterochromatin compaction is critical for preventing cancer progression: Suv39H negative cells harbor chromosomal instabilities and Suv39H deficiency in mice is associated with an increased risk of cancer (Peters *et al.*, 2001). Moreover, negative modulation of Suv39H1 has been shown to promote tumorigenesis in breast cancers (Khanal *et al.*, 2013) and its over-expression in animal models can suppress tumour formation (Albacker *et al.*, 2013). Modifications in the expression of HP1 proteins are also very frequent in human cancers (Dialynas *et al.*, 2008). Interestingly, sensitivity to therapy-induced senescence, which is a promising strategy of cancer treatment, is clearly linked to Suv39H1 expression (Dorr *et al.*, 2013).

As expected considering the global link between histone acetylation and chromatin relaxation, heterochromatin formation and maintenance largely involve histone deacetylation: first, histones in heterochromatin regions are generally hypoacetylated. Moreover, in yeast, Histone DeAcetylases (HDACs), such as Sir2 or Clr3, participate, sequentially or concomitantly with RNAi machinery, in the initiation, propagation and maintenance of pericentric heterochromatin (Maison and Almouzni, 2004; Buscaino *et al.*, 2013). In mammals, treatment of cells with histone deacetylase inhibitors impairs HP1 recruitment to pericentric heterochromatin (Taddei *et al.*, 2001), suggesting that histone deacetylation is required for heterochromatin compaction throughout evolution.

However, some histone acetylation events could participate in pericentric heterochromatin function: heterochromatic regions of polytene chromosomes in *Drosophila* are known for long to harbour histone H4 acetylated on K12 (Turner *et al.*, 1992). Moreover, in mammalian cells, non-coding RNAs produced from the transcription of repeated pericentric regions, called “satellites”, play a crucial role in heterochromatin formation (Maison and Almouzni, 2004)

suggesting a function for histone acetylation, which is associated with the expression of satellites (see for example: (Papait *et al.*, 2007)).

In *S. cerevisiae*, H4K12 is acetylated at telomeres by Esa1 (Clarke *et al.*, 2006). In fission yeast, acetylation of histone H3K4 by the Mst1 histone acetyltransferase is involved in heterochromatin formation, by favouring the switch of recruitment between Clr4 (homolog of Suv39H) and Swi6 (HP1 α) (Xhemalce and Kouzarides, 2010). Strikingly, the human homologue of Mst1 and Esa1, the histone acetyltransferase Tip60, is also linked to heterochromatin maintenance: DNA double strand breaks occurring in heterochromatin are repaired by a specific pathway involving Tip60, which is recruited and activated through the binding of its chromodomain to H3K9me3 (Ayrapetov *et al.*, 2014).

The Tip60 histone acetyltransferase is conserved from yeast to human (Doyon and Cote, 2004). It acetylates canonical histone H4 and H2A, as well as histone variants H2A.Z and H2A.X (Altaf *et al.*, 2010; Ikura *et al.*, 2015). It belongs to the MYST family and participates in a multimolecular complex, called “Tip60 complex” in mammals, containing many other enzymes, including the ATPase p400 which mediates the incorporation of the H2A.Z histone variant in chromatin (Gevry *et al.*, 2007).

Tip60 and its associated proteins participate in transcriptional control and, consistent with its histone acetyltransferase activity, Tip60 is involved in the activation of specific promoters. However, in few instances, it was found to mediate transcriptional repression (Ai *et al.*, 2007; Chevillard-Briet *et al.*, 2014), but the role of histone acetylation in this process remains largely unclear. Members of the Tip60 complex also participate in genetic stability since both Tip60 and p400 are important, for example, for the repair of DNA double strand breaks (Murr *et al.*, 2006; Chailleux *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Courilleau *et al.*, 2012).

Through its action on gene expression and genetic stability, Tip60 participates in growth control. In response to DNA damage, it is required for both cell cycle arrest and apoptosis. It first participates in DNA damage signalling through acetylation of ATM, a kinase central to the response to Double Strand Breaks (Sun *et al.*, 2005). Moreover, it is an essential cofactor of the p53 tumour suppressor (Berns *et al.*, 2004; Legube *et al.*, 2004), facilitating p53 transcriptional activity but also, through direct acetylation of p53, its targeting to specific promoters (Sykes *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Tyteca *et al.*, 2006). Accordingly, Tip60 is underexpressed in a wide variety of human cancers (Gorrini *et al.*, 2007; Mattera *et al.*, 2009). Moreover, mice heterozygous for Tip60 are more susceptible to myc-induced lymphoma or chemically-induced colon cancers (Gorrini *et al.*, 2007; Mattera *et al.*, 2009), indicating that

Tip60 is a tumour suppressor. The mechanisms by which it mediates its tumour suppressor functions are not completely clear but were shown to involve the control of the DNA damage response (Gorrini *et al.*, 2007) or of the Wnt signalling pathway (Chevillard-Briet *et al.*, 2014).

In this study, we analyze the role of Tip60 in pericentric heterochromatin maintenance and function in mouse cells. We found that it participates in a new pathway of heterochromatin compaction, which could rely on histone H4K12 acetylation and on the recruitment of BRD2, a double bromodomain containing protein which binds H4K12ac. Taken together, our results demonstrate that mammalian Tip60 can be a major regulator of pericentric heterochromatin dynamics providing an alternative compaction pathway to ensure genetic stability.

Results

Tip60 acetylates histones at defective pericentric heterochromatin

In the yeast *S. pombe*, the Tip60 ortholog was shown to be involved in the maintenance of heterochromatin at the HMR loci, functioning in collaboration with orthologs of Suv39H1 and HP1 proteins (Xhemalce and Kouzarides, 2010). In order to test whether this was conserved in mammals, we transfected NIH3T3 cells twice at 48 hours apart with siRNAs against Tip60. These siRNAs were shown to decrease efficiently Tip60 protein expression (Chevallard-Briet *et al.*, 2014) and we achieved efficient Tip60 mRNA depletion during at least five days (Fig. 1A). We did not find any effect of Tip60 depletion on satellite expression (Fig. 1B), a marker of heterochromatin decompaction, neither on heterochromatin enrichment of the HP1 α protein (Fig. 1C). In addition, Tip60 depletion did not affect *de novo* HP1 α recruitment measured using a commonly used assay relying on re-expression of Suv39H1 in Suv39H^{-/-} cells (Maison *et al.*, 2011) (data not shown). Altogether, these data indicate that the regulation of HP1 recruitment to heterochromatin by Tip60 is not conserved in mammals.

Interestingly, in cells harbouring defects in the normal pathway of heterochromatin compaction, such as cells originating from mice deficient from Suv39H proteins or cells treated with DNA methylation inhibitors, pericentric heterochromatin harbours increased levels of H4K12 acetylation (Peters *et al.*, 2001; Boyarchuk *et al.*, 2014). We confirmed this finding by chromatin immunoprecipitation experiments. Indeed, ChIP with acetylated H4K12 (H4K12ac)-specific antibodies immunoprecipitated much more major satellite sequences from cells derived from Suv39H knock-out mice (Suv39H^{-/-} cells) than from cells derived from control mice (Fig. 2A). Moreover, treatment of NIH3T3 cells with 5-Azacytidine (5-AzaC), which causes a general decrease in DNA methylation leading to disruption of pericentric heterochromatin, also induced an increase in the amount of major satellite sequences immunoprecipitated by the H4K12ac antibody (Fig 2B). Strikingly, in both cases, depletion of Tip60 using a specific siRNA that we previously validated (see SuppFig. S1A for siRNA efficiency) led to a decrease in the amount of major satellite sequences immunoprecipitated by the H4K12ac antibody (Fig. 2C and 2D), indicating that Tip60 expression is required for this acetylation event in both models.

This result led us to test whether Tip60 is recruited to pericentric heterochromatin when classical heterochromatin compaction pathway is defective. We found, by ChIP experiments, that immunoprecipitation of Tip60 led to the co-immunoprecipitation of major satellite repeats from Suv39H^{-/-} cells (Fig. 2E). This precipitation is specific since it was not observed in the no antibody control, neither on an unrelated genomic sequence from the p53 promoter

in the same cells. Taken together, these data indicate that Tip60 is recruited to pericentric heterochromatin in cells derived from Suv39H^{-/-} mice, where it acetylates histone H4K12.

Tip60 is important for heterochromatin compaction in Suv39H^{-/-} cells

We next tested the function of Tip60 in pericentric heterochromatin compaction in Suv39H^{-/-} cells. To this end, we transfected Suv39H^{-/-} cells with previously characterized Tip60 siRNAs (Chevallard-Briet *et al.*, 2014) and stained them with DAPI to observe heterochromatic foci. We found that Tip60 depletion resulted in cells harbouring disrupted foci compared to cells transfected with the control siRNA (Fig. 3A). To quantify these changes, we used a plug-in developed in Carl Mann laboratory monitoring DAPI heterogeneity in cells as a coefficient of variation (DAPI CV) (Jeanblanc *et al.*, 2012). This plug-in efficiently detects heterochromatin compaction in Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHFs) observed in senescent cells. We found that depletion of Tip60 resulted in a significant decrease of DAPI heterogeneity in Suv39H^{-/-} cells (Fig. 3B), reflecting a decompaction of heterochromatin. Importantly, we found similar result using two independent siRNAs against Tip60, ruling out off-target effects (for siRNAs efficiencies, see SuppFig. S1A). Using the Operetta platform, a device allowing the automatic acquisition and analysis of fluorescence (see Material and Methods section for details), we confirmed that Tip60 depletion significantly decreased in DAPI heterogeneity in Suv39H1^{-/-} cells (Fig. 3C), but not in wild type NIH3T3 cells. Altogether, these data indicate that Tip60 is important for heterochromatin compaction in a Suv39H-negative background.

Pericentric heterochromatin decompaction is associated with an increase in the transcription of satellite repeats. Indeed, transcription of pericentric repeats is stimulated in Suv39H knock-out cells and strongly induced upon treatment of cells with 5AzaC (Gopalakrishnan *et al.*, 2009). We thus monitored the effect of Tip60 depletion on satellite repeats expression. We found that Tip60 depletion using the two specific siRNAs led to an increase in major satellite expression in Suv39H^{-/-} cells (Fig. 4A). Moreover, this increase was abolished upon restoration of normal pericentric heterochromatin in these cells by transfection of an expression vector for Suv39H1 (Fig. 4B; see SuppFig. S1C for Tip60 siRNA efficiency and Suv39H1 expression level). Since such increase was also not seen in wild type cells, as mentioned above (see Figure 1), this indicates that Tip60 represses major satellite expression only when the classical heterochromatin compaction pathway is defective. Note however that we did not find any stimulation of major satellite expression following Tip60 knock-down in NIH3T3 cells treated by 5-AzaC (SuppFig. S2), probably because heterochromatin

decompaction is much more pronounced in this situation and cannot be further increased by Tip60 depletion despite the modulation of H4K12 acetylation observed in Fig. 2D.

Taken together, these data indicate that the Tip60 histone acetyltransferase is involved in both the compaction of pericentric heterochromatin and the repression of repeats transcription.

Tip60 deficiency strengthen the genetic instability phenotype of Suv39H^{-/-} cells

Pericentromeric heterochromatin compaction is important for genetic stability, and satellite overexpression is associated with its relaxation (Ting *et al.*, 2011). As a consequence, Suv39H^{-/-} cells, in addition to satellite overexpression phenotype, harbours some defects in chromosome segregation in mitosis, with the appearance of a general polyploidy (Peters *et al.*, 2001). Since Tip60 depletion further decreases heterochromatin compaction and further increases satellites transcription, we reasoned that it may further increase the genetic instability phenotypes associated with Suv39H inactivation. We thus transfected Tip60 siRNAs in Suv39H^{-/-} cells and analysed the presence of hyper-polyploid cells 6 days following transfection. We observed a significant increase in the number of mitotic cells with twice the amount of chromosomes when counted in chromosomes spreads (Fig. 5A). We also quantified this phenomenon by propidium iodide staining followed by flow cytometry and we found that Tip60 depletion induces an increase in the number of hyper-polyploid Suv39H^{-/-} cells (Fig. 5B). Strikingly, such increase was not observed upon Tip60 depletion in wild type NIH3T3 cells. Thus, these data indicate that Tip60 depletion, in a Suv39H^{-/-} context, favours polyploidy. We next analyzed the presence of micronuclei, a feature which is also associated with the inactivation of Suv39H and reflect mitosis defects leading to aneuploidy (Wang *et al.*, 2013). We found that the percentage of cells harbouring micronuclei strongly increased upon Tip60 knockdown in Suv39H^{-/-} cells but not in NIH3T3 cells (Fig. 5C, see also SuppFig. S3 for another Tip60 siRNA).

Altogether, these data indicate that the expression of the Tip60 complex is important for the correct segregation of chromosomes in a Suv39H-depleted context.

Heterochromatin compaction could be mediated by BRD2

We next investigated the molecular mechanism by which Tip60 could mediate the compaction of heterochromatin, an unexpected role for a histone acetyltransferase given that acetylation is generally associated with chromatin relaxation. Strikingly, proteins with two bromodomains of the BRD family were found to mediate chromatin compaction in an acetylation-dependent manner (Pivot-Pajot *et al.*, 2003). Moreover, BRD2 was previously found to bind to acetylated H4K12 (Umehara *et al.*, 2010) which is the Tip60-dependent

histone modification found in pericentric heterochromatin upon Suv39H depletion (see above). We thus tested the involvement of BRD2 in Tip60-dependent heterochromatin functions in the Suv39H^{-/-} background. We first found that BRD2 is recruited to pericentric heterochromatin in Suv39H^{-/-} cells, as shown by ChIP experiments (Fig. 6A). This recruitment is specific, since enrichment of pericentric sequences was much lower in the no antibody control. Furthermore, no enrichment of an unrelated sequence from the β 2m promoter could be observed in the BRD2 ChIP.

Depletion of BRD2 using a specific siRNA (see SuppFig. S1B for the validation of siRNA efficiency) led to the decompaction of heterochromatin in Suv39H^{-/-} cells as shown by DAPI CV measurement, either manually or automatically (Fig. 6B). We also observed the appearance of aneuploidy upon BRD2 depletion, as shown by the increase in the number of cells harbouring micronuclei (Fig. 6C).

Thus, these data indicate that BRD2 depletion phenocopies the depletion of Tip60, suggesting that it mediates the Tip60-dependent heterochromatin compaction in Suv39H^{-/-} cells.

Discussion

In this manuscript, we identify a new pathway involved in heterochromatin compaction and function. This pathway can function as a back-up pathway important in the absence of the normal Suv39H-HP1 α canonical pathway. Indeed, we observe Tip60 recruitment to heterochromatin only in the absence of Suv39H proteins, and it mediates histone H4K12ac, a modification that was previously shown to be specifically enriched in a context in which heterochromatin is abnormal. Moreover, we did not find any effect of Tip60 depletion on heterochromatin transcription in normal cells. Although this is not a definitive proof that Tip60 does not play a role in pericentric heterochromatin in normal cells, either because the depletion we achieved is not sufficient enough or because it is involved in very specific time or space windows (see below), our results indicate that the Tip60-dependent heterochromatin pathway is particularly important when the normal pathway of heterochromatin maintenance is defective. Interestingly, we found that Tip60 depletion also leads to overexpression of LINE retroviral sequences in Suv39H $^{-/-}$ cells (SuppFig. S4). Since these LINE sequences are also regulated by Suv39H-HP1 α (Ting *et al.*, 2011; Bulut-Karslioglu *et al.*, 2014), the pathway we uncover here is probably not restricted to pericentric heterochromatin but can replace the canonical constitutive heterochromatin compaction pathway wherever it is involved.

Our results show that in Suv39H-deficient cells, depletion of Tip60 leads to the strengthening of phenotypes which are associated with defects in pericentric heterochromatin, such as the decompaction of heterochromatin and the increase in the expression of non-coding RNAs produced from heterochromatin sequences. Moreover, it increases the genetic instability associated with heterochromatin dysfunction, with defects in chromosome segregation in mitosis, exemplified by the increase in the percentage of cells harbouring micronuclei as well as of polyploid cells.

Paradoxically, given the known link between histone acetylation and chromatin compaction, our results indicate that a histone acetyltransferase mediates both histone acetylation, at least on H4K12, and chromatin compaction. Interestingly, histone acetylation could be directly involved in heterochromatin compaction, by allowing the recruitment of BRD2, which belongs to the double-bromodomain containing proteins family, some of them known to be able to mediate the compaction of acetylated chromatin (Pivot-Pajot *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012). In agreement with that, depletion of BRD2 mimics Tip60 depletion with respect to heterochromatin compaction and chromosomes segregation defects.

Note that we were not able to formally demonstrate that BRD2 recruitment was dependent on H4K12 acetylation. We cannot thus rule out the involvement of other mechanisms in Tip60-mediated heterochromatin compaction. Indeed, we did not find any evidence for changes in the expression of pericentric heterochromatin sequences upon BRD2 depletion in these cells (SuppFig. S5). This indicates that chromatin decompaction is not sufficient for an increased expression of pericentric repeats, underlining the requirement of acetylation of another substrate (either another histone residue than H4K12 or another protein) by Tip60 to repress satellites expression.

Another question raised by our findings is where and when does this pathway participate in heterochromatin compaction or, in other terms, in which physio-pathological situation could it be involved. First, this could occur during cancer progression. Indeed, most cancers, if not all, have defects in heterochromatin, with a decreased DNA methylation (Wilson *et al.*, 2007), in a manner reminiscent to 5-AzaC treated cells. Moreover, defects in the canonical heterochromatin compaction pathway are common in human cancers (Dialynas *et al.*, 2008; Slee *et al.*, 2011). During the course of cancer progression, it is thus possible that the heterochromatin compaction pathway we uncover here allows cells to maintain a sufficiently accurate chromosome segregation to avoid their elimination by checkpoints or death because of too high chromosome imbalance. Strikingly, Tip60 is a tumour suppressor often underexpressed in human cancers. Developed cancer may thus harbour defects both in the normal pericentric maintenance pathway and in the pathway we identified here. This could lead to high genetic instability that could further reinforce cancer progression or favour the appearance of drug-resistant clones of cancer cells. Along this line, Tip60 is known to facilitate DNA double strand breaks repair (Murr *et al.*, 2006; Chailleux *et al.*, 2010). Moreover, a decrease in Tip60 levels abolishes the tumour suppressor pathways, such as the DDR and the p53 pathway (Berns *et al.*, 2004; Legube *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005) eliminating cells with high genetic instability. Tip60 deficiency can thus both increase genetic stability of cancer cells (by decreasing DNA repair efficiency and inducing defects in chromosome segregation (this study)) and decrease the mechanism eliminating damaged cells. Such mechanisms probably explain, at least in part, the tumour suppressor functions of Tip60.

The question of whether the heterochromatin compaction pathway we have uncovered here is also important in normal cells is an open and important question. In agreement with that, Mst1, the Tip60 ortholog in *S. pombe*, is important for heterochromatin function. Interestingly, there are known normal situations in which the canonical Suv39H-HP1 α

heterochromatin compaction pathway is not functional, such as at very early stage of development in mouse (Santos *et al.*, 2005) as well as in late S phase. In this latter case, it was found that the recruitment of the demethylase JMJD2A also remove H3K9me3, in a manner very similar to what can be observed in Suv39H depleted cells (Park *et al.*, 2014). Since H4K12ac is associated with telomeric heterochromatin plasticity in *S. cerevisiae* (Zhou *et al.*, 2011), it is tempting to speculate that the pathway we have uncovered here is involved in processes requiring heterochromatin plasticity, such as during DNA repair and replication. In agreement with such a hypothesis, Tip60 has been found to be involved in DNA double strand breaks repair in heterochromatin (Ayrapetov *et al.*, 2014). Moreover, we found, by ChIP using synchronised cells, that the level of histone H4K12ac increases during cell cycle and is maximal in late S phase (SuppFig. S6), at a time where transcription of pericentric repeats is decreased (Lu and Gilbert, 2007). Whether Tip60-dependent compaction is functionally important for heterochromatin function and maintenance at this very specific cell cycle stage or during the repair of DNA damage occurring in heterochromatin is a question which clearly merits further investigations.

Materials and Methods

Antibodies, vectors, siRNAs, and primers

Anti-H4K12ac and anti-H3 antibodies were purchased from Abcam (Paris, France) and anti-BRD2 was from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX). Anti-Tip60 antibody was purchased from Upstate Laboratories. The myc-Suv39H1 expression vector was a kind gift from Dr T. Jenuwein (Peters *et al.*, 2001).

All siRNAs were purchased from Eurogentec (Angers, France). Sequences were as follow:

Control siRNA: ACUCAAACUCACGAAGGAA-dTdT

Tip60-1: UGAGAUUGAUGGACGGAAA-dTdT

Tip60-2: UGAAGAACAUUGAGUGUAU-dTdT

BRD2 siRNA: GACAAAGGAGGAACUGGCUUUGGAG-dTdT

The following primers were used :

Tip60 mRNA: 5'-GACCCCTTCCTCTTCTACGT-3' and 5'-CCGGTCTTCCCTTCTACTTT-3'

p400 mRNA: 5'-GAAGTTGGCTGCTGCTAAGA-3' and 5'-CCTCTTCTGGAAACTTTCTG-3'

Suv39H1 mRNA: 5'-GGGTCCACTTGCATGTTGTAA-3' and 5'-GGCAACATCTCCCACTTTGT-3'

Major satellites (expression and ChIP): 5'-GACGACTTGAAAAATGACGAAATC-3' and 5'-CATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC-3'

β 2m mRNA (expression and ChIP): 5'-CCCGTTCTTCAGCATTGGA-3' and 5'-CCGAACATACTGAACTGCTACGTAA-3'

p53 promoter: 5'-CAGAGCAGAAAGGGACTTGG-3' and 5'-CTTCACTTGGGCCTTCAAAA-3'

Cell culture, transfection and treatments

MEFs derived from Suv39H^{-/-} or Suv39H^{+/+} animals (kind gifts from Dr T. Jenuwein (Peters *et al.*, 2001)) and NIH3T3 cells (ATCC, LCG Std, Molsheim, France) were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FCS and antibiotics.

Cells were electroporated with siRNAs (100 μ M) or plasmids (1 μ g) using an electroporation device (Amaza AG, Lonza, France), according to manufacturer's specifications. Stable

Suv39H1-expressing cell line (named “Rescued” MEFs) was obtained after selection for 7 days using 2µg/ml puromycin.

When required, cells were treated using 5-azacytidine (10µM) for around 24h before being harvested and used in ChIP experiment.

DAPI staining, metaphase spreads and flow cytometry analysis

For DAPI staining, cells were fixed with 4% formaldehyde before staining for 3 minutes with DAPI (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Stainings were then quantified by counting micronuclei or by evaluate chromatin compaction using DAPI CV (Coefficient of variation) quantification plug-in on ImageJ (from C. Mann laboratory (Contrepois *et al.*, 2012)).

In metaphase spreads experiments, cells were treated using 0.1µg/ml colcemid for 2h, trypsinized, washed and then lysed for 25 min in hypotonic solution (75mM KCl). After addition of fixative solution (Ethanol:Acetic acid, 3:1), metaphasic plates were then spread on microscope slides, stained with DAPI for 3 minutes and photographed.

For flow cytometry analysis, cells were trypsinized, fixed with 70 % ethanol, stained with PI supplemented with RNase (BD Biosciences, Pont-de-Claix, France) and analysed by flow cytometry. Quantification was done using CellQuest software (BD Biosciences).

Automatic measurement of fluorescence

Automatic high-throughput/high-content analysis were performed using an Operetta device (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Briefly, Suv39H^{-/-} cells were transfected as described above and seeded into 96-well plates (Cell Carrier, Perkin Elmer) at the density of 5000 cells per well. 48 hours later, cells were fixed and stained with DAPI, also as described above, and then observed using the Operetta platform (Olympus 20X objective, 0.19 numerical aperture). DAPI images were taken for each well in an optimized plane and analysed for the DAPI CV (Coefficient of Variance, i.e. standard deviation divided by mean) using a script operated by an integrated software package (Acapella, Perkin Elmer).

Data for 500 to 1000 cells per well were collected, illustrated in box plots and statistically analysed with the R software. Briefly, for each comparison of microscopy DAPI CV data, we applied the statistical test of Shapiro to determine whether the list of values is normally distributed (p-value > 0.05) or not normally distributed (p-value < 0.05). Since at least one of the lists was not normally distributed, we applied the Mann-Whitney-Wilcoxon test.

Immunofluorescence

Cells seeded on coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde and incubated with primary anti-HP1 α and secondary anti-mouse (Euromedex, Souffelweyersheim, France) antibodies before being stained with DAPI, mounted and observed, as previously described (Escaffit *et al.*, 2007).

RNA extraction, reverse transcription and qPCR analysis

RNA extraction were performed with Trizol reagent, then treated with DNase I and DNase Z for 1.5h at 37°C. DNases were then precipitated and eliminated with lysis solution and MPC protein precipitation reagent from Epicentre (Tebu-Bio, Le Perrey-en-Yvelines, France). After reverse transcription using random primers and AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI), qPCR analysis was performed using iQ qPCR mix and a real-time PCR device (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. qPCR reactions were performed in triplicates.

Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation experiments were performed essentially as described. Briefly, cells were fixed in 1% formaldehyde (15 min) and glycine was added to block the reaction. Nuclei were prepared and sonicated to generate DNA fragments with lengths between 500 and 1500 bp. After pre-clearing and blocking steps, immunoprecipitations were performed overnight with specific antibodies or without antibody as negative control. After centrifugation to eliminate background, recovering of the immune complexes was performed by the incubation of samples with a mixture of blocked proteinA/protein G beads (Sigma Aldrich) on a rotating wheel (1h at 4 °C). After washing, the DNA-protein cross-link was reversed by the addition of Rnase A to the samples (30min at 37°C) and heating under agitation at 70 °C on night. After proteinase K digestion (1.5h), DNA was purified using GFX DNA Purification kit (GE Healthcare, Vandoeuvre-les-Nancy, France) and then quantified by qPCR using iQ qPCR mix and a real-time PCR device (BioRad) according to the manufacturer's instructions. qPCR reactions were performed in triplicates.

Acknowledgments

The authors wished to thank Dr Thomas Jenuwein for providing us cell models, and also Dr Saadi Khochbin and all members of DT's lab for helpful discussions. We specially thank

Catherine Chailleux for her technical help in automatized imaging analysis, as well as Marion Aguirrebengoa for statistical analysis of these data. Operetta high throughput analysis, Cytometry and Fluorescence imaging microscopy were performed at the Toulouse Réseau Imagerie TRI facility located at the LBCMCP.

This work was supported by grants from the "Fondation ARC" to DT as programme ARC and from the "Agence Nationale de la Recherche" (ANR). AG was supported by a studentship from the "Ligue Nationale Contre le Cancer".

Authors contributions

AG, MCB conceived and performed experiments, and interpreted results. FE conceived and performed experiments, interpreted results and wrote the paper. DT obtained fundings, conceived and interpreted experiments and wrote the paper.

Conflict of interest

There is no conflict of interest

References

- Ai, W., Zheng, H., Yang, X., Liu, Y., and Wang, T.C. (2007). Tip60 functions as a potential corepressor of KLF4 in regulation of HDC promoter activity. *Nucleic Acids Res* 35, 6137-6149.
- Albacker, C.E., Storer, N.Y., Langdon, E.M., Dibiase, A., Zhou, Y., Langenau, D.M., and Zon, L.I. (2013). The histone methyltransferase SUV39H1 suppresses embryonal rhabdomyosarcoma formation in zebrafish. *PLoS One* 8, e64969.
- Altaf, M., Auger, A., Monnet-Saksouk, J., Brodeur, J., Piquet, S., Cramet, M., Bouchard, N., Lacoste, N., Utley, R.T., Gaudreau, L., and Cote, J. (2010). NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *J Biol Chem* 285, 15966-15977.
- Ayrapetov, M.K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y., and Price, B.D. (2014). DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9169-9174.
- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, R.L., and Bernards, R. (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 428, 431-437.
- Boyarchuk, E., Filipescu, D., Vassias, I., Cantaloube, S., and Almouzni, G. (2014). The histone variant composition of centromeres is controlled by the pericentric heterochromatin state during the cell cycle. *J Cell Sci* 127, 3347-3359.
- Bulut-Karšlioglu, A., De La Rosa-Velazquez, I.A., Ramirez, F., Barenboim, M., Onishi-Seebacher, M., Arand, J., Galan, C., Winter, G.E., Engist, B., Gerle, B., O'Sullivan, R.J., Martens, J.H., Walter, J., Manke, T., Lachner, M., and Jenuwein, T. (2014). Suv39h-dependent H3K9me3 marks intact retrotransposons and silences LINE elements in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell* 55, 277-290.
- Buscaino, A., Lejeune, E., Audergon, P., Hamilton, G., Pidoux, A., and Allshire, R.C. (2013). Distinct roles for Sir2 and RNAi in centromeric heterochromatin nucleation, spreading and maintenance. *EMBO J*.
- Chailleux, C., Tyteca, S., Papin, C., Boudsocq, F., Puget, N., Courilleau, C., Grigoriev, M., Canitrot, Y., and Trouche, D. (2010). Physical interaction between the histone acetyl transferase Tip60 and the DNA double-strand breaks sensor MRN complex. *Biochem J* 426, 365-371.
- Chevillard-Briet, M., Quaranta, M., Grezy, A., Mattera, L., Courilleau, C., Philippe, M., Mercier, P., Corpet, D., Lough, J., Ueda, T., Fukunaga, R., Trouche, D., and Escaffit, F. (2014). Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling. *Hum Mol Genet* 23, 2120-2131.
- Clarke, A.S., Samal, E., and Pillus, L. (2006). Distinct roles for the essential MYST family HAT Esa1p in transcriptional silencing. *Mol Biol Cell* 17, 1744-1757.
- Contrepois, K., Thuret, J.Y., Courbeyrette, R., Fenaille, F., and Mann, C. (2012). Deacetylation of H4-K16Ac and heterochromatin assembly in senescence. *Epigenetics & chromatin* 5, 15.
- Courilleau, C., Chailleux, C., Jauneau, A., Grimal, F., Briois, S., Boutet-Robinet, E., Boudsocq, F., Trouche, D., and Canitrot, Y. (2012). The chromatin remodeler p400 ATPase facilitates Rad51-mediated repair of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 199, 1067-1081.
- Dialynas, G.K., Vitalini, M.W., and Wallrath, L.L. (2008). Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutat Res* 647, 13-20.
- Dorr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Dabritz, J.H., Lisek, J., Lenze, D., Gerhard, A., Schleicher, K., Kratzat, S., Purfurst, B., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Graler, M., Hummel, M., Keller, U., Buck, A.K., Dorken, B., Willmitzer, L., Reimann, M., Kempa, S., Lee, S., and Schmitt, C.A. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*.

- Doyon, Y., and Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev* *14*, 147-154.
- Elgin, S.C., and Grewal, S.I. (2003). Heterochromatin: silence is golden. *Curr Biol* *13*, R895-898.
- Escaffit, F., Vaute, O., Chevillard-Briet, M., Segui, B., Takami, Y., Nakayama, T., and Trouche, D. (2007). Cleavage and cytoplasmic relocalization of histone deacetylase 3 are important for apoptosis progression. *Mol Cell Biol* *27*, 554-567.
- Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* *21*, 1869-1881.
- Gopalakrishnan, S., Sullivan, B.A., Trazzi, S., Della Valle, G., and Robertson, K.D. (2009). DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions. *Hum Mol Genet* *18*, 3178-3193.
- Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., Martinato, F., Sardella, D., Verrecchia, A., Bennett, S., Confalonieri, S., Cesaroni, M., Marchesi, F., Gasco, M., Scanziani, E., Capra, M., Mai, S., Nuciforo, P., Crook, T., Lough, J., and Amati, B. (2007). Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature* *448*, 1063-1067.
- Ikura, M., Furuya, K., Matsuda, S., Matsuda, R., Shima, H., Adachi, J., Matsuda, T., Shiraki, T., and Ikura, T. (2015). Acetylation of histone H2AX at Lys 5 by the TIP60 histone acetyltransferase complex is essential for the dynamic binding of NBS1 to damaged chromatin. *Mol Cell Biol*.
- Jeanblanc, M., Ragu, S., Gey, C., Contrepolis, K., Courbeyrette, R., Thuret, J.Y., and Mann, C. (2012). Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene* *31*, 3072-3085.
- Khanal, P., Kim, G., Lim, S.C., Yun, H.J., Lee, K.Y., Choi, H.K., and Choi, H.S. (2013). Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates the stability of SUV39H1 to promote tumorigenesis in breast cancer. *FASEB J*.
- Legube, G., Linares, L.K., Tyteca, S., Caron, C., Scheffner, M., Chevillard-Briet, M., and Trouche, D. (2004). Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J Biol Chem* *279*, 44825-44833.
- Lu, J., and Gilbert, D.M. (2007). Proliferation-dependent and cell cycle regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. *J Cell Biol* *179*, 411-421.
- Maison, C., and Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 296-304.
- Maison, C., Bailly, D., Roche, D., Montes de Oca, R., Probst, A.V., Vassias, I., Dingli, F., Lombard, B., Loew, D., Quivy, J.P., and Almouzni, G. (2011). SUMOylation promotes de novo targeting of HP1alpha to pericentric heterochromatin. *Nat Genet* *43*, 220-227.
- Mattera, L., Escaffit, F., Pillaire, M.J., Selves, J., Tyteca, S., Hoffmann, J.S., Gourraud, P.A., Chevillard-Briet, M., Cazaux, C., and Trouche, D. (2009). The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene* *28*, 1506-1517.
- Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.Q., and Herceg, Z. (2006). Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* *8*, 91-99.
- Papait, R., Pistore, C., Negri, D., Pecoraro, D., Cantarini, L., and Bonapace, I.M. (2007). Np95 is implicated in pericentromeric heterochromatin replication and in major satellite silencing. *Mol Biol Cell* *18*, 1098-1106.
- Park, S.H., Yu, S.E., Chai, Y.G., and Jang, Y.K. (2014). CDK2-dependent phosphorylation of Suv39H1 is involved in control of heterochromatin replication during cell cycle progression. *Nucleic Acids Res* *42*, 6196-6207.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., and Jenuwein, T. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* *107*, 323-337.

- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 23, 5354-5365.
- Santos, F., Peters, A.H., Otte, A.P., Reik, W., and Dean, W. (2005). Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol* 280, 225-236.
- Slee, R.B., Steiner, C.M., Herbert, B.S., Vance, G.H., Hickey, R.J., Schwarz, T., Christan, S., Radovich, M., Schneider, B.P., Schindelbauer, D., and Grimes, B.R. (2011). Cancer-associated alteration of pericentromeric heterochromatin may contribute to chromosome instability. *Oncogene* 31, 3244-3253.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13182-13187.
- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., and McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 24, 841-851.
- Taddei, A., Maison, C., Roche, D., and Almouzni, G. (2001). Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* 3, 114-120.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24, 827-839.
- Ting, D.T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B.W., Akhavanfard, S., Coffman, E.J., Contino, G., Deshpande, V., Iafrate, A.J., Letovsky, S., Rivera, M.N., Bardeesy, N., Maheswaran, S., and Haber, D.A. (2011). Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science* 331, 593-596.
- Turner, B.M., Birley, A.J., and Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69, 375-384.
- Tyteca, S., Legube, G., and Trouche, D. (2006). To die or not to die: a HAT trick. *Mol Cell* 24, 807-808.
- Umehara, T., Nakamura, Y., Wakamori, M., Ozato, K., Yokoyama, S., and Padmanabhan, B. (2010). Structural implications for K5/K12-di-acetylated histone H4 recognition by the second bromodomain of BRD2. *FEBS Lett* 584, 3901-3908.
- Wang, D., Zhou, J., Liu, X., Lu, D., Shen, C., Du, Y., Wei, F.Z., Song, B., Lu, X., Yu, Y., Wang, L., Zhao, Y., Wang, H., Yang, Y., Akiyama, Y., Zhang, H., and Zhu, W.G. (2013). Methylation of SUV39H1 by SET7/9 results in heterochromatin relaxation and genome instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5516-5521.
- Wang, R., Li, Q., Helfer, C.M., Jiao, J., and You, J. (2012). Bromodomain protein Brd4 associated with acetylated chromatin is important for maintenance of higher-order chromatin structure. *J Biol Chem* 287, 10738-10752.
- Wilson, A.S., Power, B.E., and Molloy, P.L. (2007). DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1775, 138-162.
- Xhemalce, B., and Kouzarides, T. (2010). A chromodomain switch mediated by histone H3 Lys 4 acetylation regulates heterochromatin assembly. *Genes Dev* 24, 647-652.
- Xu, Y., Sun, Y., Jiang, X., Ayrapetov, M.K., Moskwa, P., Yang, S., Weinstock, D.M., and Price, B.D. (2010). The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *J Cell Biol* 191, 31-43.
- Zhou, B.O., Wang, S.S., Zhang, Y., Fu, X.H., Dang, W., Lenzmeier, B.A., and Zhou, J.Q. (2011). Histone H4 lysine 12 acetylation regulates telomeric heterochromatin plasticity in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 7, e1001272.

Figure Legends

Figure 1: Tip60 depletion does not induce any effect on various heterochromatin features in NIH3T3 cells

A) NIH3T3 cells, transfected twice at 48 hours apart by the indicated siRNA, were harvested every 24h from 48h to 120h after the first transfection. Tip60 and β 2m mRNAs were quantified by reverse transcription followed by qPCR. The amount of Tip60 mRNAs were divided by the amount of β 2m mRNA and standardised relative to 1 for cells transfected with control siRNA at each time. A representative experiment is shown. B) NIH3T3 cells were transfected using Tip60-1 or control siRNA. The amount of major satellite sequences and β 2m mRNA was quantified by reverse transcription followed by qPCR. The amount of satellite RNAs were divided by the amount of β 2m mRNA and standardised relative to 1 for cells transfected with control siRNA. The mean and standard deviation from 4 experiments are shown. C) NIH3T3 cells transfected, twice at 48 hours apart, by the indicated siRNA were fixed 96h after the first transfection, and stained with anti-HP1alpha antibody and DAPI. Representative images are shown.

Figure 2: Tip60 recruitment to pericentric heterochromatin

A) Suv39H^{+/+} and Suv39H^{-/-} MEFs were subjected to ChIP assays using anti-H4K12ac antibodies, anti-histone H3 antibody or no antibody (No Ab) as a control. The presence of major satellite sequences and β 2m sequences were quantified by qPCR in the immunoprecipitates and the inputs. The amounts of major satellites sequence in the H4K12ac immunoprecipitates were divided by the amount present in the histone H3 immunoprecipitates and standardized relative to β 2m sequences. A representative experiment out of three is shown. Error bars represent standard deviation within technical triplicates. B) NIH3T3 treated or not with 5-Aza for 24 hours were subjected to a ChIP assay and analysed as in A. The mean and standard deviation from 3 experiments are shown. C) Suv39H^{-/-} cells were transfected with the indicated siRNAs. 72 hours following transfection, cells were subjected to a ChIP assay using anti-H4K12Ac antibodies, anti-histone H3 antibody or no antibody (No Ab) as a control. The amounts of major satellite and β 2m sequences were quantified by qPCR in the immunoprecipitates and the inputs as in A. The mean and standard deviation from five independent experiments are shown. D) NIH3T3 transfected using indicated siRNA were treated or not with 5-Aza 48 hours later for 24 hours and subjected to a ChIP assay and analysed as in A. The mean and standard deviation from three independent experiments are shown. E) Suv39H^{-/-} and Suv39H^{+/+} cells were subjected to a ChIP assay using anti-Tip60

antibody or no antibody (No Ab) as a control. The presence of major satellite sequences as well as p53 promoter was quantified by qPCR in the immunoprecipitates and the inputs. The relative efficiency of the IP from a representative experiment out of three is shown relative to 1 for the NoAb amount in Suv^{-/-} cells. Error bars represent standard deviation within technical triplicates.

Figure 3: Tip60 is involved in heterochromatin compaction

A) Suv39H^{-/-} cells were transfected using Tip60-1 or control siRNA. 48 hours later, cells were fixed and stained with DAPI. Representative images of cells are shown. B) Same as in A, except that two Tip60 siRNAs were used and DAPI Coefficient of Variation (DAPI CV) from at least 100 cells by conditions was calculated. Box plots represent the cell population, with the median and the 50 and 75 % quantiles. The p-values of the difference between the two cell populations are indicated above the graphs. Note that raw values of DAPI CV strongly varied from one experiment to the other depending on the settings used for image acquisition. C) Suv39H^{-/-} and NIH3T3 cells were transfected using Tip60-1 or control siRNA. Cells were seeded in 96 wells plates. 48 hours later, cells were fixed and stained with DAPI, then analysed automatically for DAPI CV (Coefficient of variance) using the Operetta device.

Figure 4: Tip60 represses major satellite expression in Suv39H-deficient context

A) Suv39H^{-/-} cells were transfected by the indicated siRNAs. 72 hours later, cells were harvested and RNA was extracted. The presence of major satellites and β 2m RNAs was quantified by reverse transcription followed by qPCR. The amount of major satellites RNAs was divided by the amount of β 2m mRNA and standardised relative to 1 for cells transfected with control siRNA. The mean and standard deviation from four independent experiments are shown. B) Suv39H^{-/-} cells or cells rescued for Suv39H1 expression were transfected by the indicated siRNA. 72 hours later, cells were harvested and the amount of major satellite sequences was analysed as in A. A representative experiment out of three is shown.

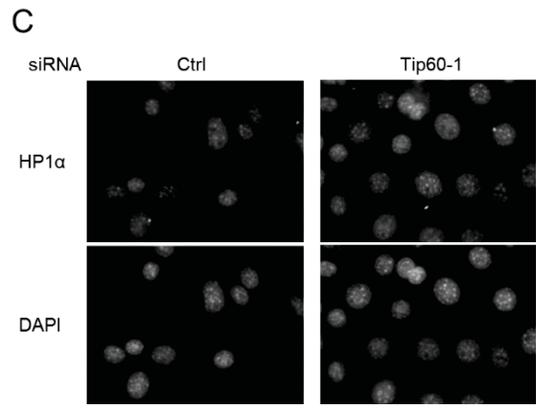
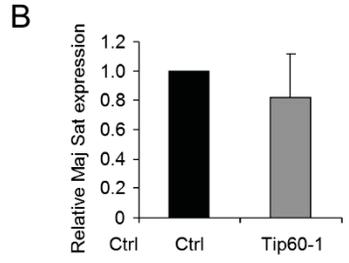
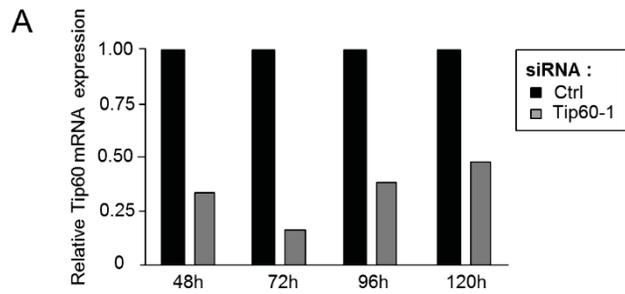
Figure 5: Tip60 expression is important for correct chromosome segregation in Suv39H^{-/-} cells

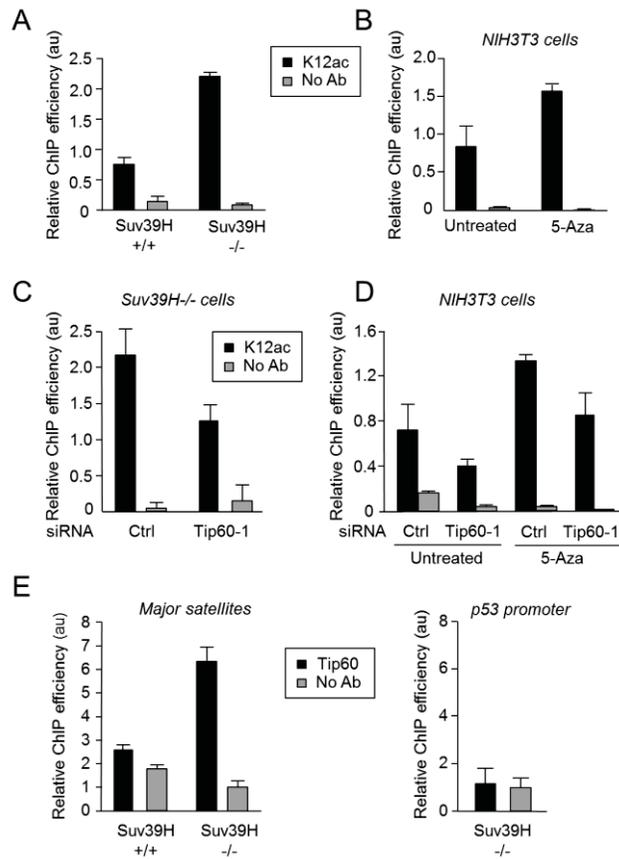
A) Metaphase spreads of Suv39H^{-/-} cells transfected by the indicated siRNA and blocked in mitosis, 6 days later, by colcemid treatment. The number of chromosomes in each metaphase plate is indicated (from 25 to 27 fields, representing 31 metaphases per condition ordered by number of chromosomes). Statistical analysis was performed using Chi2 test. Representative

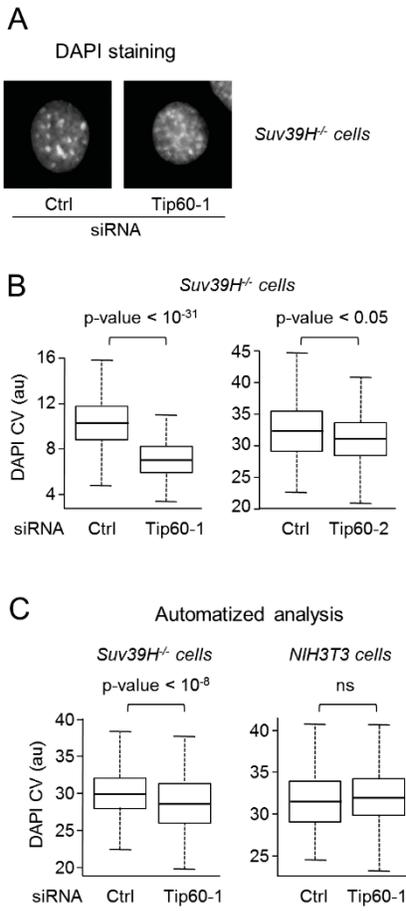
images illustrating cells with single or double chromosome numbers are shown. . B) Suv39H^{-/-} and NIH3T3 cells transfected, twice at 48 hours apart, by the indicated siRNA were harvested 7 days later. Cells were fixed and stained with propidium iodide and analysed by flow cytometry. C) Suv39H^{-/-} and NIH3T3 cells were transfected using Tip60 or control siRNA. 72 hours later, cells were fixed and stained with DAPI. Representative images are shown for Suv39H^{-/-} cells. The arrows point towards micronuclei. The graph corresponds to the quantification of three independent experiments with at least 100 cells analysed by conditions in each experiments. The mean and standard deviation are shown.

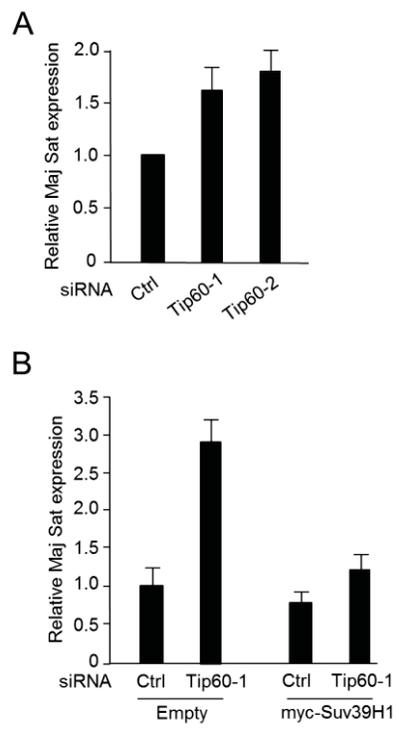
Figure 6: Tip60 function in heterochromatin is mediated by BRD2

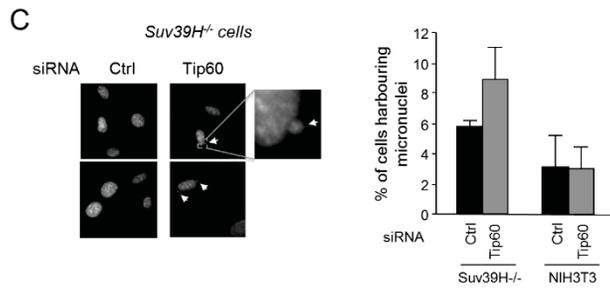
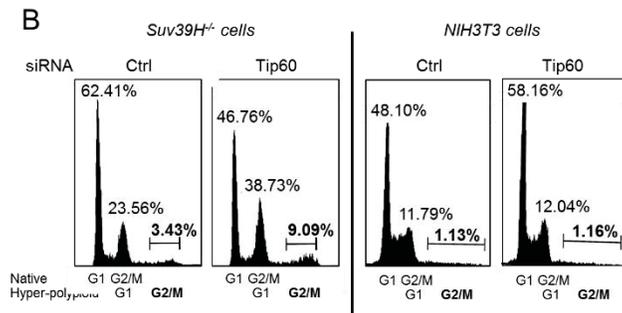
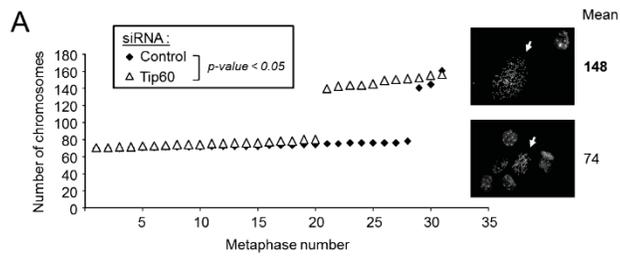
A) Suv39H^{-/-} cells were subjected to a ChIP assay using anti BRD2 antibodies or no antibody (No Ab) as a control. The presence of major satellite and β 2m sequences was quantified by qPCR in the immunoprecipitates and the inputs. The percentages of inputs from a representative experiment out of three are shown. Error bars represent standard deviation within technical triplicates. B) Suv39H^{-/-} cells were transfected using BRD2 or control siRNA. 72 hours later, cells were fixed and stained with DAPI. Representative images of cells are shown. DAPI CV from at least 100 cells by conditions was calculated manually (DAPI Coefficient of Variation) or automatically (DAPI Coefficient of Variance) using the Operetta device. Box plots represent the cell populations, with the median, the 50% and the 75% quantiles. The p-value of the difference between the two cell populations is indicated above the graphs. C) Suv39H^{-/-} cells were transfected using BRD2 or control siRNA. 72 hours later, cells were fixed and stained with DAPI. Representative images of cells are shown. The arrows point towards micronuclei. The graph corresponds to the quantification of three independent experiments with at least 100 cells analysed by conditions in each experiments. The mean and standard deviation are shown.

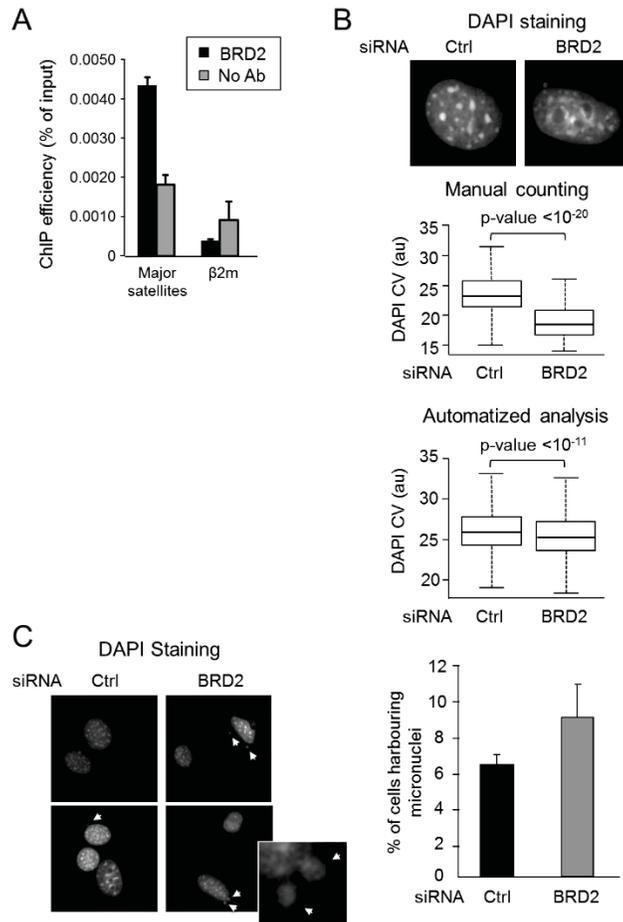












Supplementary Figures Legends

Figure S1 : Typical experiments monitoring the efficiency of the various siRNAs in the various experimental settings

A) Suv39H^{-/-} cells were transfected using Tip60-1, Tip60-2 or control siRNA. These siRNAs were described previously and shown to inhibit Tip60 RNA and protein expression (Chevillard-Briet *et al.*, 2014). After 72h, RNA was extracted and the presence of Tip60 and β 2m mRNAs were quantified by reverse transcription followed by qPCR. The amount of Tip60 mRNAs were divided by the amount of β 2m. Representative experiment is shown. Error bars represent standard deviation within technical triplicates. B) Suv39H^{-/-} cells were transfected using BRD2 or control siRNA. 72h later, cells were harvested and after nuclear extraction, western-blot analysis was realised with anti-BRD2 and anti-Actin antibodies. C) Suv39H^{-/-} cells or cells rescued for Suv39H1 expression were transfected by the indicated siRNA. 72 hours later, cells were harvested and the amount of Tip60, Suv39H1 and β 2m mRNAs were quantified by reverse transcription followed by qPCR. The amount of Tip60 or Suv39H1 mRNAs were divided by the amount of β 2m. Representative experiment is shown. Error bars represent standard deviation within technical triplicates.

Figure S2 : Tip60 depletion does not induce satellite expression upon 5-Aza treatment

NIH3T3 transfected using indicated siRNA were treated or not with 5-Aza 48h after transfection for 24 hours. RNA was extracted and the presence of satellite RNAs and β 2m mRNAs were quantified by reverse transcription followed by qPCR. The amount of satellite RNAs were divided by the amount of β 2m. Representative experiment is shown. Error bars represent standard deviation within technical triplicates.

Figure S3 : Increased number of cells harbouring micronuclei upon Tip60 knockdown using a different siRNA

Suv39H^{-/-} cells were transfected by the indicated siRNAs. 48 hours later, cells were harvested and the amount of cells harbouring micronuclei was quantified after DAPI staining and microscopy analysis. Two siRNAs (Ctrl, used elsewhere in this work, and Ctrl-2, described in supplemental procedures) targeting no messenger were used as control. Representative experiment is shown.

Figure S4 : Tip60 depletion stimulates the expression of LINE sequences in a Suv39H-dependent manner

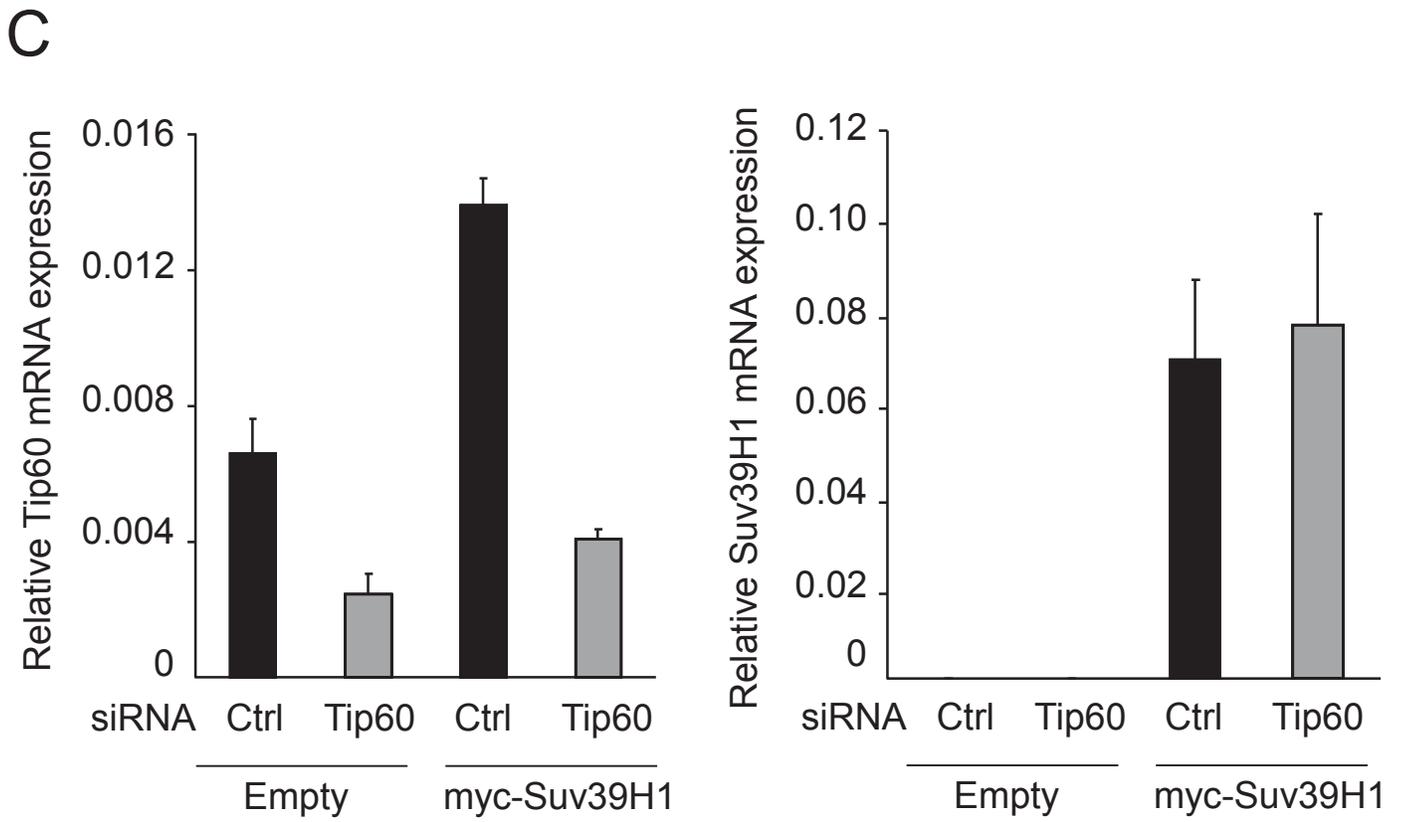
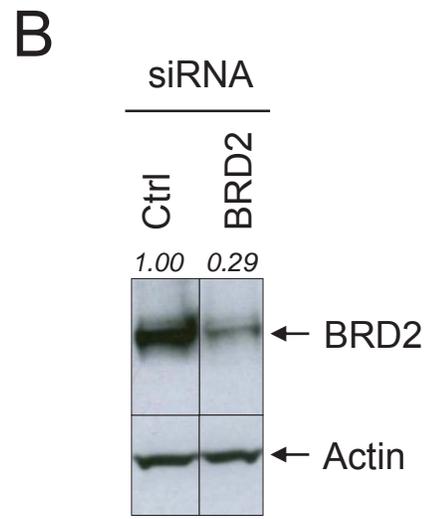
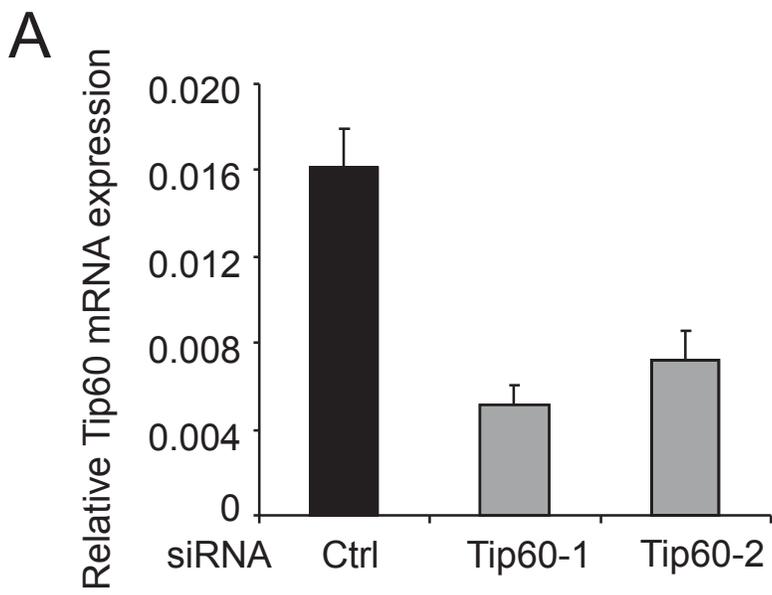
Suv39H^{-/-} cells or cells rescued for Suv39H1 expression were transfected by the indicated siRNA. 72 hours later, cells were harvested and the amount of LINES and β 2m mRNA were quantified by reverse transcription followed by qPCR. The amount of LINES were divided by the amount of β 2m. Representative experiment is shown. Error bars represent standard deviation within technical triplicates.

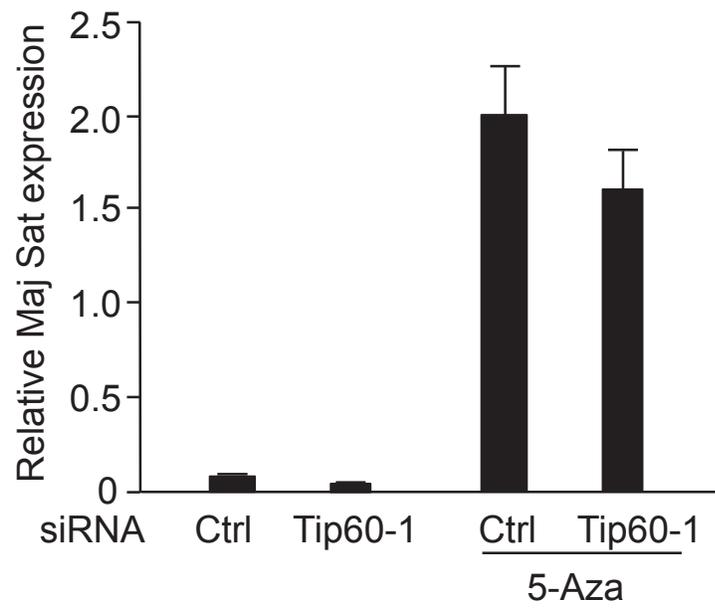
Figure S5 : BRD2 depletion does not affect satellite expression in Suv39H cells

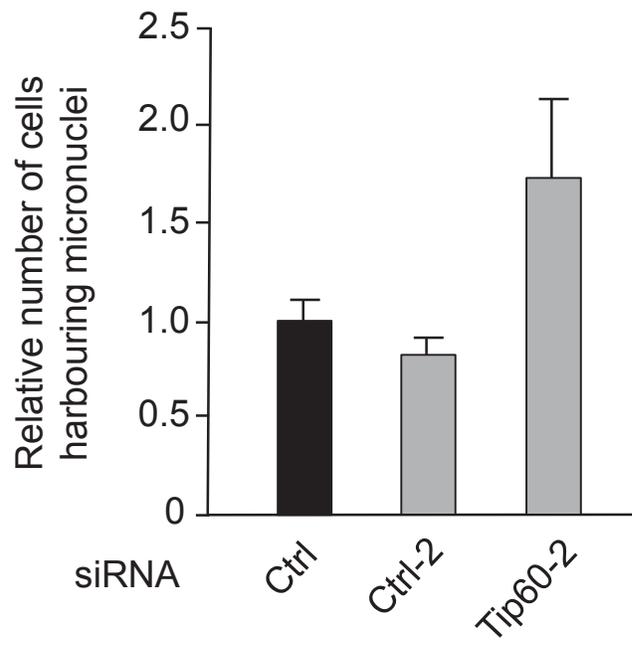
Suv39H^{-/-} cells were transfected using BRD2 or control siRNA. 72h later, cells were harvested and the presence of satellite RNAs and β 2m mRNA were quantified by reverse transcription followed by qPCR. The amount of satellite RNAs were divided by the amount of β 2m. The mean and standard deviation for 3 experiments are shown.

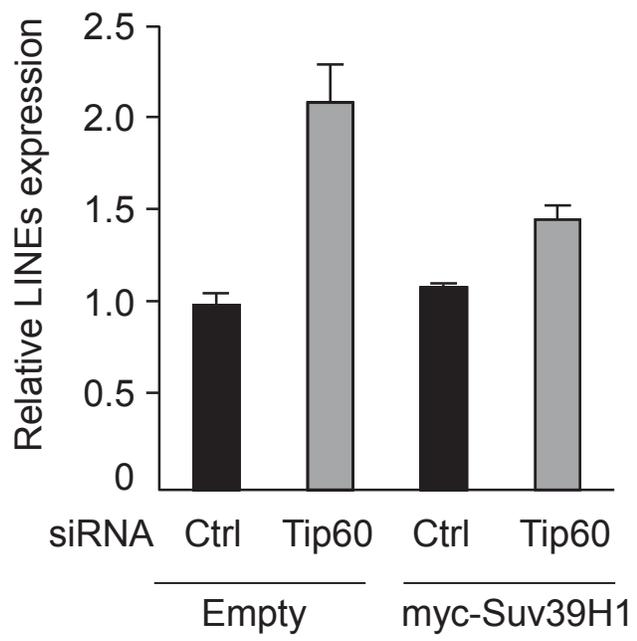
Figure S6 : H4K12 becomes hyperacetylated during late S phase

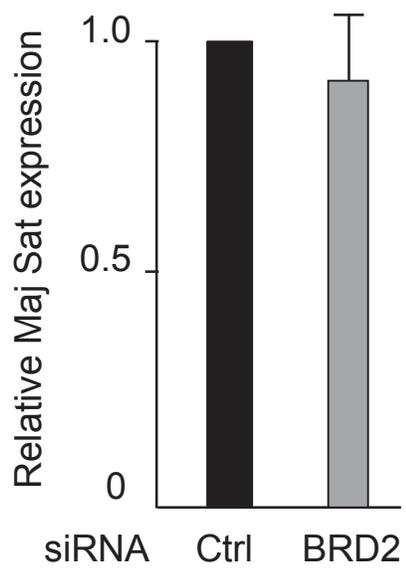
NIH3T3 cells were harvested by serum deprivation for 48h, then released in the cell cycle by serum addition, fixed 4, 9, 11 or 15h after serum addition and subjected to a ChIP assay using anti-H4K12Ac antibodies, anti-histone H3 antibody or no antibody (No Ab) as a control. The amounts of major satellite and β 2m sequences were quantified by qPCR in the immunoprecipitates and the inputs. The mean and standard deviation from two independent immunoprecipitations are shown.

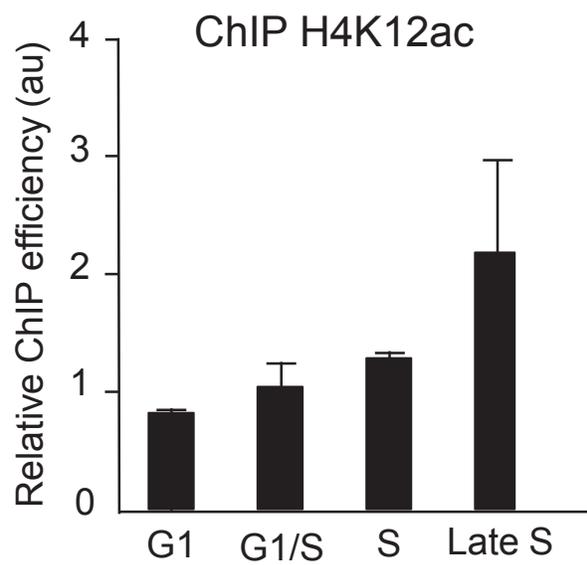












Supplemental Procedures

Western-blot analysis

Total cell lysates were prepared as previously described (Mattera *et al.*, 2009) and analysed in western-blot experiments using an anti-BRD2 antibody from Bethyl Laboratories.

Additional siRNA

The following additional siRNA was used in the micronuclei analysis :
Ctrl-2: CGUACGCGGAAUACUUCGA-dTdT

Expression des LINEs

Expression of LINEs was measured by RT-qPCR using the following primers :
5'-CACTCCCACCCACCTAGT-3' and 5'-TAACTCTTTAGCAGTGCTCTCCTGT-3'

Synchronisation of cells

Cells were synchronised by serum deprivation (medium complemented with 0.25% serum) during 48h, then released in the cell cycle by addition of complete medium containing 10% FBS.

*Mattera, L., Escaffit, F., Pillaire, M.J., et al. The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. (2009). **Oncogene**, 28, 1506-1517.*

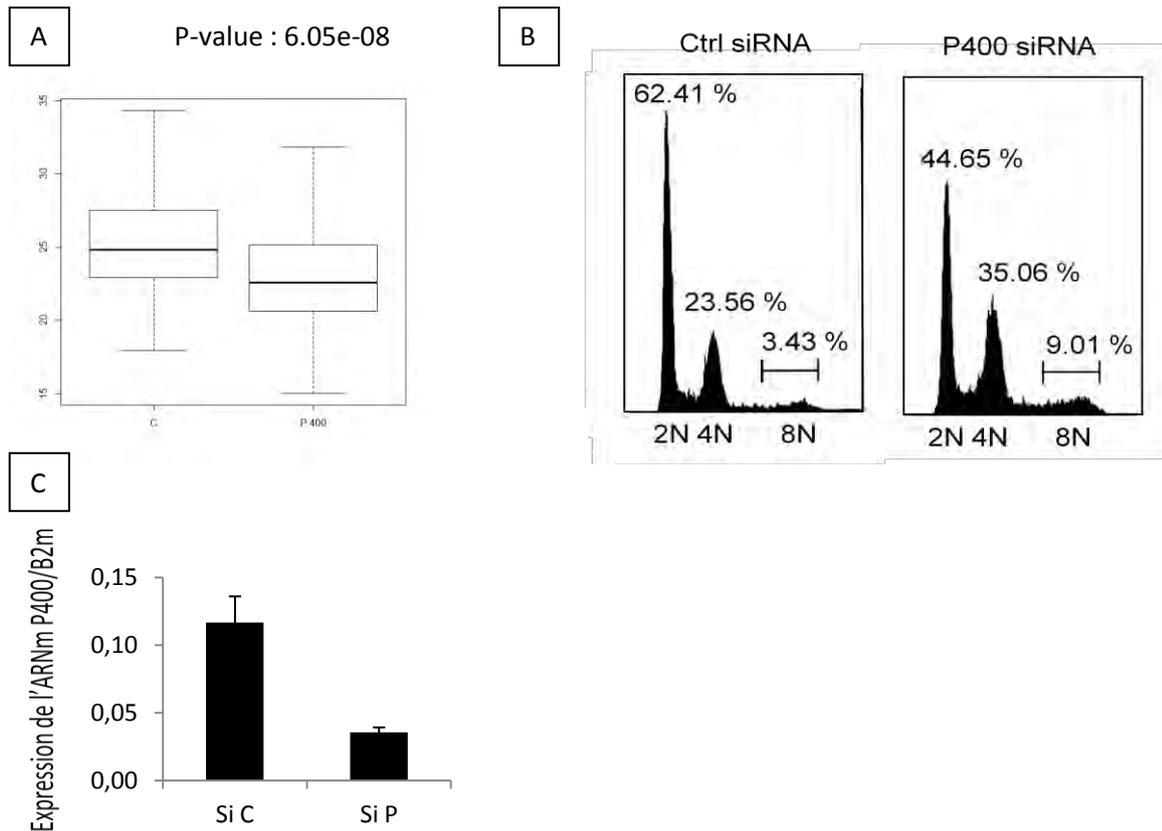


Figure 40 : P400 est impliquée dans la compaction des péricentromères dans les SUV39H ½ -/-. A) Quantification de l'hétérogénéité du marquage DAPI dans des noyaux de SUV39H ½ -/-, traités 48H avec un siRNA contrôle ou P400. Expérience représentative. B) Analyse du cycle cellulaire des cellules SUV39H ½ -/- traitées une dizaine de jours avec un siRNA contrôle ou P400. C) Efficacité du siRNA P400 dans les SUV39H ½ -/-. Analyse par QPCR du taux d'ARNm P400 normalisé par le taux d'ARNm B2m. Expérience représentative. Les barres d'erreur représentent des triplicats de QPCR.

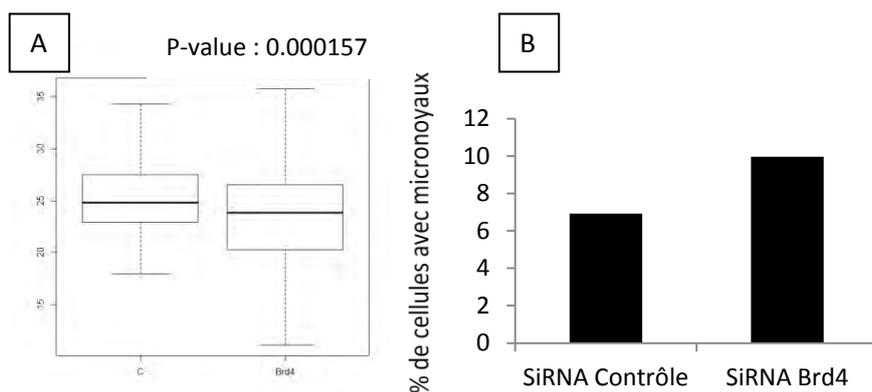


Figure 41 : BRD4 est impliquée dans la compaction des péricentromères dans les SUV39H ½ -/-. A) Quantification de l'hétérogénéité du marquage DAPI dans des noyaux de SUV39H ½ -/-, traités 48H avec un siRNA contrôle ou BRD4. Expérience représentative. B) Quantification du pourcentage de noyaux présentant des micro-noyaux dans des SUV39H ½ -/-, traités 48H avec un siRNA contrôle ou BRD4. Expérience représentative.

C Résultats complémentaires

• 1 Recrutement de TIP60 et mécanisme

Je démontre un rôle de TIP60 dans les péricentromères des cellules SUV39H ½ -/-. TIP60 est connue pour faire partie d'un complexe protéique, le complexe TIP60. En effet, *in vitro*, TIP60 a besoin de ce complexe pour acétyler des histones en contexte nucléosomal (Ikura et al. 2000). Afin d'évaluer la probabilité que TIP60 soit recrutée au sein de son complexe, j'ai voulu tester l'implication de l'ATPase P400, une sous-unité du complexe, dans les péricentromères des SUV39H ½ -/-. Après utilisation d'un siRNA P400, j'observe une décompaction des péricentromères lors d'un marquage en DAPI, et d'une analyse de l'hétérogénéité de ce dernier (Fig 40 A). Ainsi P400 est également impliquée dans la compaction de cette structure. J'observe également une accumulation de cellules en G2/M et une apparition de cellules polyploïdes visibles après marquage à l'iodure de propidium et analyse en cytométrie (Fig 40 B). Etant donné l'apparition de cette population polyploïde, l'accumulation des cellules en G2/M pourrait être une accumulation de G1 tétraploïdes. Ceci correspond à un phénotype d'anomalie de ségrégation chromosomique, que nous interprétons comme le reflet de l'anomalie de compaction. Ces phénotypes de décompaction et d'anomalies de ségrégation, sont ceux que j'observe après siRNA TIP60. Il semble donc que P400 soit impliqué dans cette structure, et il est fort probable que TIP60 soit recrutée au sein de son complexe. La présence de P400 soulève un certain nombre de questions quand à la mécanistique du complexe dans cette hétérochromatine, notamment à cause de son implication connue dans le reste du génome de mammifère dans l'incorporation du variant d'histone H2Az (cf discussion). Il serait intéressant d'analyser l'impact du siRNA P400 sur la présence du variant d'histone H2Az dans cette structure.

Le mécanisme que nous proposons est le recrutement de BRD2 via l'acétylation d'H4K12. En effet, BRD2 est connu pour se lier à cette marque. Néanmoins j'ai également testé l'effet du siRNA BRD4 sur cette structure. De manière similaire au siRNA BRD2, j'observe après marquage au DAPI une décompaction des péricentromères (Fig 41 A), ainsi qu'une augmentation de la quantité de noyaux ayant généré des micronoyaux à leur pourtour (Fig 41 B). Ainsi, une implication de BRD4 dans cette structure est également à envisager. En revanche, que ce soit après utilisation d'un siRNA BRD2 ou BRD4, je n'observe ni accumulation en G2/M, ni apparition d'une population polyploïdes par analyse en cytométrie.

Chez la levure *S.pombe*, Mst1 met en place l'acétylation d'H3K4 au niveau des péricentromères, et ce en fin de phase S, participant à la recompaction de l'hétérochromatine (Xhemalce and Kouzarides 2009).

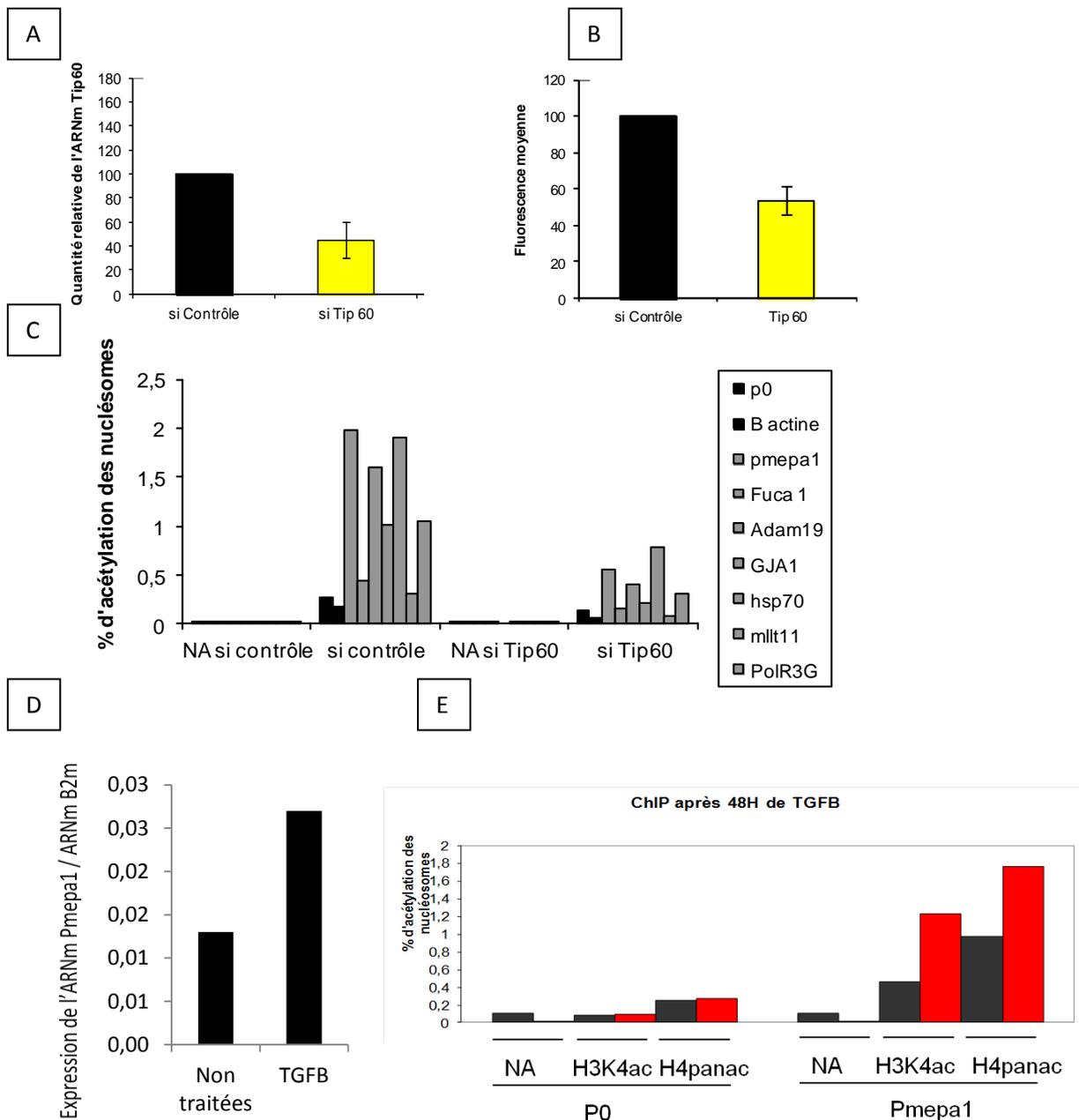


Figure 42 : TIP60 est impliquée dans la mise en place de l'acétylation d'H3K4, corrélée à l'activation transcriptionnelle dans les U2OS. A) Efficacité du siRNA TIP60 dans les U2OS. Anayse par QPCR du taux d'ARNm TIP60 / ARNm B2M après traitement des U2OS avec un siRNA TIP60 pendant 48H. Moyenne de 3 expériences. B) Analyse de la fluorescence globale avec ImageJ, du marquage en IF H3K4ac. Moyenne de 3 expériences. C) ChIP d'H3K4ac, normalisé par H3, sur les promoteurs de gènes dont l'expression n'est pas régulé par TIP60 (en noir), ou de gènes dont l'expression est régulé par TIP60 d'après des expériences de puces à ADN réalisées dans l'équipe (en gris), après traitement des U2OS avec un siRNA TIP60 pendant 48H. NA : No antibody. Expérience représentative. D) Anayse par QPCR du taux d'ARNm Pmpa1 / ARNm B2M après traitement des U2OS au TGFB-1 (10ng/ml) pendant 48H. Expérience représentative. E) ChIP sur les promoteurs de P0 ou Pmpa1 sur des cellules non traitées (gris foncé) ou traitées 48h au TGFB-1 (rouge). Expérience représentative.

Ainsi, une mise en place d'H3K4ac par TIP60 au niveau des péricentromères chez les mammifères, pourrait être un mécanisme à étudier. Or H3K4, n'est pas connu chez les mammifères comme une cible *in vivo* de TIP60. Afin de tester l'implication de TIP60 sur cette acétylation dans des cellules de mammifères, j'ai utilisé un siRNA TIP60 dans des cellules humaines U2OS, et analysé l'intensité du marquage H3K4ac en immunofluorescence, ainsi qu'en CHIP sur des promoteurs de gènes régulés par TIP60 (Fig 42 A/B). Ainsi, après siRNA TIP60, j'observe une diminution de l'intensité du marquage globale dans le noyau des cellules en immunofluorescence, ainsi qu'une baisse de l'enrichissement d'H3K4ac détecté en CHIP au niveau des promoteurs. L'acétylation d'H3K4 est donc dépendante de l'expression de TIP60, suggérant que TIP60 participe à cette acétylation dans les cellules humaines.

H3K4ac est une marque associée à la compaction de l'hétérochromatine des péricentromères chez la levure. La méthylation du même résidu est clairement impliquée dans l'activation transcriptionnelle à travers les espèces, et deux modifications sur un même résidu sont mutuellement exclusives. Ces différents arguments peuvent laisser imaginer qu'H3K4ac pourrait participer à un phénomène de répression transcriptionnelle. En effet, peu de données existent sur H3K4ac, même si cette marque a été associée via des analyses en CHIP-seq à l'activation transcriptionnelle dans des cellules humaines (Wang et al. 2008). J'ai sélectionné un gène, *pmepa1*, qui d'après des puces à ADN réalisées dans l'équipe, est réprimé (de manière directe ou indirecte) par TIP60 dans les U2OS, et qui a la propriété d'avoir une expression inductible. Ainsi, après traitement des cellules au TGF β , j'observe une augmentation de l'expression de ce gène. J'ai alors analysé la présence d'H3K4ac et de l'acétylation globale d'H4 (H4 pan-ac) au niveau de son promoteur lors de son induction. Or, le résultat de cette expérience corréle la présence H3K4ac à l'activation de la transcription.

Finalement, afin de tester la présence d'H3K4ac au niveau des péricentromères, une immunofluorescence a été réalisée sur des cellules de souris. Je n'observe alors pas d'enrichissement au niveau des péricentromères, voir une exclusion. Ces résultats ont été obtenus avec un anticorps de chez Millipore. L'utilisation d'un autre anticorps anti-H3K4ac, de chez Diagenode, à savoir celui utilisé dans l'étude chez *S.pombe* (Xhemalce and Kouzarides 2009), ainsi qu'un anticorps de chez Active Motif, révèlent un enrichissement dans cette structure dans certaines cellules (Fig 43 A). Dans l'étude chez *S.pombe* qui utilise l'anticorps de chez Diagenode, le signal en Western-blot sur des extraits nucléaires de souches mutantes H3R4, révèle toujours un léger marquage. Egelhofer et al. ont testé la spécificité de l'anticorps Millipore sur une puce à peptides synthétiques et n'ont pas vu de signal non spécifique, mais ce test n'est pas exhaustif (Egelhofer et al. 2011). Dans l'étude en CHIP-seq liant H3K4ac à l'activation transcriptionnelle, l'anticorps utilisé, de chez Upstate, révèle une réaction croisée avec H3K9ac (Wang et al. 2008). Un anticorps anti-H3K4ac généré par Garcia *et al.* et

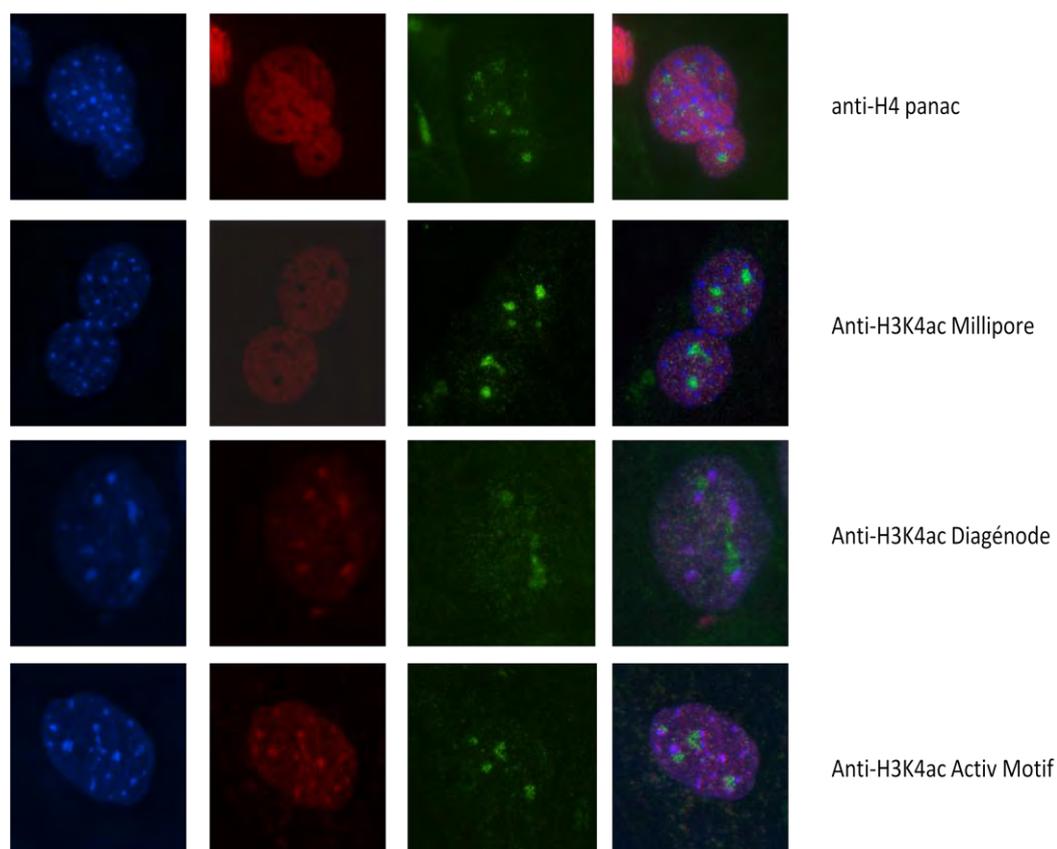


Figure 43 : Comparaison des anticorps anti-H3K4ac. Marquage en immunofluorescence H3K4ac, ou H4-pan ac (acétylation globale de l’histone H4, abcam, rouge), RPA 194 (sous-unité de la polymérase I qui marque les nucléoles, Santa Cruz, vert) et DAPI (bleu) sur des MEFs sauvages. Les anticorps anti-H4-Pan ac, et anti-H3K4ac de chez Millipore montrent un marquage plutôt exclu des chromocentres visibles en DAPI, alors que les anticorps anti-H3K4ac de chez Diagenode et Active Motif y montrent un signal enrichi dans un certain nombre de noyaux.

validé dans une étude de Eot-Houllier *et al.*, semble être spécifique de cette marque, mais je ne l'ai pas testé (Garcia et al. 2007),(Eot-Houllier et al. 2009). Ainsi, H3K4ac reste une piste à creuser dans le mécanisme d'un rôle de TIP60 dans les péricentromères chez les mammifères, mais de manière générale, le manque de spécificité des anticorps anti-H3K4ac a représenté un réel problème dans mon travail sur cette marque.

- **2 Voie TIP60-H4K12ac et cancers**

La voie H4K12ac-TIP60 mise à jour dans les SUV39H ½ -/- pourrait être une voie « back-up » dans différents cas de déstructuration des péricentromères. En effet, H4K12ac est également enrichie dans les NIH3T3 traitées à la 5-azacytidine, et y est affectée par la diminution de l'expression de TIP60 par siRNA (cf publication). Des anomalies de l'hétérochromatine péricentromérique ont été décrites dans certaines lignées cancéreuses, et on pourrait retrouver cette voie dans des lignées aux péricentromères anormaux, ce qui serait cohérent avec la fonction suppresseur de tumeur de TIP60 (cf discussion). Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé des immunofluorescence anti-H4K12ac sur un certain nombre de lignées cancéreuses. Le DAPI ne permettant pas la visualisation directe des chromocentres dans les cellules humaines, j'ai utilisé un marquage à l'aide d'un anticorps anti-HP1 alpha (euromedex) pour marquer les péricentromères. J'ai utilisé les lignées T24 (cancer de la vessie), MDAMB436 et MDAMB231 (lignées cancéreuses mammaires), Jeg3 (choriocarcinome placentaire), HT1080 (Fibrosarcome), U2OS (cancer osseux), Caco (cancer colorectal) et Miapaca (cancer du pancréas). J'ai utilisé en parallèle une lignée de fibroblastes humains primaires, les WI38, comme contrôle négatif, et des cellules SUV39H ½ -/-, comme contrôle positif. La lignée HT1080 a été sélectionnée, en raison de la perte de H3K9me3 décrite au niveau de ces centromères (Slee et al. 2012), la lignée U2OS, en raison de son hypométhylation dans cette même région, et la lignée Miapaca, car la surexpression des séquences satellites a été décrite dans des cancers pancréatiques (Ting et al. 2011). Bien que des foyers ont été détectés correctement dans les SUV39H ½ -/-, aucune des lignées testées n'a révélé de foyers H4K12ac colocalisant avec le signal HP1alpha marquant les péricentromères. Un marquage H4K8ac dans les SUV39H ½ -/- ne révèlent pas de foyers, appuyant la spécificité d'H4K12ac dans cette structure.

Si on pose l'hypothèse que la voie TIP60-H4K12ac est présente dans les péricentromères déstructurés, on peut étendre sa présence à de nombreux cas, physiologiques ou pathologiques (cf discussion). La sénescence est un destin cellulaire, au cours duquel des déstructurations des péricentromères ont été décrites (Gaubatz and Cutler 1990),(Suzuki et al. 2002),(Swanson et al. 2013). Une augmentation du satellite 3 a été décrite dans un cas de sénescence répllicative dans des cellules humaines (Enukashvily et al. 2007).

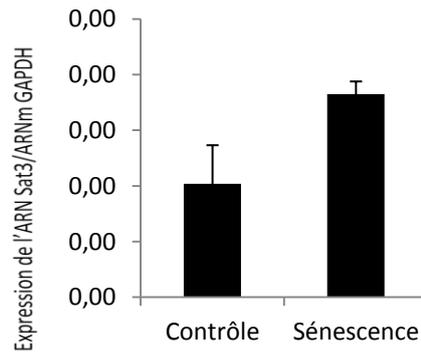


Figure 44 : Expression du satellite 3 du chromosome 1 lors d'une sénescence induite par un oncogène. Analyse par QPCR du taux d'expression du satellite 3 normalisé par le taux d'expression de GAPDH, après des RT brins-spécifiques selon le protocole de (Lazorthes et al. 2015), sur des cellules induites ou non en sénescence (modèle cellulaire et méthodologie de (Jeanblanc et al. 2012))

A

	NIH3T3		SUV39H1/2 -/-	
	SiC	Si TIP60	SiC	Si TIP60
G1	48,1	58,16	62,41	46,76
G2	11,79	12,04	23,56	38,73
S	40,11	29,8	14,03	14,5
polyplöides	1,13	1,16	3,43	9,09

B

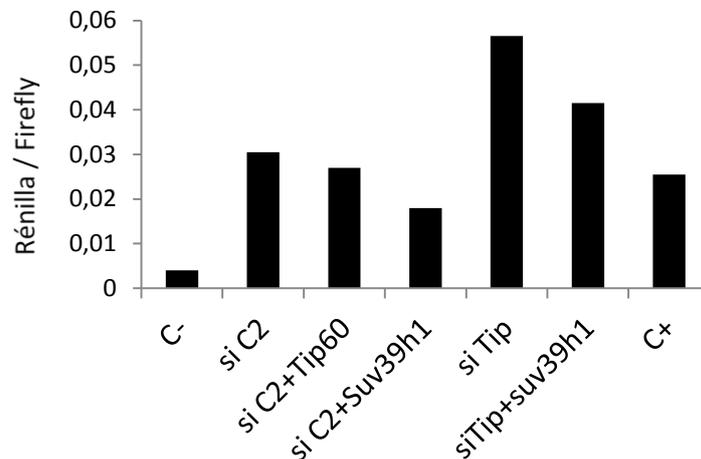


Figure 45 : Hypothèse de titration de TIP60 par les péricentromères. A) Analyse de cycle en cytométrie, après une semaine environ sous siRNA. En vert, le siRNA provoque une augmentation du nombre de cellules dans la phase concernée, en rouge une diminution. B) Analyse par lecture au luminomètre du rapport renilla/Firefly d'une activité Luciférase rapportrice de la voie Wnt (Kit Sigma), après siRNA Contrôle ou TIP60, avec ajout de différents vecteurs comme indiqués ou vecteur vide. Expériences représentatives.

Dans l'équipe, est utilisé un modèle de sénescence induite par un oncogène, dans des lignées primaires humaines, où un traitement par une drogue, permet d'induire l'expression de l'oncogène Raf, et l'entrée en sénescence (Jeanblanc et al. 2012). J'ai ainsi pu analyser l'expression du satellite 3 dans ces cellules, et observer une induction similaire à celle publiée dans le cas de la sénescence répliquative (Fig 44). Il serait intéressant d'étudier la présence d'H4K12ac au niveau des péri-centromères de ces cellules.

- **3 Impact du recrutement de TIP60 : hypothèse de titration**

Les séquences péri-centromériques représentent une proportion importante du génome (environ 10% chez la souris). TIP60 est recrutée sur ces séquences dans les cellules SUV39H ½ -/-. Or TIP60 est considérée comme une protéine faiblement exprimée. On peut imaginer que son recrutement sur ces séquences répétées provoque une titration importante de TIP60, et peut éventuellement affaiblir ses fonctions dans le reste du noyau. J'ai comparé la répartition dans le cycle cellulaire des NIH3T3 et des SUV39H ½ -/-, traitées ou non avec un siRNA contrôle ou TIP60. Les cellules SUV39H ½ -/- présentent une augmentation de la quantité de cellules en G2/M, et une apparition d'une population polyploïde. Cet effet est cohérent avec une déstructuration des péri-centromères. Après siRNA TIP60 dans ces cellules, j'observe une exacerbation de ce phénotype, que nous expliquons par le rôle de TIP60 aux péri-centromères de ces cellules (cf publication). Dans les NIH3T3, le siRNA TIP60, ne provoque pas cet effet, mais une légère accumulation des cellules en G1 (Fig 45A). TIP60 est en effet recruté sur les gènes cibles de E2F, participant à leur régulation, et ainsi à la transition G1/S, ce qui pourrait expliquer cet effet. Le fait de ne pas observer d'accumulation en G1 dans les SUV39H ½ -/- après siRNA TIP60, pourrait être le reflet de la titration de TIP60 par les péri-centromères, qui l'empêche dans ces cellules de participer à cette transition.

Un certain nombre de phénotypes pourraient être analysés de la sorte. Nous avons voulu tester cette hypothèse sur la régulation de la voie de signalisation Wnt, à l'aide d'un essai luciférase rapporteur de l'activité de cette voie. Ainsi, nous montrons que TIP60 est un répresseur de la voie de signalisation Wnt (cf partie 3). Dans les cellules SUV39H ½ -/-, une surexpression de TIP60 par ajout d'un vecteur entraîne bien une légère mais reproductible diminution de l'activité de la voie. La surexpression de SUV39H ½ -/- provoque également une diminution, ce qui est cohérent avec un relargage de TIP60 depuis les péri-centromères vers le reste du noyau (évidemment nous ne pouvons pas exclure un rôle direct de SUV39H, directe ou indirecte sur l'activité de la voie, TIP60-indépendant). Finalement la ré-expression de SUV39H contrebalance en partie l'effet du siRNA TIP60 sur la levée de répression de la voie (Fig 45B).

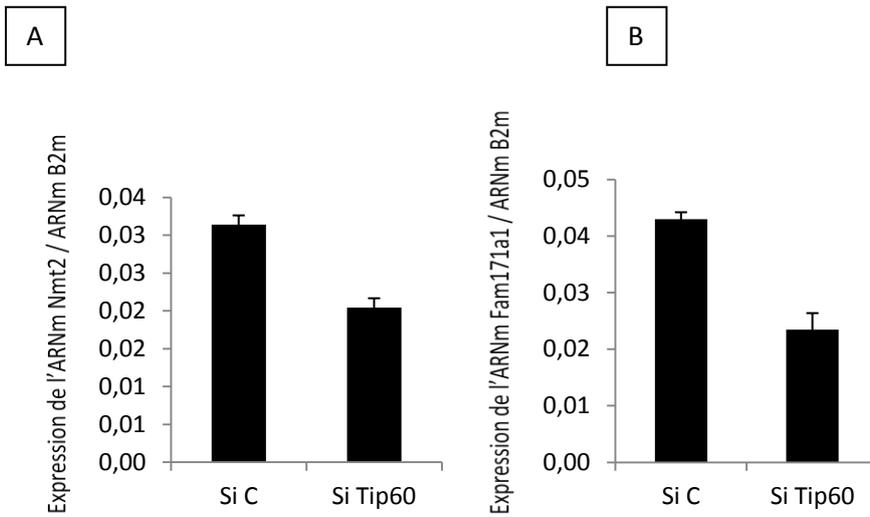


Figure 46 : Expression de deux gènes à la frontière de l'hétérochromatine péricentrique dans les *SUV39H* ½ -/-. Analyse en QPCR du taux d'ARNm Nmt2 (A), ou Fam171a1 (B), rapporté sur le taux d'ARNm de B2m, après 48h sous siRNA Contrôle ou TIP60. Expérience représentative. Les barres d'erreurs représentent les écart-types de triplicats de QPCR

Ainsi, bien que ces expériences ne permettent pas de conclure quand à cette hypothèse, elles sont encourageantes pour continuer l'investigation. En effet, une titration de TIP60 dans les péricentromères déstructurés pourrait être intéressante dans le cadre du processus de transformation des cellules cancéreuses (cf discussion).

- **4 Frontières de l'hétérochromatine**

Nous mettons à jour une voie TIP60-H4K12ac dans les cellules SUV39H1/2 $-/-$. Il n'est cependant pas exclue que cette voie soit présente dans des cellules normales, peut-être de manière restreinte à un cadre spatio-temporel précis (cf discussion). De nombreux liens bibliographiques existent entre le complexe TIP60, les protéines à double bromodomaines et les frontières hétérochromatiniennes. Afin de tester cette hypothèse, j'ai choisi au hasard deux gènes localisés à proximité des péricentromères d'après le www.Ensembl.org, tous les deux sur le chromosome 2, Nmt2 (situé à 0.30 Mb de la limite de l'hétérochromatine), et Fam171a1 (situé à 0,1Mb). J'ai analysé leur expression après siRNA TIP60 dans les SUV39H $\frac{1}{2}$ $-/-$, et observe une diminution de leur expression (Fig 46). Il serait intéressant d'étendre cette démarche à un plus grand nombre de gènes, et ce après siRNA TIP60, P400, H2AZ, BRD2 et BRD4, dans les SUV39H $\frac{1}{2}$ $-/-$, avec ou sans l'ajout d'un vecteur SUV39H $\frac{1}{2}$ $-/-$, ou dans les NIH3T3.

Partie 2 : Antagonisme de TIP60/P400 dans la régulation de la carcinogenèse colorectale

Dans cette étude, nous confirmons le rôle de TIP60 en tant que suppresseur de tumeur in vivo, mais cette fois dans le contexte de la tumorigenèse colique chimio-induite chez la souris. Nous expliquons cet effet par le contrôle TIP60-dépendant d'une voie de signalisation cruciale pour la physiologie de l'épithélium intestinal : la voie Wnt. Nous montrons également un antagonisme fonctionnel entre TIP60 et P400 dans la progression tumorale, qui découle des effets opposés qu'exercent les deux facteurs dans la régulation de la voie Wnt. En effet, un siRNA P400 contrebalance les effets du siRNA TIP60 sur l'activation de cette voie.

A Introduction

• 1 TIP60 est un suppresseur de tumeur dans le cadre du cancer colorectal

En 2007, TIP60 est définie pour la première fois comme une protéine suppresseur de tumeur haploinsuffisante chez la souris (Gorrini et al. 2007). En effet, face à l'induction de l'expression de l'oncogène Myc, les souris hétérozygotes TIP60 développent plus de lymphomes que des souris sauvages. Ce phénomène est expliqué par le rôle de TIP60 dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR, DNA Damage response). L'hétérozygotie pour TIP60 affectant cette réponse face au stress induit par l'expression de myc, mène à cette augmentation de la tumorigenèse. Ici, nous démontrons une nouvelle fois que TIP60 est un suppresseur de tumeur, *in vivo*, mais cette fois dans le cadre du cancer colorectal. En effet, les souris TIP60 +/- présentent plus de lésions préneoplasiques (ACF, Aberrant Crypt Foci) et d'adénomes sur la muqueuse colique que les souris sauvages, suite à un traitement par l'azoxyméthane (AOM), un puissant carcinogène colique. Cette effet de suppresseur de tumeur est ici du au rôle de TIP60 sur la répression de la voie de signalisation Wnt, voie bien connue pour être au cœur du processus de tumorigenèse dans le cancer colorectal (Sebio et al. 2014). Il est à noter que ce rôle comme répresseur de la voie Wnt, et donc de ses gènes cibles, est un exemple de répression transcriptionnelle par TIP60, ici indirecte via l'inhibition de la voie Wnt.

- **2 Antagonisme TIP60/P400**

En 2009, notre équipe avait démontré que plus qu'une simple diminution d'expression de TIP60, c'est en fait le ratio d'expression TIP60/P400 qui est systématiquement dérégulé en faveur de P400, dans tous les cas de tumeurs de patients testés, et ce indépendamment de leur stage et de leur grade (Mattera et al. 2009). Ceci indique que le déséquilibre ainsi induit, apparaît très précocement au cours du processus de tumorigenèse et serait causal pour la pathologie. De manière intéressante, nous avons observé que, dans un modèle doublement hétérozygote, l'hétérozygotie pour P400 contrebalance les effets de la perte de TIP60 sur l'apparition des ACFs. Nous avons donc ici un effet observable *in vivo* dans un processus de tumorigenèse de l'antagonisme TIP60/P400. Ainsi, nous avons montré un effet positif de P400 sur l'activation de la voie de signalisation Wnt, et TIP60, un effet négatif. Du point de vue mécanistique, nous avons montré que le rôle répresseur de TIP60 sur cette voie est dû à la modulation négative de la stabilité et de la fonction d'une de ces composantes, la β -caténine. P400, quant à lui, régule positivement la transcription des gènes cibles de la voie Wnt, essentiellement par liaison directe sur leurs promoteurs, mais aussi via des mécanismes plus indirects comme la répression d'inhibiteurs de la voie Wnt. En effet, des puces d'expression après siRNA P400 dans des lignées de cancers colorectaux humains, les HCT116, nous ont permis d'identifier ces régulations. J'ai participé à cette étude en réalisant des ChIPs P400, qui ont ensuite été hybridées sur des puces, et qui ont permis de montrer la liaison directe de P400 au niveau des promoteurs de ces différents gènes d'intérêts. J'ai ensuite réalisé de nouvelles ChIPs indépendantes, afin de valider par QPCR, les résultats obtenus sur les puces pour un certains nombres de gènes, permettant d'expliquer le mécanisme d'action de P400 dans la régulation positive de cette voie, et dans son antagonisme sur les effets de TIP60.

B Publication

Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling

Martine Chevillard-Briet^{1,2,†}, Muriel Quaranta^{1,2,†}, Aude Grézy^{1,2}, Lise Mattera^{1,2}, Céline Courilleau^{1,2}, Magali Philippe^{1,3}, Pascale Mercier^{1,3}, Denis Corpet⁴, John Lough⁵, Takeshi Ueda⁶, Rikiro Fukunaga⁷, Didier Trouche^{1,2,†} and Fabrice Escaffit^{1,2,†,*}

¹Université de Toulouse, UPS, F-31062 Toulouse, France, ²CNRS; LBCMCP, F-31062 Toulouse, France, ³CNRS; IPBS; Anexplo-Service de transgénèse, F-31077 Toulouse, France, ⁴Université de Toulouse; INP-ENVT INRA-ToxAlim, F-31076 Toulouse, France, ⁵Department of Cell Biology, Neurobiology and Anatomy, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA, ⁶Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima, Japan and ⁷Osaka University of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Biochemistry, Osaka, Japan

Received October 14, 2013; Revised and Accepted November 25, 2013

Cancer progression is associated with epigenetic alterations, such as changes in DNA methylation, histone modifications or variants incorporation. The p400 ATPase, which can incorporate the H2A.Z variant, and the Tip60 histone acetyltransferase are interacting chromatin-modifying proteins crucial for the control of cell proliferation. We demonstrate here that Tip60 acts as a tumor suppressor in colon, since mice heterozygous for Tip60 are more susceptible to chemically induced preneoplastic lesions and adenomas. Strikingly, heterozygosity for p400 reverses the Tip60-dependent formation of preneoplastic lesions, uncovering for the first time pro-oncogenic functions for p400. By genome-wide analysis and using a specific inhibitor *in vivo*, we demonstrated that these effects are dependent on Wnt signaling which is antagonistically impacted by p400 and Tip60: p400 directly favors the expression of a subset of Wnt-target genes and regulators, whereas Tip60 prevents β -catenin acetylation and activation. Taken together, our data underline the physiopathological importance of interplays between chromatin-modifying enzymes in the control of cancer-related signaling pathways.

INTRODUCTION

Cancer progression is accompanied by alterations that allow the activation of pro-oncogenic pathways and inactivate anti-cancer barriers. These alterations can be genetic, such as point mutations, allele amplification or loss, translocations, but also epigenetics. These epigenetic modifications include DNA methylation on specific promoters/enhancers (1), which is known for long to induce the transcriptional silencing of tumor suppressors encoding genes, and also modifications of chromatin structure such as histone posttranslational modifications or histone variants incorporation (for review, see (2–4)). Consequently, chromatin-modifying enzymes that set up these modifications are frequently mutated or aberrantly expressed in cancer (for review, see (4)).

The histone acetyltransferase Tip60 has been shown to act as a haplo-insufficient tumor suppressor, since heterozygous Tip60^{+/-} mice are more sensitive to lymphoma genesis upon c-Myc activation (5). Tip60 is required for the efficient activation of the DNA damage response (DDR) pathways (5,6) and its roles in ATM (7,8) and p53 (9–11) acetylation have been described as crucial events for DDR signaling and anti-proliferative cell fate, respectively.

Tip60 belongs to a multimolecular complex containing several other chromatin modifying enzymes, such as the p400 ATPase, which mediates the incorporation of the histone variant H2A.Z (12). We and others (6,13,14) have shown that Tip60 and p400 can have antagonistic functions in some situations (14,15). This relationship has a critical impact on the

*To whom correspondence should be addressed at: LBCMCP-UMR5088-CNRS, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France. Tel: +33 561558184; Fax: +33 561556507; Email: fabrice.escaffit@univ-tlse3.fr

[†]Equal contributions.

proliferation of colon tumor cell lines in culture (6) and the p400/Tip60 ratio is systematically altered in human colorectal tumors, in favor of p400, independently of the grade and the stage of the tumor. This imbalance greatly alters the sensitivity of cancer cell lines to apoptosis *in vitro*.

Colorectal carcinogenesis is a complex multistep process that includes changes in histomorphological appearance of the colonic mucosa and deregulations at molecular level. Some critical mutations impacting key regulatory pathways have been identified in the tumorigenesis of both inherited and sporadic colorectal cancers (for review, see (16)). APC, KRAS and p53 genes are the major mutated oncogenes or tumor-suppressor genes, impairing the function of Wnt/ β -catenin, tyrosine kinase receptors and DDR signaling pathways, respectively. In addition, several other mutations have also been uncovered that affect important mechanisms such as DNA repair (MLH1, MSH2, etc.), TGF- β response (DCC, SMADs, etc.) or apoptosis (PTEN, BAX, etc.) ((16) and references therein).

In regard to their histopathological features as well as their biological, histochemical, genetic and epigenetic deregulations, Aberrant Crypt Foci (ACF) are now considered as the earliest preneoplastic lesions that can be seen in the colonic mucosa (for review, see (17,18)). ACF were first described on examination of methylene-blue-stained colonic mucosa of azoxymethane (AOM)-treated mice under light microscopy. The carcinogen AOM has been extensively used to study colonic carcinogenesis and chemoprevention (19,20). The AOM-induced colon tumors recapitulate many features associated with the progression of human sporadic colorectal cancers (21,22). Indeed, AOM initiates mutations in crucial genes controlling cell proliferation, such as *KRAS* or *CTNNB*, thereby activating colon cancer-related pathways (23). Finally, long-term feeding of rats with various fat diets modulates the AOM-induced colon carcinogenesis through Wnt/ β -catenin signaling. Thus, such *in vivo* model is of functional relevance to study early steps of colon tumorigenesis.

The activation of Wnt pathway is not sufficient to induce tumorigenesis, if barriers against malignant transformation remain active (24). Indeed, upon repression of Casein kinase α , a critical partner of the β -catenin-destruction complex, a massive activation of Wnt signaling is observed without causing malignant transformation since the p53 pathway is able to counteract the pro-tumorigenic effects of Wnt activation by increasing DDR (24) and thus, promoting subsequent anti-proliferative effects (25). Considering the crucial role of Tip60 in the p53 pathway and in the DDR activation (7, 10), we intended here to characterize the impact of the Tip60/p400 imbalance on the Wnt-involving colon tumorigenesis. Thus, our study brings important new insights to the continuously growing field of epigenetics and cancer (2).

RESULTS

P400 and Tip60 antagonistically control colon cancer progression

We previously showed that the p400/Tip60 ratio is modified in colon cancer (6), antagonistically impacting the viability of colon cancer cells, at least in culture conditions. To test whether such deregulations could be causal for cancer

progression, we intended to characterize the impact of the Tip60/p400 imbalance on early steps of colon tumorigenesis *in vivo*. To that goal, we used mutant mice models harboring Tip60 (5, 26) or p400 (27) heterozygosities (the homozygous genotype being lethal in both cases) and we crossed them to generate double heterozygous mice (Supplementary Material, Fig. S1). Importantly, we did not observe any Tip60 $^{-/-}$ or p400 Δ/Δ homozygotes indicating that, although Tip60 and p400 have antagonistic functions, the depletion of one of them does not rescue the lethality observed upon inactivation of the other one.

We first analyzed the susceptibility of heterozygous mice to the formation of ACF, which are well-known preneoplastic lesions (18); we tested the appearance of such lesions upon administration of AOM (28), a compound commonly used to evaluate the susceptibility to preneoplastic lesions formation and early colon tumorigenesis (20, 29). In the Tip60 $+/-$ and/or p400 $+/\Delta$ mice strains, no spontaneous tumor-associated phenotype is observed, neither in the colon or elsewhere. Moreover, no ACF is found in young (6 weeks) or old (18 months) mice, indicating that heterozygosity for Tip60 and/or p400 does not induce spontaneous hyperplasia. However, after carcinogen injection, Tip60 $+/-$ mice harbor a significantly higher number of ACF than wild-type ones (Fig. 1A). This indicates that the reduction of the Tip60 expression induces an increase of susceptibility to AOM-induced ACF formation.

In order to characterize the impact of the Tip60 heterozygosity at later steps of tumorigenesis, we analyzed the formation of adenomas after AOM injection in the presence of a proinflammatory treatment (Fig. 1B). As for early preneoplastic lesions, we observed a significant increase in the number of adenoma in Tip60 $+/-$ mice, as compared with wild-type ones (Mann-Whitney P -value < 0.02). These results demonstrate that the increased ACF formation upon defective Tip60 function translates into increased adenoma occurrence, indicating that Tip60 is a tumor suppressor in colon, as already shown for *MYC*-induced lymphoma (5).

We next assayed the sensitivity of p400 $+/\Delta$ and double heterozygous mice to AOM-induced ACF formation. We found that p400 $+/\Delta$ mice exhibit a susceptibility to AOM comparable with control mice (Fig. 1A). However, the disruption of one p400 allele almost abolishes the increase in ACF number observed in Tip60 $+/-$ mice (compare Tip60 $+/-$ with Tip60 $+/-$ and p400 $+/\Delta$). This observation indicates that p400 and Tip60 exert antagonistic effects on early stages of colon tumorigenesis *in vivo*. Interestingly, this also shows that p400 favors hyperplasia, at least in a Tip60 $+/-$ background. To our knowledge, these data are the first demonstration of *in vivo* oncogenic activities of p400. We failed to test adenoma formation for p400 $+/\Delta$ mice, because these mice are more prone to die following proinflammatory treatment, probably due to the previously published (25) higher sensitivity to stresses upon p400 reduction.

Tip60 and p400 antagonistically control colon cancer initiation through the Wnt pathway

To gain insights into the mechanisms by which p400 and Tip60 antagonistically control colon cancer initiation *in vivo*, we analyzed their roles on critical pathways involved in cancer progression. We performed transcriptomic experiments in colon

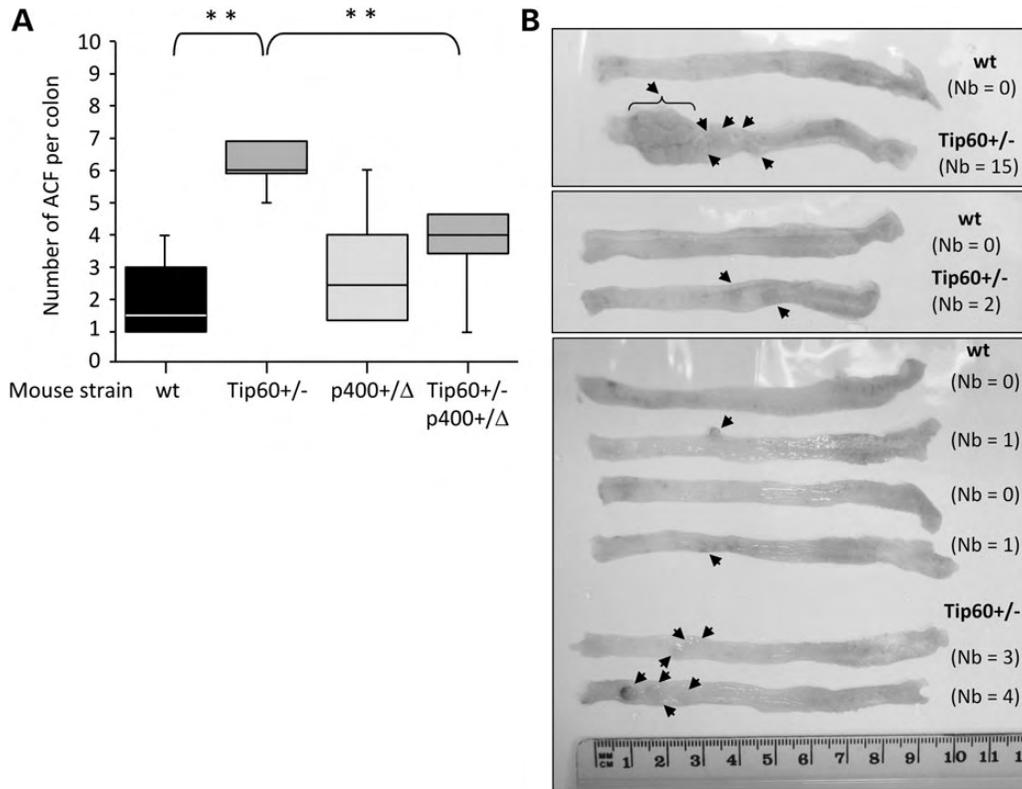


Figure 1. The Tip60/p400 ratio controls the sensitivity to AOM. (A) Fifteen mice per indicated genotypes were injected with azoxymethane as indicated in Materials and Methods, sacrificed and colons were analyzed. Box plots (box: 25–75%, whisker: 2–98%) indicate the median of the ACF number per colon in the population. Statistical analysis was done using Mann–Whitney *t*-test (***P* < 0.02). (B) Colon adenoma induction in wild-type and Tip60+/- mice. Mice were injected with AOM and then treated using DSS in the drinking water for 1 week immediately after AOM injection. Ten weeks later, colons were dissected and fixed as described in Materials and Methods. Shown are the results of three-independent experiments. The number of observed adenomas (arrows) is mentioned for each colon.

carcinoma HCT116 cells by transfecting cells in duplicate using two-independent control, Tip60 or p400 siRNAs (leading to four control, four p400-depleted and four Tip60-depleted samples). The efficiency of siRNA-mediated knockdown is shown in Supplementary Material, Figure S2A. Total RNAs were then prepared and hybridized to microarrays containing most human genes (Fig. 2A). We observed that the two p400 siRNA have very similar knockdown efficiencies (see Supplementary Material, Fig. S2A and B). We therefore considered a RefSeq as regulated by p400 when its expression is significantly deregulated in the four p400-depleted samples compared with the four control samples. Such an analysis leads to a list of 2718 p400-regulated RefSeq (Supplementary Material, Table S1). In contrast, the efficiencies of the two siRNAs against Tip60 are very different (see Supplementary Material, Fig. S2A and B), precluding such an analysis. For each RefSeq, we thus compared the values of the two Tip60 siRNAs samples relative to the two control samples, leading to 4-fold change values. We considered a RefSeq as deregulated upon Tip60 knockdown when three out of four of these values are >1.25 (or <0.8 for repressed genes). Such an analysis led to the identification of 2412 Tip60-regulated RefSeqs (Supplementary Material, Table S2). Importantly, microarrays results were validated on selected genes for both Tip60 and p400 (Supplementary Material, Fig. S2C). In addition, 731 RefSeq are regulated by both p400 and Tip60, which is a highly significant overlap (expected 146,

χ^2 independence test *P*-value < 10^{-100}), in agreement to the fact that they are present within the same complex and that many genes are known to be regulated, either similarly or antagonistically, by both Tip60 and p400. Strikingly, a gene ontology analysis (Fig. 2A) indicated that genes linked to the Wnt pathway are significantly deregulated upon Tip60 (*P*-value = 0.0431686) and p400 depletion (*P*-value = 0.00078871).

Given the critical role of this pathway in colon cancer initiation and progression, we next tested whether it participates in the consequences of p400 and Tip60 depletion on colon cancer initiation. To that goal, we used a recently developed inhibitor of Wnt signaling, the C59 compound, which exhibit a good *in vivo* bioavailability and thus can be used in mice (30). This inhibitor targets the membrane-bound *O*-acyltransferase porcupine (PORCN), an important Wnt-positive regulator (31). We induced ACF formation using AOM in wild-type and Tip60+/- mice, and treated them, or not, with C59 (Fig. 2B). This inhibitor does not significantly affect the number of ACF observed in wild-type mice, in agreement with the fact that AOM mainly targets other pathways, such as *KRAS*-dependent ones. However, treatment with this inhibitor completely blocks the increase in ACF formation observed in Tip60 heterozygous mice, indicating that Tip60 is a tumor suppressor in colon by repressing Wnt signaling. In addition, the inactivation of one p400 allele (see Fig. 1A) mimics the inhibition of the Wnt pathway, since it affects ACF formation only in the Tip60

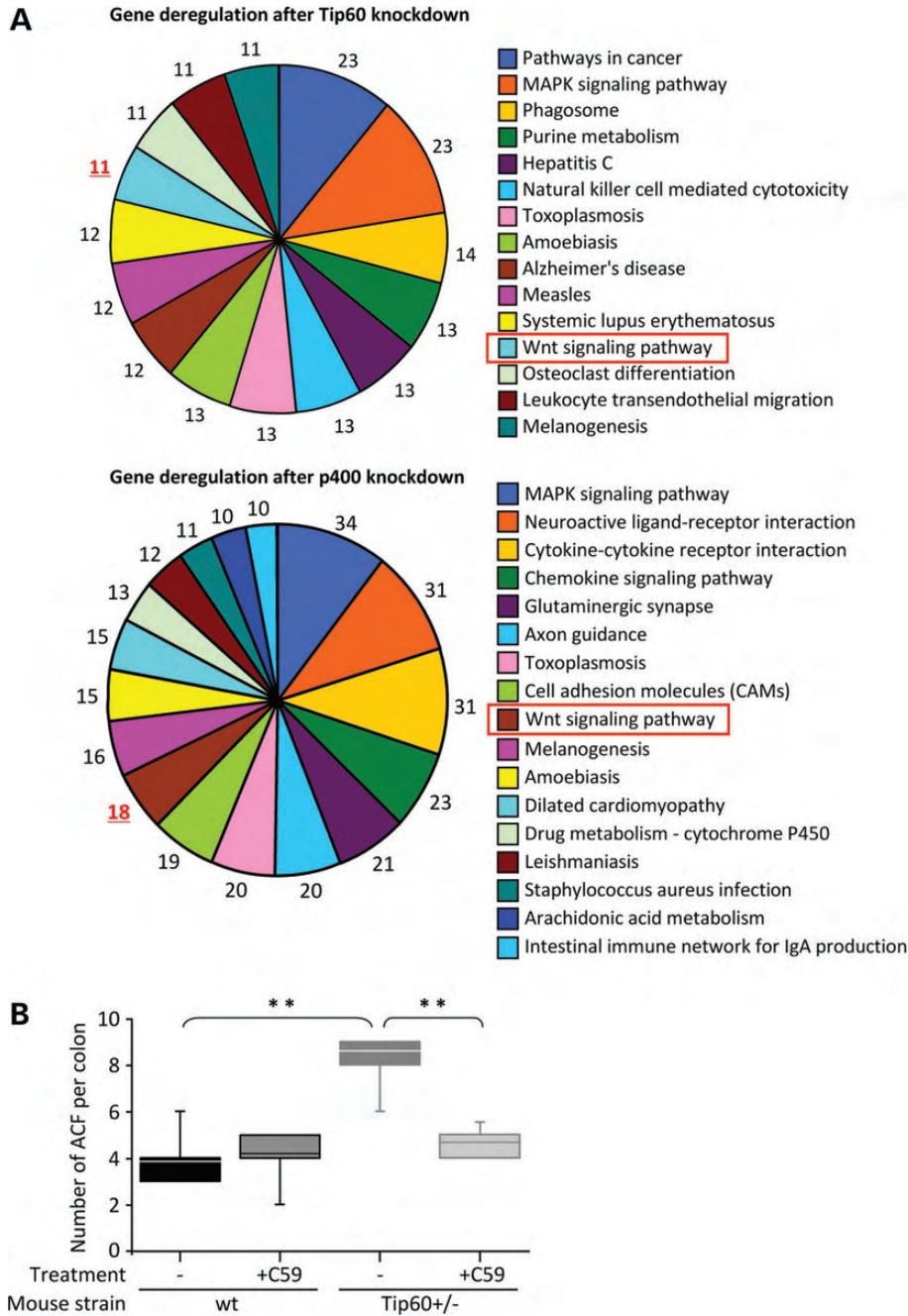


Figure 2. Involvement of the Wnt pathway in the Tip60/p400 control of colon cancer initiation. (A) Gene ontology analysis of pathways dysregulated upon Tip60 or p400 knockdown in HCT116 cells. (B) Ten mice per indicated genotypes were injected with azoxymethane and then treated or not using 5 mg/kg per day of the Wnt inhibitor C59 in the drinking water. three weeks later, colons were dissected, fixed in formalin and analyzed for ACF detection. Box plots (box: 25–75%, whisker: 2–98%) indicate the median of the ACF number per colon in the population. Statistical analysis was done using Mann–Whitney *t*-test (***P* < 0.02).

heterozygous context, indicating that p400 participates in ACF formation by favoring Wnt signaling.

Tip60 and p400 control the proliferation of normal and colorectal cancer-derived cells through the Wnt pathway

In order to provide insights into the molecular mechanisms involved, we next investigated whether the effects of the Tip60/p400 balance on the Wnt signaling can be observed in

cultured cells. We found that, in tumoral HCT116 cells, Tip60 down-regulation using a specific siRNA increased the transactivating abilities of the Wnt-dependent Tcf/Lef transcription factors (measured using a luciferase-based reporter vector), whereas p400 knockdown decreased it (Fig. 3A, see Supplementary Material, Fig. S3A for siRNA efficiencies). Similar results were obtained upon activation of the Wnt pathway by the Wnt3a ligand. Moreover, they were also confirmed using an independent siRNA, ruling out off-target effects (Supplementary

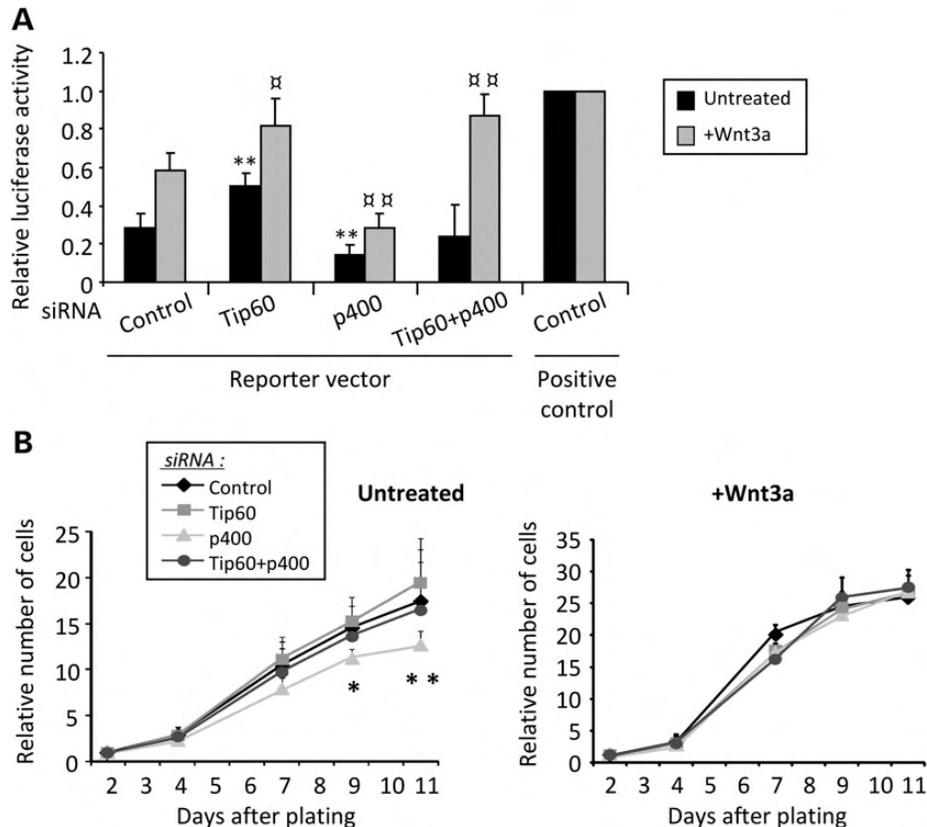


Figure 3. p400 prevents Tip60-dependent effects on the Wnt activity and the proliferation of cancer cells. (A) HCT116 cells were transfected with the indicated siRNAs and the reporter Tcf/Lef-Firefly or positive control vectors. Twenty-four hours later, cells were treated or not with 150 ng/ml Wnt3a for 24 h before harvesting and measure of luciferase. The mean and standard deviation from four-independent experiments are shown. Results are shown relative to 1 for the positive control (** $P < 0.02$ versus untreated control siRNA; □, $P < 0.05$ and □□, $P < 0.02$ versus untreated corresponding siRNA). (B) HCT116 cells were transfected using the indicated siRNAs and treated or not, 24 h following transfection, with 150 ng/ml Wnt3a. Cell number was measured at indicated times (* $P < 0.05$; ** $P < 0.02$ versus control siRNA). The mean and standard deviation from three-independent experiments are shown.

Material, Fig. S3B and C). Thus, in colon cancer cells, Tip60 represses the Wnt pathway, whereas p400 expression favors it, even upon overactivation by exogenous ligand. Strikingly, close examination of our microarrays results confirmed this finding for endogenous genes: we observed that Wnt-target genes affected by Tip60 knockdown are globally activated (mean fold change = 1.17), whereas Wnt-target genes, whose expression changes upon p400 knockdown, are mainly repressed (mean fold change = 0.91).

To study whether such changes in Wnt pathway activity can translate into changes in cell proliferation, we transfected HCT116 cells with siRNAs and assayed their proliferation abilities (Fig. 3B). No effect of Tip60 knockdown could be observed (left graph), as expected since these cells already have a largely defective Tip60 function, due to the change in the Tip60/p400 ratio (6). However, p400 knockdown significantly slows the proliferation rate. This is due to changes in the Tip60/p400 ratio, since it is reversed by the concomitant knockdown of Tip60. P400 knockdown is known in other cell types to lead to a cell proliferation arrest by inducing the expression of the cell cycle inhibitor p21 (13,14). However, in HCT116 cells, we do not observe any change in p21 mRNA expression (data not shown), consistent with our previously published data in HCT116 (6) showing that effects of Tip60/p400 ratio on cell

growth are mediated through p53-independent pathway. Rather, we observed that these effects are mediated through the Wnt pathway, since the anti-proliferative effects of p400 knockdown were no longer observed in the presence of the Wnt3a ligand (Fig. 3B, right), which restores normal Wnt pathway activity in p400-depleted cells (see Fig. 3A). Thus, p400 promotes colon cancer cells proliferation by favoring the activity of the Wnt pathway.

Since the Wnt pathway and cell proliferation are strongly affected by cell transformation, and given that the consequences of Tip60 or p400 depletion *in vivo* are observed at early stages of colon cancer progression, we also analyzed the effects of Tip60 and p400 on the Wnt pathway activity and proliferation in non-transformed cells. Using a siRNA-based strategy, we found that Tip60 and p400 antagonistically control Tcf/Lef transcriptional activity in MEFs (Fig. 4A, left; see Supplementary Material, Fig. S4A for siRNA efficiencies), both in presence or in absence of the Wnt3a ligand, as already observed in HCT116 human cancer cells (see Fig. 3A).

To investigate the impact of such Wnt signaling regulation on the proliferation of normal cells, we generated MEFs from mice heterozygous for Tip60 and/or p400. We found, as expected, a 2-fold reduction in Tip60 and wild-type p400 (Supplementary Material, Fig. S1B and C). Importantly, p400 heterozygosity

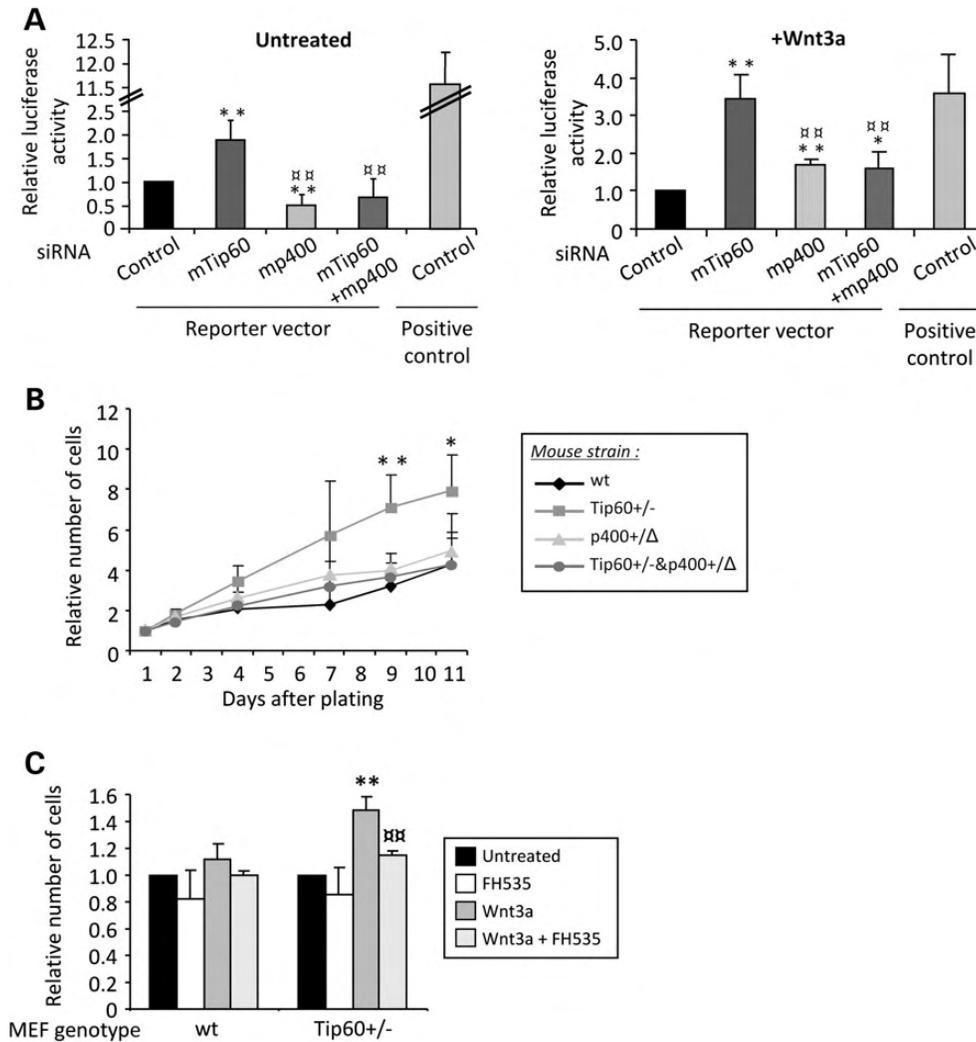


Figure 4. The regulation of cancer cell proliferation by Tip60/p400 is Wnt dependent also in normal cells. **(A)** Wild-type MEFs were transfected using the indicated siRNAs and the Tcf/Lef-Firefly reporter. Twenty-four hours later, cells were treated or not with 150 ng/ml Wnt3a for 24 h before collection and measure of luciferase. Results are shown relative to 1 for control siRNA (* $P < 0.05$; ** $P < 0.02$ versus control siRNA; $\square\square$, $P < 0.02$ versus Tip60 siRNA). The mean and standard deviation from three-independent experiments are shown. **(B)** The cell number of MEFs derived from four-independent embryos of indicated genotypes was measured at indicated times after plating (* $P < 0.05$; ** $P < 0.02$ versus wild-type cells). The mean and standard deviation from three-independent experiments are shown. **(C)** Wild-type or Tip60+/- MEFs were treated or not, 24 h after plating, with 200 nM FH535, 150 ng/ml Wnt3a or both for 3 days. Cell number was measured and represented relative to 1 for untreated MEFs (** $P < 0.02$ versus untreated samples; $\square\square$, $P < 0.02$ versus Wnt3a-treated corresponding genotype). The mean and standard deviation from three-independent experiments are shown.

has no impact on Tip60 expression, and reciprocally. We observed that Tip60+/- MEFs grow faster than the wild-type ones (Fig. 4B), providing evidence that a two-fold decrease in Tip60 expression is sufficient to increase the growth rate of these normal cells. Strikingly, p400 heterozygosity completely reverses the increase of proliferation observed in Tip60+/- MEFs (compare Tip60+/- with Tip60+/- and p400+/ Δ), underlining the importance of a correct p400/Tip60 ratio for the appropriate control of normal cell proliferation. To test whether these changes in normal cell proliferation are dependent on the Wnt pathway, we analyzed the impact of the Wnt3a ligand and the FH535 agent, an inhibitor blocking the β -catenin/Tcf transactivation (32,33), on the proliferation of wild-type or Tip60+/- MEFs (Fig. 4C). We found that Wnt3a stimulates more efficiently the proliferation of normal cells in a Tip60-reduced context.

Importantly, this facilitating effect of the Tip60 heterozygosity is almost totally abolished by inhibiting the β -catenin/Tcf activity using FH535. Taken together, Figures 3 and 4 results indicate that Tip60 and p400 antagonistically controls the proliferation of normal and colon cancer-derived cells through the Wnt pathway, in perfect agreement with their Wnt-dependent role in colon cancer initiation *in vivo*.

Tip60 counteracts β -catenin acetylation and accumulation

We next intended to characterize the mechanism by which p400 and Tip60 participate in Wnt signaling. First, we analyzed the expression of key players of this pathway. We found that depletion of Tip60, either in siRNA-treated or heterozygous MEFs, consistently increases β -catenin protein expression (Fig. 5A and B

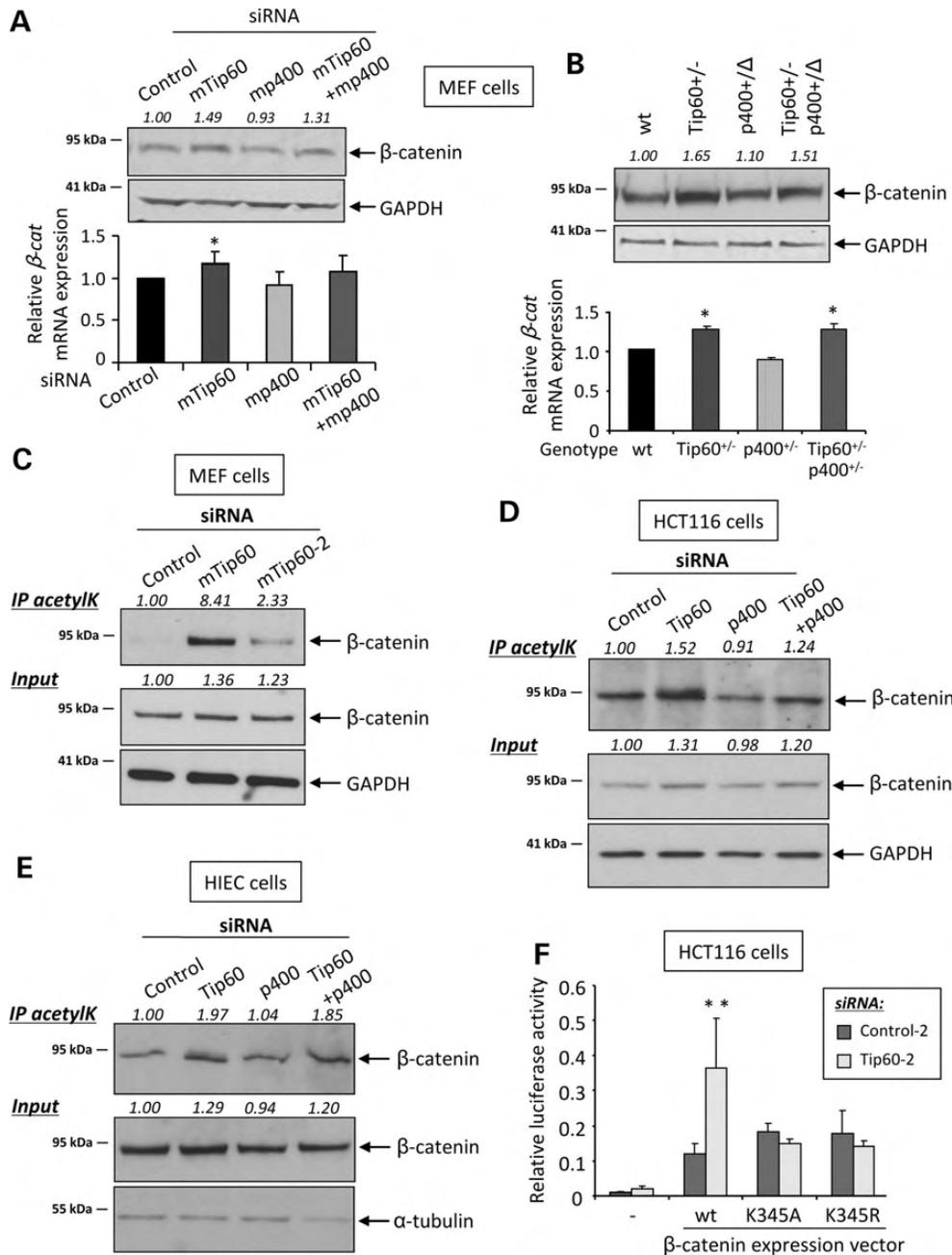


Figure 5. Tip60 regulates β -catenin accumulation and acetylation. (A) Wild-type MEFs were transfected using indicated the siRNA and total protein or mRNA were extracted 48 h later, and subjected to β -catenin and GAPDH analysis by western-blot or qPCR, respectively. Quantification of β -catenin was normalized to GAPDH and shown above the western-blot panels or in qPCR graph ($*P < 0.05$ versus control siRNA). The mean and standard deviation from three-independent qPCR experiments are shown. (B) Same as in (A) for MEFs harboring indicated genotypes. (C) Protein extracts from wild-type MEFs cells transfected using the indicated siRNAs were subjected to IP experiments using an anti-acetyl-lysine antibody. The acetylated β -catenin was then analyzed and quantified, as well as the β -catenin amounts in the total extracts. (D) Same as in (C) for HCT116 cells. (E) Same as in (C) for HIEC cells. (F) HCT116 cells were transfected with the indicated siRNAs and expression vectors, in addition to the reporter Tcf/Lef-Firefly vector. Forty-eight hours later, cells were harvested and the luciferase was measured ($**P < 0.02$ versus control siRNA). The mean and standard deviation from three-independent experiments are shown.

and Supplementary Material, Fig. S4B). Interestingly, β -catenin mRNA levels are only weakly, if anything, affected by Tip60 depletion, indicating that Tip60 mainly acts at a posttranscriptional level. Similar increase of β -catenin amount is also observed in human colon carcinoma HCT116 cells (Fig. 5D, Inputs panels) or in the normal Human Intestinal Crypt Cells HIEC cells (34)

(Fig. 5E, inputs panels; Supplementary Material, Fig. S4C for silencing efficiency). Thus, Tip60 negatively controls β -catenin accumulation.

Since Tip60 is an acetyltransferase, and given that acetylation of a protein can modulate its stability, we tested whether β -catenin can be a substrate of Tip60. Surprisingly, Tip60

depletion increases β -catenin acetylation in MEFs (using two-independent Tip60 siRNAs, Fig. 5C), but also in human tumoral HCT116 (Fig. 5D), or normal HIEC (Fig. 5E) cells, indicating that Tip60 negatively regulates β -catenin acetylation. Acetylation of β -catenin by CBP/p300 or PCAF is known to lead to its stabilization and to the stimulation of its transactivating abilities (35–37). These findings led us to test whether Tip60 could prevent Wnt signaling by inhibiting β -catenin acetylation. To that goal, we made use of unacetylatable K345A/R mutants of β -catenin (35). Both mutants activate the Tcf/Lef reporter promoter as efficiently as the wild-type β -catenin (Fig. 5F). However, they are not able to sustain the extra-activation observed upon Tip60 knockdown, in a striking contrast to the wild type. Thus, we conclude from Figure 5 experiments that the major mechanism by which Tip60 negatively regulates the Wnt pathway is by counteracting β -catenin acetylation and consequently its accumulation and transactivating abilities. Since the mutated site is a known target for CBP/p300, this suggests that Tip60 regulates Wnt activity by antagonizing CBP/p300 activating role on β -catenin.

P400 favors the expression of a subset of Wnt-target genes

In Figure 5 experiments, depleting p400 has no significant effect on β -catenin accumulation or acetylation, indicating that p400 modulates Wnt pathway activity independently of controlling β -catenin acetylation. Interestingly, p400 depletion in MEFs affects the expression of some of the Wnt/ β -catenin-target genes, such as *Itf2* (Supplementary Material, Fig. S5A) that encodes a transcription factor promoting the neoplastic transformation (38) and colon cancers (39). We also observed, by ChIP analysis, that the *Itf2* promoter is enriched in p400 immunoprecipitates (Supplementary Material, Fig. S5B). This enrichment is specific, since no signal can be detected in the no antibody control and since the *Itf2* promoter is more present in the p400 ChIP than the control *RPLP0* gene. Moreover, the binding of p400 to the *Itf2* promoter is similar to that observed on the *CDKN1A^{p21}* promoter, to which p400 binding is well established (13). Thus, the Wnt-target *Itf2* gene is directly regulated by p400. Interestingly, treating MEF cells with Wnt3a (which activates *Itf2* transcription, Supplementary Material, Fig. S5C) leads to a drastic increase in the p400 ChIP efficiency of the *Itf2* promoter (Supplementary Material, Fig. S5B), indicating that the binding of p400 to the *Itf2* promoter increases upon the activation of the Wnt pathway. These data thus suggest that p400 participates in the Wnt-dependent transcriptional activation, at least on some Wnt-target genes.

To test whether such a finding can be generalized, we intended to globally characterize genes bound by p400 in colon-derived cells (Fig. 6A). Two-independent p400 ChIP from HCT116 cells were hybridized to Human ChIP-chip Promoter Arrays. Data analysis lead to the identification of 8809 RefSeqs (Supplementary Material, Table S3), corresponding to 3010 p400-bound genes. As expected, the *CDKN1A^{p21}* promoter is identified in this analysis, and we validated other p400 target genes by conventional ChIP qPCR (Supplementary Material, Fig. S5D).

The overlapping between p400-bound and p400-regulated genes is not very good (231 out of 2150 (1/9) p400-regulated genes are bound by p400), nor with Tip60-regulated genes (128 out of 2002 (1/15) Tip60-regulated genes), underlining

the importance of indirect effects in genes regulation by p400 and Tip60. Strikingly, however, we found, by gene ontology analysis (Fig. 6A), that genes from the Wnt pathway are highly significantly enriched among p400-bound promoters (P -value = $2.88903e-06$). In addition, when we compared with β -catenin-target genes, previously identified by ChIP-Seq experiments (40), we found that 158 out of 988 (1/6) β -catenin-target genes are also bound by p400, indicating that p400 binds to a subset of Wnt-target genes. Importantly, these 158 genes are mostly repressed upon p400 knockdown (mean of the log₂ (fold change) = -0.06 , P -value = 0.001316), indicating that, on these genes, p400 has mainly an activating role. Thus, this genome-wide experiment confirmed that p400 binds to and participate in the activation of a subset of Wnt-target genes.

In addition, some genes encoding key Wnt pathway modulators were apparently bound by p400 (see Supplementary Material, Table S3), such as the Wnt-positive regulator *PORCN*, which is the target of the inhibitor we used *in vivo*. Careful analysis, by conventional ChIP followed by qPCR, of genes encoding several important Wnt modulators (Fig. 6B) indeed confirmed that genes encoding *PORCN* and another positive regulator, *FZD2*, as well as the gene encoding *CAMKIID*, an indirect repressor of the canonical Wnt pathway (41), are bound by p400. The binding of p400 on these genes is similar to that observed on *SART3* and *CDKN1A^{p21}* (positive genes in ChIP-chips experiments) and significantly higher than on negative genes *RPLP0* and *PTGER3*. Interestingly, the knockdown of p400 using specific siRNAs decreased the expression of *FZD2* and *PORCN* mRNA, and increased the expression of *CAMKIID* mRNA (Fig. 6C). All these effects result in a decreased activation of the Wnt pathway, probably explaining the effect of p400 depletion on Tcf/Lef luciferase reporter gene (Fig. 3A). Thus, taken together, these experiments indicate that p400 directly participates in the activation of a subset of β -catenin-target genes, and favors Wnt signaling by controlling the expression of key modulators of this pathway.

DISCUSSION

Here, we found that, by modifying the expression of Tip60 and p400, one can modulate the sensitivity to colon cancer initiation and progression, and that this function is linked to the antagonistic regulation of Wnt pathway activity by the two enzymes (Fig. 7). The role of Tip60 as a negative regulator of Wnt signaling, that we show here, was suspected (42), but never demonstrated. We show here that it is largely, if not only, dependent on its ability to counteract β -catenin acetylation and accumulation. This is an important and surprising finding, since it shows that a HAT (Tip60) can act antagonistically to other HATs (CBP/p300, PCAF, etc.), which acetylate β -catenin, leading to its stabilization and activation (35–37). Such an interference mechanism between HATs had not previously been shown, to our knowledge. Whether it is restricted to the Wnt pathway or can be generalized is an issue deserving further consideration.

In contrast, p400 acts as a positive regulator of the Wnt pathway. This is likely to be mediated by a different mechanism, since no effect of p400 on β -catenin accumulation could be found. Our ChIP-chips data allow us to propose that p400 binds to and favors the expression of a subset of Wnt-target

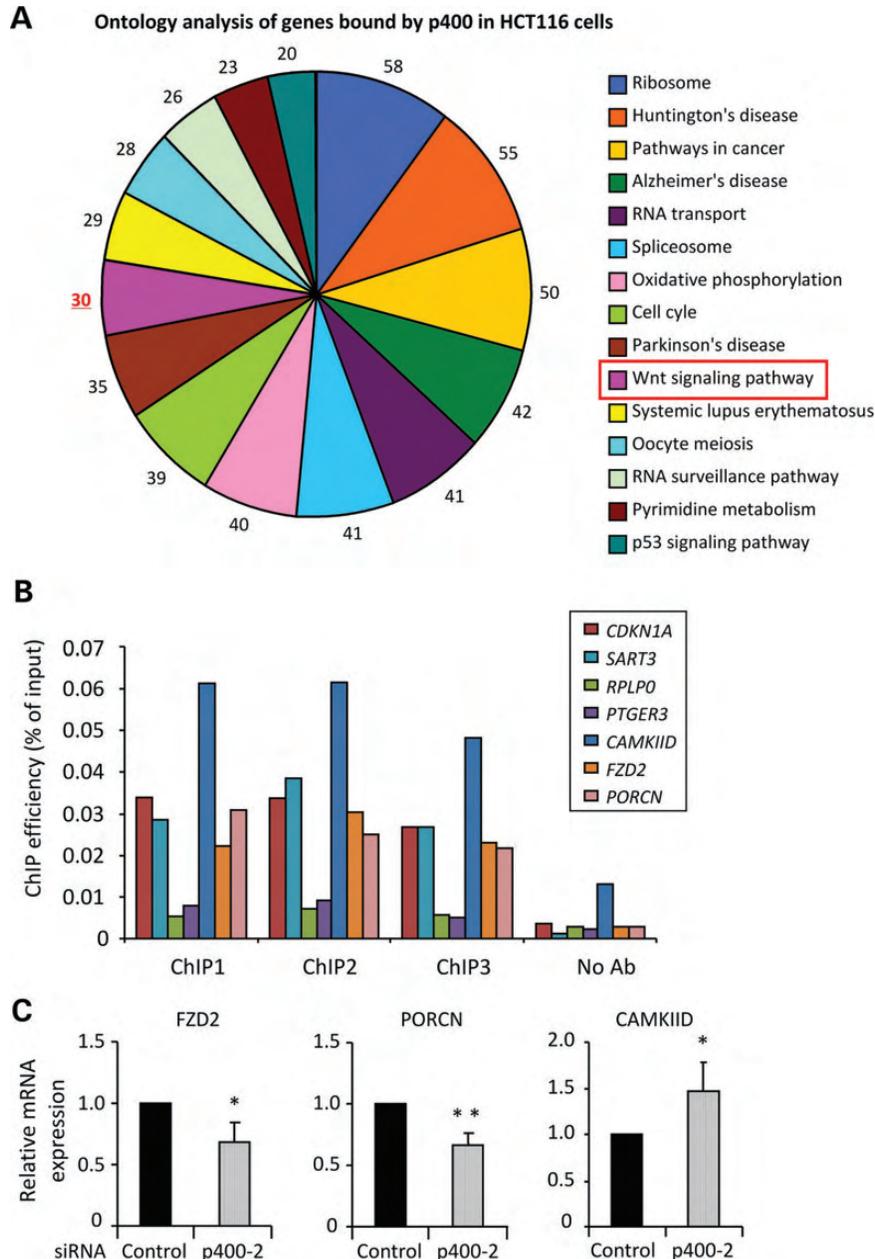


Figure 6. p400 regulation of Wnt-related genes. (A) Gene ontology analysis of pathways represented in p400-bound genes in HCT116 cells. (B) Three-independent samples of p400 ChIPs, similar to those used in (A), were subjected to qPCR analysis of selected promoters. We found the binding of p400 on three ChIP-chips positive promoters (*CDKN1A*, *SART3* or *PORCN*), as well as the low specific enrichment of two negative promoters (*RPLP0* and *PTGER3*) compared with no antibody (No Ab) control. We also identify the specific binding of p400 on *CAMKIID* and *FZD2* genes. (C) HCT116 cells were transfected with the indicated siRNAs. Forty-eight hours later, total RNA were extracted and analyzed by qPCR using specific primers. Results were normalized to GAPDH and represented relative to 1 for control siRNA-transfected cells (* $P < 0.05$; ** $P < 0.02$). The mean and standard deviation from four-independent experiments are shown.

genes in human cells (such as *Itf2* in MEFs), as it has been shown for Tip49a (43). Although some genes bound by p400 are not (or only weakly) affected by p400 depletion in HCT116 cells (such as *MYC* for example), these genes may be very important in other cellular contexts. For example, *CDKN1A*^{p21} expression is not affected by p400 depletion in HCT116 cells (microarrays results in Supplementary Material, Table S1), although it is very important to mediate the cell cycle arrest and senescence induction upon p400 depletion in other cell types (14,44). The direct control of Wnt-target genes is probably not the only

mechanism by which p400 participates in the Wnt pathway (Fig. 7): indeed, we also observed that p400 negatively controls the expression of genes involved in the repression of the canonical Wnt/ β -catenin pathway (such as *Wif1* and *sFrp1* in MEFs, or *DKK1* and *CAMKIID* in human cells, Supplementary Material, Fig. S6 and Fig. 6C). Moreover, p400 is also responsible for direct-positive regulations of important Wnt pathway components such as *FZD2* and *PORCN* (Fig. 6B and C). All these data indicate that the transcriptional modulations depending on p400 affect different levels of the Wnt pathway and participate

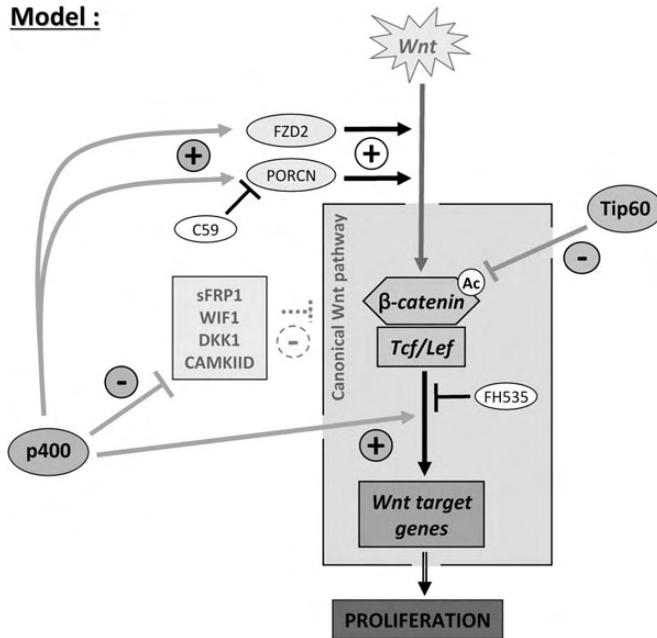
Model :

Figure 7. Model of fine-tuning of the Wnt pathway by Tip60/p400. Tip60 negatively controls the Wnt signaling via the decrease of β -catenin accumulation and acetylation, resulting in a weaker Wnt activity. Conversely, p400 stimulates the Wnt activity by acting as a co-activator for a subset of Wnt-target genes, as well as for some Wnt-positive modulators (such as *PORCN* or *FZD2*), but also possibly by other mechanisms, such as by repressing the expression of inhibitors (*sFRP1*, *WIF1*, *DKK1*, *CAMKIID*, etc.). As a consequence, Tip60 and p400 antagonistically regulate Wnt pathway activity, normal and cancer cells proliferation and early steps of colon tumorigenesis.

to its activation (Fig. 7). The importance of such direct regulations is indicated by our findings that inhibiting p400 mimics the effects of targeting *PORCN* for ACF formation *in vivo*. Our data thus uncover p400 as an important new player in the Wnt signaling.

Our results also indicate that, although Tip60 and p400 physically interact, they probably affect Wnt signaling by independent mechanisms. This is reminiscent to what has been described on the *CDKN1A^{p21}* promoter that p400 represses by incorporating H2A.Z and that Tip60 activates, once the p400-induced repression has been relieved, through histone acetylation (13). It is tempting to speculate that p400 and Tip60 have acquired, during evolution, antagonistic functions on many different processes, some of which being mediated by their physical interaction and the direct repressive effect of p400 on Tip60 histone acetyltransferase activity (15), others through independent mechanisms. Strikingly, in most cases (regulation of p21 expression (14), senescence induction (44, 45), DDR activation (6) and Wnt signaling (this study)), p400 has a proproliferation role, whereas Tip60 has an anti-proliferative role.

Importantly, our data indicate that the status of Tip60 and of p400 are crucial *in vivo* elements controlling the sensitivity to preneoplastic lesions in a Wnt-dependent manner. Our results allow us to propose that the Tip60/p400 ratio exerts a fine-tuning control on the Wnt pathway activity (Fig. 7), impacting early steps of colon tumorigenesis and cancer cells proliferation. We observed changes in colon cancer initiation through the modulation of the Wnt pathway in heterozygous animals, i.e. when

Tip60 or p400 expression levels are modified by 2-fold. Strikingly, we previously uncovered an approximate 2-fold difference in the Tip60/p400 ratio in a collection of colon cancers as compared with normal adjacent tissues (6). Our results thus show that the imbalance found in human cancers is probably sufficient to affect Wnt signaling and, as a consequence, could participate in colon cancer progression in humans.

Tip60 has already been shown to be a tumor suppressor for myc-induced lymphoma. In this case, depleting Tip60 was shown to prevent the activation of the oncogene-induced DNA damage response (OIDD) pathway (5). Our data thus demonstrate that Tip60 can also prevent cancer progression by an alternate mechanism, i.e. by repressing Wnt signaling. Interestingly, Tip60 is involved in many other anti-proliferative processes, such as p53 activation (46,47), apoptosis (12,14) or senescence induction (44). Since Tip60 is known to be underexpressed in a variety of human cancers (5,48), the consequence of this underexpression is probably both an activation of the procancer Wnt pathway and an inhibition of various anti-cancer barriers, including the p53 pathway, the OIDD and senescence. Our data thus underline the importance of the Tip60 function and of the Tip60/p400 imbalance for cancer initiation and progression.

Strikingly, we show for the first time that p400 possesses some oncogenic properties, at least in a Tip60-reduced context, i.e. when cancer progression is dependent on the Wnt pathway. Given the importance of the Wnt pathway in many different cancers, p400 expression and activity is probably important for the progression not only of colon cancer, but also of other cancers. Importantly, since p400 directly regulates a subset of Wnt-target genes and some genes encoding key Wnt modulators, it probably participates in setting up epigenetic modifications, such as the presence of H2A.Z, on these promoters. In this respect, our data highlight the importance of the epigenetic control of Wnt signaling. Given that epigenetic modifications are reversible, one can imagine that epigenetic drugs, in particular drugs that target p400, may reverse these epigenetic modifications and decrease the activation of Wnt signaling. Our results thus underline the importance of developing and testing epigenetic drugs targeting this new Wnt pathway modulator.

In addition, our findings showing that Tip60/p400 balance affects the proliferation of normal cells in a Wnt pathway-dependent manner provide evidence that the Tip60/p400 status can also influence the cell physiology prior to tumorigenesis. Thus, any alteration of the ratio could impact critical physiological roles of the Wnt/ β -catenin pathway, such as the transcriptional control of pluripotency genes, the self-renewal of stem cells and many differentiation processes (49). It could also be involved in other important pathologies involving the Wnt signaling (diabetes, osteoporosis, obesity, coronary diseases, etc., for review, see (50)). The contribution of Tip60 and p400 in normal development or pathologies, through Wnt signaling, clearly deserves further investigation.

MATERIALS AND METHODS

All microarrays data from this publication have been submitted to the GEO public functional genomics data repository (GSE45616). Statistical significance was calculated using Student's *t*-test, χ^2 independence test or Mann-Whitney test. For

protocol complements, see Supplementary Material, Experimental Procedures.

Ethics statement

The experiments involved with animals were conducted accordingly to French governmental norms and the protocol was approved by the IPBS-CNRS Ethic Committee (Approval #20090326/62).

Animals

Mice heterozygous for Tip60 (26) were obtained from Dr B. Amati and back-crossed with C57Bl/6J females (Charles-River, L'Arbresle, France). Frozen embryos of the p400 strain (27) were purchased from RIKEN-BRC (Ibaraki, Japan) and reviviscence was done using C57Bl/6J mice.

Induction of preneoplastic lesions

Six- to 8-week-old animals received, twice at 1 week apart, an intraperitoneal injection of AOM (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) in saline solution at 15 mg/kg of body weight or vehicle alone. Mice were then treated or not using 5 mg/kg per day of the Wnt inhibitor C59 (BioVision Inc, Milpitas, CA, USA) in the drinking water immediately after the first AOM injection. Three weeks after the second injection, animals were sacrificed and colons were slit opened longitudinally and examined for ACF, after fixation in formalin and staining with 0.05% methylene-blue solution (Sigma-Aldrich).

To accelerate the appearance of advanced lesions, mice were also treated with 1% DSS (MP Biomedicals, Illkirch, France), a proinflammatory molecule, for 1 week in the drinking water immediately after AOM injection. Ten weeks later, colons were dissected, fixed in formalin and photographed.

Analysis of microarrays results

Analysis of large-scale gene expression in HCT116 cells previously transfected with siRNAs (see Supplementary Material, Fig. S2A for efficiencies and Experimental Procedures for details) were done using Nimblegen (Roche Nimblegen, Madison, WI, USA) DNA microarrays (Human Gene Expression 12x135K Arrays).

Chromatin immunoprecipitation and ChIP-chips experiments

ChIP experiments were performed as described (14) and analyzed by qPCR using specific primers.

ChIP-chips experiments were done using two-independent p400-immunoprecipitated chromatin samples from HCT116 cells. After the p400-ChIP, samples were amplified using the WGA kit (Sigma-Aldrich). DNA labeling and hybridization on Human ChIP-chip 385K RefSeq Promoter Arrays (Roche Nimblegen) were performed. Bioinformatic analysis allowing identification of peaks was done using the NimbleScan software. A promoter was recorded as bound by p400 if binding peaks ($P < 0.01$) were identified in the two experiments at < 500 pb distance, which corresponds to the ChIP resolution. Clustering

of bound genes was done using GeneCoDis3 online software (<http://genecodis.cnb.csic.es>) (51).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr B. Amati for providing us Tip60^{+/-} mice from Dr J. Lough's lab. We greatly thank Dr C. Neuveut for providing us all β -catenin expression vectors and Dr J.-F. Beaulieu for the gift of HIEC cells. We thank N. Naud for her help with ACF analysis. We used the INSA-GeT-Biopuces and the LBCMCP Toulouse Genotoul TRI cytometry platforms as well as the luminometry facility of the LBME (UMR5099, Toulouse).

Conflict of Interest statement: None declared.

FUNDING

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer as an 'Équipe labellisée' (Grant #VP7537) and from the Fondation of the Association pour la Recherche contre le Cancer. L.M. and F.E. were awarded by the Fondation de France for this work.

REFERENCES

- Aran, D. and Hellman, A. (2013) DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition. *Cell*, **154**, 11–13.
- Bojang, P. Jr and Ramos, K.S. (2013) The promise and failures of epigenetic therapies for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.*, **40**, 153–169.
- Skene, P.J. and Henikoff, S. (2013) Histone variants in pluripotency and disease. *Development*, **140**, 2513–2524.
- Fullgrabe, J., Kavanagh, E. and Joseph, B. (2011) Histone onco-modifications. *Oncogene*, **30**, 3391–3403.
- Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., Martinato, F., Sardella, D., Verrecchia, A., Bennett, S. *et al.* (2007) Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature*, **448**, 1063–1067.
- Mattera, L., Escaffit, F., Pillaire, M.J., Selves, J., Tyteca, S., Hoffmann, J.S., Gourraud, P.A., Chevillard-Briet, M., Cazaux, C. and Trouche, D. (2009) The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene*, **28**, 1506–1517.
- Kaidi, A. and Jackson, S.P. (2013) KAT5 tyrosine phosphorylation couples chromatin sensing to ATM signalling. *Nature*, **498**, 70–74.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N. and Price, B.D. (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13182–13187.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. and Gu, W. (2006) Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol. Cell*, **24**, 827–839.
- Dar, A., Shibata, E. and Dutta, A. (2013) Deubiquitination of Tip60 by USP7 determines the activity of the p53-dependent apoptotic pathway. *Mol. Cell Biol.*, **33**, 3309–3320.
- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S. and McMahon, S.B. (2006) Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol. Cell*, **24**, 841–851.
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J. and Nakatani, Y. (2000) Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, **102**, 463–473.
- Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M. and Gaudreau, L. (2007) p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev.*, **21**, 1869–1881.

14. Tyteca, S., Vandromme, M., Legube, G., Chevillard-Briet, M. and Trouche, D. (2006) Tip60 and p400 are both required for UV-induced apoptosis but play antagonistic roles in cell cycle progression. *EMBO J.*, **25**, 1680–1689.
15. Park, J.H., Sun, X.J. and 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.
16. Fearon, E.R. (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.*, **6**, 479–507.
17. Cheng, L. and Lai, M.D. (2003) Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, **9**, 2642–2649.
18. Lopez-Ceron, M. and Pellise, M. (2012) Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. *Colorectal Dis.*, **14**, e157–e164.
19. Parnaud, G., Tache, S., Peiffer, G. and Corpet, D.E. (1999) Polyethylene-glycol suppresses colon cancer and causes dose-dependent regression of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res.*, **59**, 5143–5147.
20. Pierre, F.H., Santarelli, R.L., Allam, O., Tache, S., Naud, N., Gueraud, F. and Corpet, D.E. (2010) Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr. Cancer*, **62**, 567–573.
21. Boivin, G.P., Washington, K., Yang, K., Ward, J.M., Pretlow, T.P., Russell, R., Besselsen, D.G., Godfrey, V.L., Doetschman, T., Dove, W.F. *et al.* (2003) Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology*, **124**, 762–777.
22. Guda, K., Upender, M.B., Belinsky, G., Flynn, C., Nakanishi, M., Marino, J.N., Ried, T. and Rosenberg, D.W. (2004) Carcinogen-induced colon tumors in mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability. *Oncogene*, **23**, 3813–3821.
23. Takahashi, M. and Wakabayashi, K. (2004) Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.*, **95**, 475–480.
24. Elyada, E., Pribluda, A., Goldstein, R.E., Morgenstern, Y., Brachya, G., Cojocaru, G., Snir-Alkalay, I., Burstain, I., Haffner-Krausz, R., Jung, S. *et al.* (2011) CKI α ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature*, **470**, 409–413.
25. Mattera, L., Courilleau, C., Legube, G., Ueda, T., Fukunaga, R., Chevillard-Briet, M., Canitrot, Y., Escaffit, F. and Trouche, D. (2010) The E1A-associated p400 protein modulates cell fate decisions by the regulation of ROS homeostasis. *PLoS Genetics*, **6**, e1000983.
26. Hu, Y., Fisher, J.B., Koprowski, S., McAllister, D., Kim, M.S. and Lough, J. (2009) Homozygous disruption of the Tip60 gene causes early embryonic lethality. *Dev. Dyn.*, **238**, 2912–2921.
27. Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Ogawa, H., Fukuyama, H., Higashi, Y., Nagata, S. and Fukunaga, R. (2007) Critical role of the p400/mDomino chromatin-remodeling ATPase in embryonic hematopoiesis. *Genes Cells*, **12**, 581–592.
28. De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E. and Fazio, V.M. (2011) The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J. Carcinog.*, **10**, 9.
29. Lu, Q., Jiang, B., Lin, C. and Shan, T. (2008) Dark Aberrant Crypt Foci with activated Wnt pathway are related to tumorigenesis in the colon of AOM-treated rat. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **27**, 26.
30. Proffitt, K.D., Madan, B., Ke, Z., Pendharkar, V., Ding, L., Lee, M.A., Hannoush, R.N. and Virshup, D.M. (2012) Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer. *Cancer Res.*, **73**, 502–507.
31. Proffitt, K.D. and Virshup, D.M. (2012) Precise regulation of porcupine activity is required for physiological Wnt signaling. *J. Biol. Chem.*, **287**, 34167–34178.
32. Handeli, S. and Simon, J.A. (2008) A small-molecule inhibitor of Tcf/ β -catenin signaling down-regulates PPAR γ and PPAR δ activities. *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 521–529.
33. Iida, J., Dorchak, J., Lehman, J.R., Clancy, R., Luo, C., Chen, Y., Somiari, S., Ellsworth, R.E., Hu, H., Mural, R.J. *et al.* (2012) FH535 inhibited migration and growth of breast cancer cells. *PLoS ONE*, **7**, e44418.
34. Beaulieu, J.F. and Menard, D. (2012) Isolation, characterization, and culture of normal human intestinal crypt and villus cells. *Methods Mol. Biol.*, **806**, 157–173.
35. Levy, L., Wei, Y., Labelette, C., Wu, Y., Renard, C.A., Buendia, M.A. and Neuveut, C. (2004) Acetylation of β -catenin by p300 regulates β -catenin-Tcf4 interaction. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 3404–3414.
36. Wolf, D., Rodova, M., Miska, E.A., Calvet, J.P. and Kouzarides, T. (2002) Acetylation of β -catenin by CREB-binding protein (CBP). *J. Biol. Chem.*, **277**, 25562–25567.
37. Ge, X., Jin, Q., Zhang, F., Yan, T. and Zhai, Q. (2009) PCAF acetylates β -catenin and improves its stability. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 419–427.
38. Kolligs, F.T., Nieman, M.T., Winer, I., Hu, G., Van Mater, D., Feng, Y., Smith, I.M., Wu, R., Zhai, Y., Cho, K.R. *et al.* (2002) ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with β -catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell*, **1**, 145–155.
39. Mologni, L., Dekhil, H., Ceccon, M., Purgante, S., Lan, C., Cleris, L., Magistrini, V., Formelli, F. and Gambacorti-Passerini, C.B. (2010) Colorectal tumors are effectively eradicated by combined inhibition of β -catenin, KRAS, and the oncogenic transcription factor ITF2. *Cancer Res.*, **70**, 7253–7263.
40. Bottomly, D., Kyler, S.L., McWeeney, S.K. and Yochum, G.S. (2010) Identification of β -catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5735–5745.
41. Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J. and Matsumoto, K. (2003) The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/ β -catenin signaling. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 131–139.
42. Baek, S.H., Ohgi, K.A., Rose, D.W., Koo, E.H., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2002) Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF- κ B and β -amyloid precursor protein. *Cell*, **110**, 55–67.
43. Feng, Y., Lee, N. and Fearon, E.R. (2003) TIP49 regulates β -catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling. *Cancer Res.*, **63**, 8726–8734.
44. Chan, H.M., Narita, M., Lowe, S.W. and Livingston, D.M. (2005) The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 \rightarrow p21 senescence pathway. *Genes Dev.*, **19**, 196–201.
45. Zheng, H., Seit-Nebi, A., Han, X., Aslanian, A., Tat, J., Liao, R., Yates, J.R. 3rd. and Sun, P. (2013) A Posttranslational modification cascade involving p38, Tip60, and PRAK mediates oncogene-induced senescence. *Mol. Cell*, **50**, 699–710.
46. Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B. *et al.* (2004) A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, **428**, 431–437.
47. Legube, G., Linares, L.K., Tyteca, S., Caron, C., Scheffner, M., Chevillard-Briet, M. and Trouche, D. (2004) Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J. Biol. Chem.*, **279**, 44825–44833.
48. Leonart, M., Vidal, F., Gallardo, D., Diaz-Fuertes, M., Rojo, F., Cuatrecasas, M., Lopez-Vicente, L., Kondoh, H., Blanco, C., Carnero, A. *et al.* (2006) New p53 related genes in human tumors: significant downregulation in colon and lung carcinomas. *Oncol. Rep.*, **16**, 603–608.
49. Holland, J.D., Klaus, A., Garratt, A.N. and Birchmeier, W. (2013) Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **25**, 254–264.
50. Clevers, H. and Nusse, R. (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, **149**, 1192–1205.
51. Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R. and Pascual-Montano, A. (2012) GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.*, **40**, W478–W483.

DISCUSSION

Mes travaux de thèse mettent à jour une nouvelle voie de compaction impliquant l'acétyltransférase TIP60, l'acétylation d'H4K12, et la protéine à double bromodomaine BRD2, dans l'hétérochromatine péricentromérique des fibroblastes embryonnaires de souris doubles KO pour les méthyltransférases SUV39H1 et 2.

A Introduction

Suite à la diminution d'expression de TIP60 par stratégie siRNA dans des cellules SUV39H ½ -/-, a lieu une augmentation de l'expression des séquences satellites, ainsi qu'une décompaction des péricentromères, visible lors d'une coloration des noyaux au DAPI. Il est également observé une augmentation des phénotypes résultant de défauts de ségrégation, reflet de problèmes de compaction des péricentromères. Ces résultats impliquent clairement l'acétyltransférase TIP60 dans l'hétérochromatine péricentrique des cellules SUV39H ½ -/-. L'ensemble des phénotypes observés après siRNA TIP60 dans les SUV39H ½ -/- est une exacerbation des phénotypes déjà présents dans ces cellules. Ceci révèle donc une interaction génétique entre l'acétyltransférase TIP60 et la méthyltransférase SUV39H. La présence de TIP60, détectée en CHIP dans les SUV39H ½ -/-, ainsi que l'enrichissement, dépendant de TIP60, d'H4K12ac dans ces mêmes cellules, montrent finalement un rôle direct de TIP60 au niveau de ces péricentromères. Un siRNA BRD2 provoque également une décompaction des péricentromères ainsi qu'une augmentation du nombre de micronoyaux, et nous posons donc un modèle où une voie TIP60-H4K12ac-BRD2 permet la compaction de la chromatine en contexte SUV39H ½ -/-. Un enrichissement d'H4K12ac dépendant de TIP60 est également observable dans les NIH3T3 traitées à la 5-azacytidine, élargissant la présence de cette voie aux péricentromères déstructurés de manière générale. Les cellules que j'ai utilisées au cours de ma thèse sont des MEFs SUV39H ½ -/-, et des NIH3T3 traitées à la 5 azacytidine, où j'identifie l'apparition de la voie Tip60-H4K12ac. Les cellules ES SUV39H ½ -/-, et les cellules KO pour les DNA méthyltransférases Dnmt1, DNMT3A, et DNMT3B, voient leur d'hétérochromatine péricentromérique passer d'un état d'hétérochromatine constitutive à facultative, avec une voie qui semble présenter des redondances entre les deux modèles (Saksouk et al. 2014),(Cooper et al. 2014). La vois TIP60-H4K12ac-BRD2 pourrait être de manière similaire présentes dans différents contextes physiologiques, ou pathologiques présentant cette transition hétérochromatine constitutive-facultative.

Nous mettons à jour une voie TIP60-H4K12ac-BRD2 dans les péricentromères des cellules SUV39H ½ -/-. Dans une première partie, nous nous interrogerons sur le mode de recrutement de TIP60 à l'hétérochromatine, ainsi que sur le mécanisme de compaction impliqué. Dans une seconde partie, nous discuterons la pertinence physiologique de cette voie, et nous proposerons différentes situations pouvant être analogues à ce modèle cellulaire. Finalement, nous proposerons dans une troisième partie, plusieurs implications physio-pathologiques de l'existence de cette voie.

B Mécanistique de la voie TIP60-H4K12ac

• 1 Mécanisme de compaction

Dans notre modèle, le mécanisme de compaction médié par TIP60, opère via le recrutement de BRD2 sur H4K12ac. En effet, le siRNA TIP60 entraîne de manière simultanée dans les cellules SUV39H ½ -/-, une diminution de l'acétylation d'H4K12, et une décompaction des péricentromères. Ceci suggère qu'H4K12ac participe à la compaction de cette structure. Or, cela ne correspond pas au mécanisme classique de l'acétylation d'histone, normalement impliquée dans la décompaction. Il y a donc un mécanisme sous-jacent, qui doit expliquer ce lien acétylation-compaction. Il existe différents liens entre protéines à double bromodomaines et compaction chromatiniennne. Or, le domaine BD1 de BRD2 est connu pour se lier en dimère à H4K12ac (Umehara et al. 2009), et l'utilisation d'un siRNA BRD2 phénocopie des effets du siRNA TIP60, en provoquant une décompaction des péricentromères visible en DAPI, ainsi qu'une augmentation du nombre de micronoyaux. Ainsi, nous montrons une nouvelle implication d'une protéine BET, BRD2, dans un mécanisme de compaction chez les mammifères. Il est néanmoins frappant de constater que la déplétion de BRD2 ne phénocopie pas l'ensemble des phénotypes observés lors de la déplétion de TIP60. En effet, le siRNA BRD2 n'entraîne pas une augmentation significative de la polyploïdie dans les SUV39H ½ -/- comme c'est le cas du siRNA TIP60, comme attendu si BRD2 fait partie de cette voie. L'augmentation du nombre de micronoyaux, mais non de la polyploïdie, suggère un mécanisme d'élimination des cellules polyploïdes, qui n'est pas observé avec l'utilisation d'un siRNA TIP60. Il est envisageable que cette élimination soit effectuée par la voie p53, qui ne serait pas affectée par la déplétion de BRD2. Pour tester cette hypothèse, il faudrait voir si la déplétion de p53 couplée à celle de BRD2 entraîne effectivement une augmentation de la polyploïdie.

Il est probable que d'autres mécanismes, supplémentaires au recrutement de BRD2, soient en jeu. Alors que le siRNA TIP60 entraîne à la fois une décompaction des péricentromères, et une augmentation de la transcription des séquences satellites, j'observe une absence d'augmentation de la transcription des satellites dans les SUV39H ½ -/- après siRNA BRD2, alors même que ce siRNA entraîne une décompaction des péricentromères. Cette donnée semble démontrer qu'une décompaction de la chromatine péricentromérique n'entraîne pas nécessairement une augmentation transcriptionnelle, et qu'il existe des mécanismes de régulation plus complexes. Ainsi, si TIP60 agit sur la compaction des péricentromères *via* BRD2, alors cela signifie qu'il agit de manière indépendante sur la répression de la transcription par un autre mécanisme. Il est donc envisageable que TIP60 ait d'autres actions sur cette chromatine que le recrutement de BRD2, que ce soit pour réprimer la transcription, mais également éventuellement pour en médier la compaction. Il est possible que

TIP60 agisse par le recrutement d'une HDAC, étant donné les liens entre TIP60 et HDAC discutés dans l'introduction. Finalement le terme de « compaction » et ses différents niveaux est à discuter. Il est en effet possible que la déplétion de BRD2, contrairement à celle de TIP60, agisse uniquement à un niveau de structuration supérieur de la chromatine (Fig 4). En effet, le test de DAPI CV atteste d'une réorganisation spatiale et pas forcément d'une décompaction de la fibre de chromatine à proprement parlée. L'utilisation d'autres techniques telles que des digestions MNases permettrait de creuser cette question.

On peut également envisager l'acétylation d'autres résidus d'histones par TIP60. chez *S.pombe*, Mst1 acétyle H3K4 au niveau des péricentromères, afin de recomparer la chromatine en fin de phase S (Xhemalce and Kouzarides 2009). Mes résultats montrent, dans des cellules humaines, que TIP60 est impliquée dans l'acétylation de ce résidu. Pour des raisons de spécificités d'anticorps, la présence d'H3K4ac aux péricentromères n'a pas pu être mise à jour de manière fiable dans mes résultats, mais cette acétylation reste une piste intéressante, sur ce mécanisme TIP60 et hétérochromatine. A noter qu'H3K4ac est spécifiquement reconnu par un domaine de la protéine PB1 (Poly-Bromodomaine 1), qui fait partie du complexe PBAF, impliqué dans l'assemblage des kinétochores (Chandrasekaran and Thompson 2007). Une récente étude dans les cellules souches embryonnaires SUV39H 1/2 -/- détecte dans les péricentromères, la présence de la mono-acétylation d'H3K9 et d'H3K14ac (Saksouk et al. 2014), cette dernière étant une cible *in vitro* connue de TIP60 (Kimura and Horikoshi 1998). Or, BRD4 se lie *in vitro* se lie faiblement à un peptide H3 acétylé sur K14.

En effet, il est à noter qu'on obtient les mêmes phénotypes de décompaction et augmentation du nombre de micronoyaux après siRNA BRD4 dans les SUV39H 1/2 -/-. Une étude récente montre que l'acétylation de Twist par TIP60, est responsable du recrutement de BRD4 sur le promoteur et l'enhancer du gène Wnt5a, permettant son expression (Shi et al. 2014). Des études ont impliquées BRD4 dans la régulation de structure chromatinienne à plusieurs reprises ces dernières années notamment via le recrutement de condensines aux sites de cassures de l'ADN (Floyd et al. 2013). Le fait que le siRNA BRD4 est déjà connu pour entraîner une décompaction générale de la chromatine doit évidemment être pris en compte dans l'interprétation de mes données (Wang et al. 2012),(Floyd et al. 2013).

Finalement, l'acétylation par TIP60 de protéines non histones aux péricentromères n'est évidemment pas non plus à exclure.

2 Recrutement de TIP60 dans l'hétérochromatine

Au-delà du mécanisme d'action de TIP60, il reste à comprendre les modalités de recrutement de TIP60 à l'hétérochromatine péricentrique. Dans l'euchromatine, le chromodomaine de TIP60 permet sa liaison *via* H3K4me3 au niveau des promoteurs des gènes cibles de NFKB (Kim et al. 2015). Son chromodomaine est également capable de se lier *in vitro* à H3K9me3 (Sun et al. 2009). Chez *S.pombe*, l'acétylation d'H3K4 aux péricentromères, mise en place par Mst1, a lieu en fin de phase S, juste après le pic de di-méthylation d'H3K9 (Xhemalce and Kouzarides 2009).

De la levure à l'homme, TIP60 est impliquée à divers niveaux dans la signalisation et la réparation des dommages à l'ADN, en acétylant, entre autre, l'histone H4, ou encore la kinase ATM, aux sites de cassures (Sun et al. 2010). Or, bien que les régions hétérochromatiniennes semblent être moins touchées par les dommages que le reste de chromatine, des dommages peuvent tout de même y avoir lieu, et TIP60 y serait alors recrutée. Il a été suggéré que l'interaction de TIP60 avec H3K9me3 *via* son chromodomaine, est nécessaire pour l'activation de TIP60 aux sites de cassures de l'ADN (Sun et al. 2009). Finalement, une étude de 2014 suggère une hétérochromatinisation autour des sites de cassures ayant lieu dans l'euchromatine, faisant encore le lien entre TIP60 et un recrutement hétérochromatinien (Ayrapetov et al. 2014). Ainsi, la réparation des cassures à l'ADN représente le premier lien entre TIP60 et hétérochromatine chez les mammifères, et tout indique que TIP60 y est recrutée par son chromodomaine sur H3K9me3. Or, H3K9me3 est évidemment perdu dans les SUV39H $\frac{1}{2}$ *-/-*, où TIP60 est tout de même recrutée. On peut envisager que ce recrutement ait lieu, toujours *via* son chromodomaine sur la mono-méthylation de H3K9, qui y est toujours présente.

Chez la souris, H4K12ac est enrichie à la fois dans le modèle des cellules SUV39H $\frac{1}{2}$ *-/-*, et dans les NIH3T3 traitées à la 5-azacytidine. On peut donc imaginer que TIP60 est recrutée selon les mêmes modalités dans ces deux modèles, soit sur une marque chromatinienne commune, soit par une interaction avec une protéine recrutée à la chromatine dans ces deux cas.

TIP60 pourrait également être recrutée à cette hétérochromatine *via* une autre sous-unité du complexe TIP60. Se pose alors la question de savoir si TIP60 y est recrutée avec son complexe. Il existe des arguments permettant de suggérer que c'est l'ensemble du complexe TIP60 qui joue un rôle dans l'hétérochromatine, notamment au travers d'études sur le variant d'histone H2Az. Ce dernier est incorporé entre autre par l'ATPase P400, sous-unité du complexe TIP60, chez les mammifères. Il est présent aux péricentromères des cellules sauvages, où il est incorporé en G1, et sa déplétion entraîne des défauts de ségrégations chromosomiques (Rangasamy et al. 2004). Il est décrit comme sur-enrichi dans les péricentromères des SUV39H $\frac{1}{2}$ *-/-*, et dans les NIH3T3 traitées 5-azacytidine, comparé aux NIH3T3 (Boyarchuk et al. 2014). En effet, j'observe des phénotypes de

déstructuration des péricentromères (augmentation du nombre de micronoyaux, DAPI CV, polyploïdie) après siRNA P400 dans les SUV39H ½ -/-, suggérant un rôle du complexe TIP60 dans son ensemble. De plus, en 2012, lors de l'analyse de protéines interagissant avec les nucléosomes contenant H2Az, BRD2 a été identifiée comme fortement enrichie, et ce de façon dépendante de l'acétylation d'H4 (Draker et al. 2012). Ainsi, l'enrichissement d'H2Az aux péricentromères des cellules SUV39H ½ -/- serait cohérent avec la présence de la voie TIP60-H4K12ac, et appuierait l'idée que TIP60 soit recrutée au sein de son complexe.

C Relevance physiologique du modèle SUV39H ½ -/-

Les cellules SUV39H ½ -/- représentent un modèle qui a permis historiquement de mieux comprendre les bases moléculaires du maintien et de surtout de la mise en place de l'hétérochromatine péricentromérique, et qui est encore utilisé régulièrement dans ce but. Néanmoins, ce modèle est obtenu par une modification génétique, artificielle, et se pose la question d'une relevance physiologique d'une voie identifiée dans ce contexte. Nous allons examiner plusieurs situations observées dans un contexte physiologique, qui pourraient utiliser cette voie de compaction TIP60-H4K12ac-BRD2.

- **1 La voie TIP60-H4K12ac au cours du développement précoce**

Dans l'oocyte fécondé, juste après l'échange protamines-histones, les génomes paternel et maternel sont encore séparés en pronucléus mâle et femelle. Alors que les péricentromères du pronucléus femelle présentent déjà les modifications de l'hétérochromatine constitutive, les péricentromères du pronucléus mâles sont sous une forme transitoire, plutôt représentative d'une hétérochromatine facultative, dénuée du trio SUV39H/H3K9me3/HP1 (Almouzni and Probst 2011),(Saksouk et al. 2014). Il est donc légitime d'imaginer la présence de la voie TIP60-H4K12ac identifiée dans les SUV39H ½ -/- dans ce contexte.

H4K12ac est fortement impliquée dans le processus de spermatogenèse chez la souris (Paradowska et al. 2012). En effet, H4K12ac est présente, avec H4K8ac, au niveau de l'unique chromocentre dans les spermatides en élongation (van der Heijden et al. 2006). Dans le spermatozoïde, alors que 85% des histones sont remplacés par des protamines au cours de la spermatogenèse, 15% des histones somatiques sont toujours présentes, et H4K12ac y est enrichie au niveau de divers promoteurs. Ainsi, après la fécondation, on retrouve un fort marquage d'H4K12ac au niveau du pronucleus mâle comparé au pronucléus femelle (Paradowska et al. 2012). Néanmoins, sa présence au niveau des péricentromères en particulier, n'a, à ma connaissance, pas été analysée. Il est à noter que les souris homozygotes KO pour TIP60 meurent précocement au cours du développement embryonnaire, peu

après avoir atteint le stade blastocyste (Hu et al. 2009), c'est-à-dire à priori, après la mise en place des péricentromères, qui est atteinte au stade 8-cellules. Le fait que les embryons atteignent ce stade blastocyste laisse penser que le rôle de TIP60 dans la formation *de novo* des péricentromères n'est pas crucial. Il serait donc possible d'étudier dans ces souris, des éventuelles anomalies de la mise en place des péricentromères, ainsi que la présence de TIP60 et H4K12ac dans ces derniers, ce avant la létalité embryonnaire causée par la perte de TIP60.

- **2 La voie TIP60-H4K12ac dans les cellules normales**

L'ajout d'un vecteur SUV39H dans les SUV39H $\frac{1}{2}$ *-/-*, suffit à réverser l'effet du siRNA TIP60 sur la transcription des satellites, suggérant une spécificité de cette voie aux péricentromères destructurés. Nous ne détectons dans les NIH3T3, ni d'augmentation de la polyploïdie, ni apparition de micronoyaux, ni augmentation de l'expression des satellites après siRNA TIP60. Néanmoins, nous y détectons aux péricentromères, une faible présence d'H4K12ac, modulable par le siRNA TIP60. Il est imaginable que la voie TIP60-H4K12ac soit présente dans les cellules normales, mais dans une fenêtre spatio-temporelle particulière. En effet, la présence de cette voie dans les péricentromères pourrait être temporellement réduite à la fenêtre de la phase S, et spatialement réduite aux frontières de l'hétérochromatine péricentromérique durant le reste du cycle.

a Au cours de la phase S

L'enrichissement d'H4K12ac est faible dans les NIH3T3, mais non nul, et est affecté par le siRNA TIP60 (données non montrées). Il est en effet envisageable que la voie TIP60-H4K12ac existe dans les cellules sauvages dans une fenêtre de temps courte au cours du cycle cellulaire. Il a été décrit que le déroulement correct de l'entrée en phase S, et de la réplication de l'hétérochromatine péricentrique, est médié par la phosphorylation de SUV39H par la kinase dépendante des cyclines CDK2, entraînant sa dissociation de l'hétérochromatine. Cette dissociation de SUV39H de l'hétérochromatine péricentrique s'accompagne d'un enrichissement pour la déméthylase JMJD2A, et d'une diminution d'H3K9me3 (Park et al. 2014). La voie H4K12ac-TIP60 pourrait éventuellement trouver sa place dans cette fenêtre d'absence de SUV39H. En effet, j'observe dans des résultats préliminaires en ChIP sur des cellules synchronisées, un enrichissement en H4K12ac au cours de la phase S dans des NIH3T3, bien que le moment exact de la réplication de cette hétérochromatine dans les cellules de souris soit encore discuté (Guenatri et al. 2004),(Weidtkamp-Peters et al. 2006). Ainsi, on peut imaginer un modèle où TIP60 serait recrutée dans les cellules sauvages, au moment de la phase S, en absence de SUV39H. La voie TIP60-H4K12ac permettrait alors de maintenir une certaine compaction de la

chromatine, tout en permettant une certaine plasticité nécessaire à la réplication. Il est également à noter qu'H4K12ac, tout comme H4K5ac, sont des modifications d'histones mises en place dans le cytoplasme, et participant à l'import des histones nouvellement synthétisées dans le noyau, et à leur intégration dans la chromatine au cours de la réplication. Ceci est cohérent avec cette détection en phase S, et Il serait donc judicieux d'étudier la présence d'H4K5ac, et leur dynamique après traitement avec des siRNA TIP60 au cours de la phase S. Le domaine BD2 de BRD2 se lie à H4 acétylé simultanément sur K5 et K12 (Umehara et al. 2010), ce qui ferait sens avec la présence de la voie TIP60-H4K12ac pendant la réplication, et au recrutement de BRD2 pour cette compaction. En revanche, H2AZ est à priori incorporé en G1, et non en phase S, ce qui serait potentiellement incohérent avec cette hypothèse (Boyarchuk et al. 2014). Comme autre argument, mes données montrent que dans les cellules SUV39H ½ -/-, TIP60 a un effet répressif sur la transcription des séquences satellites, puisque sa diminution par ARN interférence entraîne une augmentation transcriptionnelle de ces séquences. Or l'expression des séquences satellites au cours du cycle dans les NIH3T3 montre une claire diminution au cours de la phase S (Fig 26). TIP60 pourrait donc permettre une répression transcriptionnelle des séquences satellites dans ce contexte où la chromatine se retrouve nécessairement ouverte pour permettre la réplication de l'ADN en phase S.

b Frontières de l'hétérochromatine péricentromérique

La voie TIP60-H4K12ac-BRD2, pourrait, dans les cellules sauvages, être uniquement localisée au niveau de la frontière de l'hétérochromatine péricentrique. Chez la levure *S.cerevisiae*, H2Az est présent en larges domaines à proximité des télomères, et antagonise l'envahissement des protéines Sir dans l'euchromatine (Meneghini et al. 2003). Chez les mammifères H2Az est localisé au niveau de différents éléments régulateurs (AmySvetolis et al. 2009). Il y a donc un lien entre H2Az et la notion d'insulation. Or, rappelons que BRD2 est une protéine interagissant préférentiellement avec les nucléosomes contenant H2Az (Draker et al. 2012). Dans les spermatides, chez la souris, BRD2 serait impliquée dans le maintien de la frontière de l'unique chromocentre (Berkovits and Wolgemuth 2013). De plus, La voie TIP60-H4K12ac présente une certaine analogie à ce qui est décrit dans les télomères de *S.cerevisiae*, où l'orthologue de TIP60, Esa1, acétyle H4K12. Dans cette structure, la protéine à double bromodomaine BDF1 est impliquée dans le maintien de la frontière des télomères (Ladurner et al. 2003). Or Esa1 est également impliquée dans le maintien de cette frontière en y acétylant H2Az. Ainsi cet ensemble TIP60/H4K12ac/H2Az/Protéine à double bromodomaines semble clairement impliqué dans le maintien des frontières hétérochromatiniennes. Le mutant Esa1 présente une diminution de l'expression des gènes présents à la frontière des télomères (Babiarz et al. 2006). Or après siRNA TIP60 j'ai observé la diminution d'expression de deux gènes présents à la frontière des péricentromères dans les SUV39H ½ -/-. Il serait intéressant d'étendre cette expérience à un plus

grand nombre de gènes. En 2006, plusieurs sous-unités du complexe TIP60, et notamment l'orthologue de P400, ont été identifiées comme suppresseurs de variéation chez la drosophile (Qi et al. 2006).

- **3 La voie TIP60-H4K12ac au cours de la sénescence**

La présence d'H4K12ac, et sa dépendance à TIP60 est observable à la fois dans les cellules SUV39H ½ -/-, et dans les NIH3T3 traitées à la 5-azacytidine, soit dans deux cas moléculairement différents de déstructuration des péricentromères. Il est tentant d'étendre la présence de la voie H4K12ac-TIP60 à l'ensemble des situations physiologiques présentant des péricentromères déstructurées. La sénescence cellulaire correspond à la sortie irréversible des cellules du cycle cellulaire, et présente un certains nombre de caractéristiques spécifiques à cet état, et notamment un remaniement important de l'équilibre euchromatine/hétérochromatine de la cellule. TIP60 est impliquée dans le contrôle de ce destin cellulaire (Zheng et al. 2013). Or des anomalies de l'hétérochromatine péricentrique sont décrites dans les cellules sénescents, avec notamment une hypométhylation et une surexpression de certaines séquences satellites (Gaubatz and Cutler 1990),(Suzuki et al. 2002),(Swanson et al. 2013). Une surexpression du satellite 3 du chromosome 1 est d'ailleurs décrite dans un modèle de sénescence rélicative humaine (Enukashvily et al. 2007), et j'ai moi-même pu observer ce résultat sur un modèle de sénescence oncogénique. Nous sommes donc ici dans un cas de péricentromères destructurés, et un rôle de la voie TIP60-H4K12ac est à envisager.

- **4 La voie TIP60-H4K12ac dans la différenciation cellulaire**

Les souris KO pour TIP60 meurent peu après le stade blastocyste, et les auteurs suggèrent que la perte de TIP60 provoque une incapacité pour les cellules de la masse interne, à assurer la transition pluripotente – épiblaste/hypoblaste (Hu et al. 2009). Une étude chez la drosophile montre que la réduction de TIP60 conduit à une létalité embryonnaire, et suggère que TIP60 est essentielle au développement multi-cellulaire (Zhu et al. 2007). Ainsi, il semble que TIP60 soit une protéine associée au contrôle du destin cellulaire, que ce soit face au stress, mais également au cours du développement. En effet, TIP60 est à la fois impliquée dans le maintien des cellules souches embryonnaires (Fazio et al. 2008), et dans des processus de différenciation cellulaire. En 2002, une étude suggère que TIP60 régule la différenciation terminale et la prolifération dans le cœur en développement chez le poulet (Lough 2002).

Une étude récente suggère que les péricentromères participent à la répression de domaines chromatiniens en se déplaçant vers des régions à inactiver (Wijchers et al. 2015). Il se pourrait que les péricentromères jouent un rôle dans les processus de différenciation cellulaire, puisque qu'on y

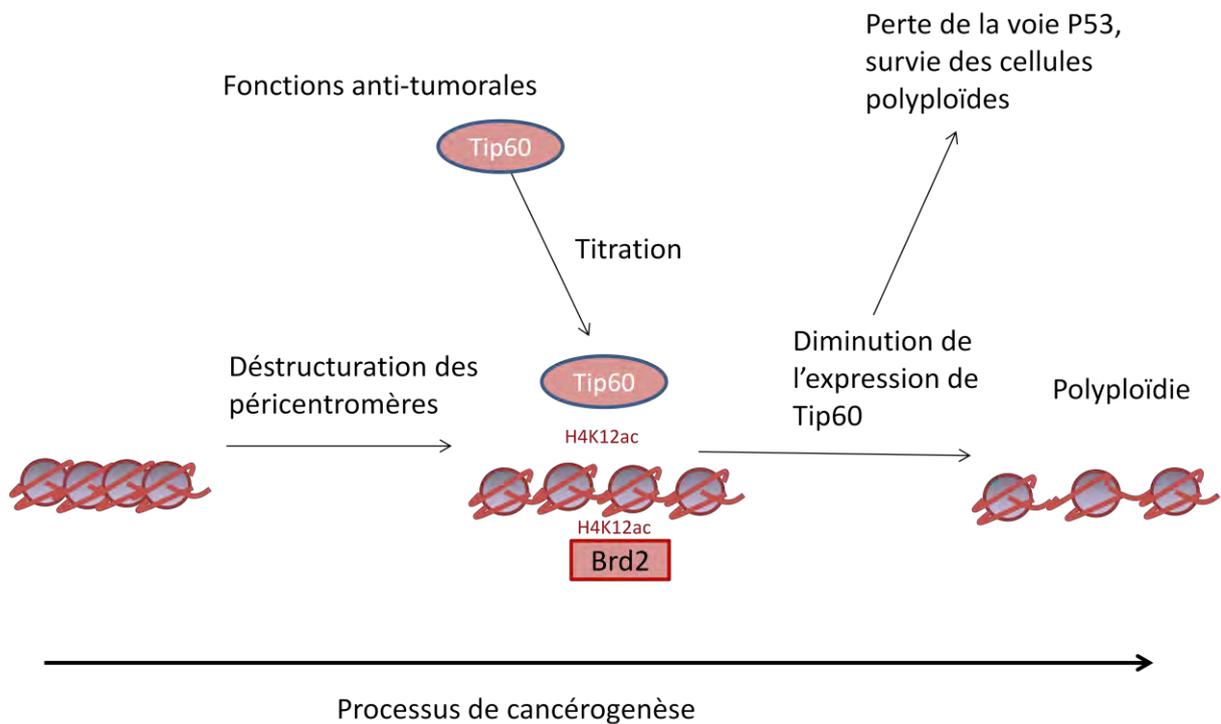


Figure 47 : Modèle du rôle de TIP60 au cours de la cancérogenèse *via* son rôle dans les péricentromères. Lors d'une déstructuration des péricentromères, TIP60 permet de maintenir une structuration correcte de ces derniers, et d'éviter une trop forte instabilité, qui pourrait conduire à une mortalité cellulaire. Ce recrutement de TIP60 affaiblit ses fonctions anti-tumorales dans le reste de la cellule, notamment l'apoptose induite en réponse aux dommages. Puis, lors du processus de cancérogenèse, et ce de manière relativement précoce, l'expression de TIP60 est diminuée, et la voie TIP60-H4K12ac n'est plus détectable aux péricentromères. L'instabilité génétique et la polyploïdie qui s'en suit favorisent l'agressivité tumorale, et les fonctions anti-tumorales de TIP60, et notamment la voie p53, se retrouvent amoindries.

observe dans certains cas une réorganisation spatiale des chromocentres, qui pourrait participer à une répression transcriptionnelle (Beil et al. 2002). Une surexpression massive des séquences satellites, ainsi qu'un remodelage de l'hétérochromatine, est décrite lors de la différenciation de myoblastes en myotubes en culture (Terranova et al. 2005). Or, en 2011, une étude montre que TIP60 est nécessaire dans ce même contexte (Kim et al. 2011), bien que cette expérience n'ait jamais été reproduite avec succès, ni par moi-même, ni par d'autre dans notre équipe. Une implication de TIP60 dans les péricentromères, voire de la voie TIP60-H4K12ac, au cours de processus de différenciation cellulaire est à envisager.

D Implications physio-pathologiques

TIP60 est une protéine pléiotropique, impliquée dans différents processus physiopathologiques. La déstructuration des péricentromères est un phénomène récurrent de nombreuses pathologies.

- **1 La voie TIP60-H4K12ac dans les cancers**

La polypléidie, et donc des défauts de ségrégations chromosomiques, constitue une signature de la plupart des tumeurs solides. Néanmoins, des défauts de l'hétérochromatine péricentrique dans les cancers n'ont été décrits que récemment. Ainsi, ont été détectées dans les péricentromères de divers lignées cellulaires tumorales ou tumeurs humaines, une hypométhylation de l'ADN, une perte de la triméthylation d'H3K9 à priori due à une surexpression de la déméthylase JMJD2B (Slee et al. 2012), ou encore des surexpressions des séquences satellites (Eymery et al. 2009),(Ting et al. 2011). De plus, le statut transcriptionnel de la protéine HP1 est clairement affecté dans un grand nombre de cancers (Dialynas et al. 2008). Ainsi, la voie TIP60-H4K12ac que nous décrivons dans les cellules SUV39H $\frac{1}{2}$ $-/-$, ou après traitement à la 5-azacytidine, pourrait être relevante des anomalies observées dans les cellules cancéreuses. Afin de tester cette hypothèse j'ai voulu tester la présence d'H4K12ac dans différentes lignées cancéreuses. Alors que je détecte des foyers H4K12ac, colocalisant avec les chromocentres dans les cellules SUV39H $\frac{1}{2}$ $-/-$, je n'ai pu détecter de tels foyers dans des lignées cancéreuses. Pourtant certaines ont été sélectionnées pour ces anomalies citées précédemment de l'hétérochromatine péricentrique. Néanmoins, il est à noter que l'expression de TIP60 est dérégulée dans la plupart des cancers, dans la majorité des cas dans le sens d'une diminution. Dans les cancers colorectaux, il a été mis en évidence une corrélation entre la sous-expression de TIP60 et l'agressivité tumorale (Sakuraba et al. 2009). Ainsi, la voie TIP60-H4K12ac pourrait être perdue de manière précoce au cours du processus de cancérogenèse. On peut imaginer un modèle où la voie TIP60-H4K12ac agirait au niveau des péricentromères au début du processus de transformation, où elle limiterait l'instabilité génétique due à des déficiences de

l'hétérochromatine péricentrique, et permettrait ainsi la survie des cellules. Par la suite, l'expression de TIP60 serait diminuée, et la voie TIP60-H4K12ac serait perdue, augmentant alors les problèmes de ségrégation. Or, la perte de TIP60 sous-entend la perte de la voie P53, qui participe à l'élimination des cellules présentant de l'instabilité génétique. La perte de TIP60 favoriserait ainsi la polyploïdie, et donc l'agressivité tumorale (Fig 47).

De plus, l'hétérochromatine représentant une part significative du génome (environ 10% chez la souris). Or TIP60 est considérée comme une protéine faiblement exprimée. On peut imaginer que son recrutement sur ces séquences répétées provoquerait une titration importante de TIP60, qui pourrait éventuellement affaiblir ses fonctions dans le reste du noyau. Le recrutement de TIP60 dans ces régions fortement répétées au début du processus de tumorigenèse, pourrait donc diminuer ses fonctions de suppresseur de tumeur, ce qui serait bénéfique pour la cellule cancéreuse (Fig 47). Les quelques expériences réalisées dans l'idée de tester cette hypothèse de titration, *via* l'effet du siRNA TIP60 sur l'activité de la voie Wnt, vont dans le sens de cette hypothèse.

- **2 TIP60, péricentromères, et virus HIV**

TIP60 a été indentifiée par son interaction avec la protéine TAT du virus HIV-1, une protéine transactivatrice qui permet d'augmenter la transcription de l'ADN du virus. Lors de son infection dans les lymphocytes, le virus du HIV est responsable d'une ségrégation prématurée des chromatides sœurs. Cet effet est médié par le recrutement de la HAT P300 au niveau des chromosomes mitotiques par une des protéines codée par le virus, la protéine vrp. Ce recrutement forcé de P300 entraîne la délocalisation de HP1 des centromères (Shimura et al. 2011). Une intervention de TIP60 dans ce phénomène pour un maintien basal des péricentromères, une régulation de l'acétylation plus fine, n'est pas à exclure, d'autant plus que des interactions existent entre TIP60 et P300 (Xiao et al. 2014), puisque P300 est capable d'acétyler directement TIP60 (Col et al. 2005).

- **3 TIP60, péricentromères, et maladie d'Alzheimer**

La maladie l'Alzheimer, est une maladie neuro-dégénérative liée à l'âge. Les péricentromères sont des structures sensibles au stress cellulaires, voire impliqués dans la réponse physiologiques à ces stress. En effet, une large gamme de stress est capable de provoquer une surexpression des séquences satellites dans les cellules humaines, conduisant, au moins dans le cas du stress thermique à la formation de granules de stress au niveau des péricentromères dont la fonction physiologique reste floue (Eymery et al. 2010). Dans la maladie d'Alzheimer, une forte implication du stress oxydatif et des espèces réactives à l'oxygène est mise en avant dans les neurones, et est liée à l'apparition d'aneuploïdie. Or le stress oxydatif fait partie de cette gamme de stress capable d'entraîner une

surexpression de séquences satellites (Valgardsdottir et al. 2008). Il ne serait pas étonnant que l'hétérochromatine des péricentromères des neurones soit affectée dans cette pathologie, ce qui n'a, à ma connaissance, pas été étudié. Si les péricentromères sont affectés, et que TIP60 participe effectivement au maintien des péricentromères déstructurés, alors un rôle de TIP60 dans ce cas peut être envisagé. TIP60 est déjà connu pour être impliquée dans cette pathologie par différents aspects. En effet, au centre de cette pathologie, se trouve la protéine transmembranaire APP, qui se retrouve clivée par la gamma-sécrétase de manière anormale, générant deux fragments. L'un s'accumule en agrégats extra-cellulaire qui participent très certainement au processus neuro-dégénératif observé dans la maladie. L'autre fragment, intracellulaire, recrute le complexe Fe65-TIP60, et agit sur l'activation transcriptionnelle de nombreux gènes, participant ainsi à l'apoptose neuronale (Kinoshita et al. 2002). Cette voie de signalisation est également en interconnexion avec la voie Notch, lui-même substrat de TIP60.

Des études ont révélées de l'aneuploïdie, et spécifiquement de la tétraploïdie, dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'alzheimer, comparés à des individus sains (Frade and Lopez-Sanchez 2010). Etant donné que les neurones adultes sont considérés comme non-prolifératifs, l'aneuploïdie dans ces cellules inclut deux possibilités, une ré-entrée des neurones dans le cycle, ou des anomalies mitotiques au niveau des progéniteurs neuronaux (Mosch et al. 2007). Or, les séquences satellites sont surexprimées lors la différenciation des neurones chez la souris (Kishi et al. 2012). Des analyses d'expression après déplétion de TIP60 chez la drosophile, mettent en avant la dérégulation de nombreux gènes associés au fonctionnement neuronal, y compris des gènes impliqués dans la neurogenèse (Lorbeck et al. 2011), un rôle de TIP60 dans les péricentromères au moment de la différenciation neuronale serait à envisager. De plus, l'expression des séquences LINEs, dont nous montrons que l'expression est dépendante de TIP60 en absence de SUV39H, est très active dans les progéniteurs neuronaux, où elle participe à créer une diversification génomique (Upton et al. 2015).

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'identification d'une voie redondante dans différents modèles de péricentromères déstructurés a été mise à jour récemment, avec la protéine BEND3, qui dans les cellules ES SUV39H ½ -/-, et les cellules KO pour les DNA méthyltransférases Dnmt1, DNMT3A, et DNMT3B, permet de passer d'un état d'hétérochromatine constitutive à facultative (Saksouk et al. 2014). Ici, nous mettons à jour une voie TIP60-H4K12ac, impliquant la protéine à double bromodomaine BRD2, et potentiellement la protéine P400 ainsi que le variant d'histone H2AZ, elle aussi potentiellement redondante dans deux modèles différents de déstructuration des péricentromères. De même que la voie BEND3, il est fort probable que cette voie TIP60-H4K12ac-BRD2 soit liée à la notion de transition HC facultative-constitutive, et soit présente dans différents contextes de péricentromères déstructurés. Il est tentant d'imaginer qu'elle pourrait participer à différents processus physiologiques, tel que l'établissement de la chromatine des péricentromères du pronucléus mâle au cours du développement précoce. Mais elle pourrait surtout participer à des contextes physiopathologiques, notamment dans le cadre du cancer, en accord avec la fonction suppresseur de tumeur de TIP60. Il est également fort probable que cette voie soit spatio-temporellement présente dans les cellules sauvages. Son rôle dans le maintien de la frontière de l'hétérochromatine péricentrique chez les mammifères mériterait réellement d'être testé. Finalement, cette voie représente un nouvel élément liant acétylation et hétérochromatine, *via* des protéines à double bromodomains, liens qui sont décrits pour l'instant de manière quasi inexistantes dans les cellules de mammifères.

RÉFÉRENCES

- Akhtar, A., Zink, D., and Becker, P.B. 2000. Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* **407**(6802): 405-409.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. 1964. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**(5): 786-794.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhhattar, R., Shilatifard, A., Workman, J., and Zhang, Y. 2007. New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes. *Cell* **131**(4): 633-636.
- Almouzni, G.v. and Probst, A.V. 2011. Heterochromatin maintenance and establishment: Lessons from the mouse pericentromere. *Nucleus* **2**(5): 332-338.
- Altaf, M., Auger, A.a., Monnet-Saksouk, J., Brodeur, J.I., Piquet, S., Cramet, M., Bouchard, N., Lacoste, N., Utley, R.T., Gaudreau, L., and Côté, J. 2010. NuA4-dependent Acetylation of Nucleosomal Histones H4 and H2A Directly Stimulates Incorporation of H2A.Z by the SWR1 Complex. *The Journal of Biological Chemistry* **285**(21): 15966-15977.
- Alvarez, F., Munoz, F., Schilcher, P., Imhof, A., Almouzni, G.v., and Loyola, A. 2011. Sequential Establishment of Marks on Soluble Histones H3 and H4. *The Journal of Biological Chemistry* **286**(20): 17714-17721.
- AmySvotelis, A.S., Nicolas Gévry, N.G., and LucGaudreau, L.G. 2009. Regulation of gene expression and cellular proliferation by histone H2A.Z. *Biochemistry and Cell Biology* **87**(1): 179-188.
- Andreyeva, E.N., Kolesnikova, T.D., Demakova, O.V., Mendez-Lago, M., Pokholkova, G.V., Belyaeva, E.S., Rossi, F., Dimitri, P., Villasante, A., and Zhimulev, I.F. 2007. High-resolution analysis of Drosophila heterochromatin organization using SuUR Su(var)3-9 double mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(31): 12819-12824.
- Aygün, O., Mehta, S., and Grewal, S.I.S. 2013. HDAC mediated suppression of histone turnover promotes epigenetic stability of heterochromatin. *Nature structural & molecular biology* **20**(5): 547-554.
- Ayrapetov, M.K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y., and Price, B.D. 2014. DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(25): 9169-9174.
- Babiarz, J.E., Halley, J.E., and Rine, J. 2006. Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* **20**(6): 700-710.
- Bailey, J.A., Carrel, L., Chakravarti, A., and Eichler, E.E. 2000. Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: The Lyon repeat hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(12): 6634-6639.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* **21**(3): 381-395.
- Beil, M., Dürschmied, D., Paschke, S., Schreiner, B., Nolte, U., Bruel, A., and Irinopoulou, T. 2002. Spatial distribution patterns of interphase centromeres during retinoic acid-induced differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cytometry* **47**(4): 217-225.
- Beil, M., Fleischer, F., Paschke, S., and Schmidt, V. 2005. Statistical analysis of the three-dimensional structure of centromeric heterochromatin in interphase nuclei. *Journal of Microscopy* **217**(1): 60-68.
- Belan, E. 2013. LINEs of evidence: noncanonical DNA replication as an epigenetic determinant. *Biology Direct* **8**: 22-22.
- Belkina, A.C. and Denis, G.V. 2012. BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nature reviews Cancer* **12**(7): 465-477.
- Berkovits, B.D. and Wolgemuth, D.J. 2011. The first bromodomain of the testis-specific double bromodomain protein Brdt is required for chromocenter organization that is modulated by genetic background. *Developmental Biology* **360**(2): 358-368.

- Berkovits, B.D. and Wolgemuth, D.J. 2013. The Role of the Double Bromodomain-Containing BET Genes During Mammalian Spermatogenesis. *Current topics in developmental biology* **102**: 293-326.
- Boyarchuk, E., Filipescu, D., Vassias, I., Cantaloube, S., and Almouzni, G.v. 2014. The histone variant composition of centromeres is controlled by the pericentric heterochromatin state during the cell cycle. *Journal of Cell Science* **127**(15): 3347-3359.
- Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, B.M., and Broach, J.R. 1996. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Molecular and Cellular Biology* **16**(8): 4349-4356.
- Brooker, A.S. and Berkowitz, K.M. 2014. The roles of cohesins in mitosis, meiosis, and human health and disease. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **1170**: 229-266.
- Bulut-Karslioglu, A., De La Rosa-Velazquez, I., Ramirez, F., Barenboim, M., Onishi-Seebacher, M., Arand, J., Galan, C., Winter GE., Engist, B., Gerle, B., O'Sullivan, Roderick J., Martens, Joost H.A., Walter, J.r., Manke, T., Lachner, M., and Jenuwein, T. 2014. Suv39h-Dependent H3K9me3 Marks Intact Retrotransposons and Silences LINE Elements in Mouse Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell* **55**(2): 277-290.
- Bulut-Karslioglu, A., Perrera, V., Scaranaro, M., de la Rosa-Velazquez, I.A., van de Nobelen, S., Shukeir, N., Popow, J., Gerle, B., Opravil, S., Pagani, M., Meidhof, S., Brabletz, T., Manke, T., Lachner, M., and Jenuwein, T. 2012. A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nat Struct Mol Biol* **19**(10): 1023-1030.
- Canzio, D., Larson, A., and Narlikar, G.J. 2014. Mechanisms of functional promiscuity by HP1 proteins. *Trends in Cell Biology* **24**(6): 377-386.
- Cao, F., Li, X., Hiew, S., Brady, H., Liu, Y., and Dou, Y. 2009. Dicer independent small RNAs associate with telomeric heterochromatin. *RNA* **15**(7): 1274-1281.
- Chandrasekaran, R. and Thompson, M. 2007. Polybromo-1-bromodomains bind histone H3 at specific acetyl-lysine positions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**(3): 661-666.
- Chang, C.S. and Pillus, L. 2009. Collaboration Between the Essential Esa1 Acetyltransferase and the Rpd3 Deacetylase Is Mediated by H4K12 Histone Acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **183**(1): 149-160.
- Chen, C.-C., Carson, J.J., Feser, J., Tamburini, B., Zabaronick, S., Linger, J., and Tyler, J.K. 2008. Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair, signaling for the completion of repair. *Cell* **134**(2): 231-243.
- Chen, Y., Sprung, R., Tang, Y., Ball, H., Sangras, B., Kim, S.C., Falck, J.R., Peng, J., Gu, W., and Zhao, Y. 2007. Lysine Propionylation and Butyrylation Are Novel Post-translational Modifications in Histones. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**(5): 812-819.
- Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., Gilbert, D.M., Singh, P.B., and Misteli, T. 2003. Maintenance of Stable Heterochromatin Domains by Dynamic HP1 Binding. *Science* **299**(5607): 721-725.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. 2009. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science* **325**(5942): 834-840.
- Clarke, A.S., Samal, E., and Pillus, L. 2006. Distinct Roles for the Essential MYST Family HAT Esa1p in Transcriptional Silencing. *Molecular Biology of the Cell* **17**(4): 1744-1757.
- Col, E., Caron, C.c., Chable-Bessia, C., Legube, G., Gazzeri, S., Komatsu, Y., Yoshida, M., Benkirane, M., Trouche, D., and Khochbin, S. 2005. HIV-1 Tat targets Tip60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses. *The EMBO Journal* **24**(14): 2634-2645.
- Cooper, S., Dienstbier, M., Hassan, R., Schermelleh, L., Sharif, J., Blackledge, N., De Marco, V., Elderkin, S., Koseki, H., Klose, R., Heger, A., and Brockdorff, N. 2014. Targeting Polycomb to Pericentric Heterochromatin in Embryonic Stem Cells Reveals a Role for H2AK119u1 in PRC2 Recruitment. *Cell Reports* **7**(5): 1456-1470.
- Cosgrove, M.S., Boeke, J.D., and Wolberger, C. 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1037-1043.

- Dai, L., Peng, C., Montellier, E., Lu, Z., Chen, Y., Ishii, H., Debernardi, A., Buchou, T., Rousseaux, S., Jin, F., Sabari, B.R., Deng, Z., Allis, C.D., Ren, B., Khochbin, S., and Zhao, Y. 2014. Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. *Nat Chem Biol* **10**(5): 365-370.
- Dalvai, M., Bellucci, L., Fleury, L., Lavigne, A.C., Moutahir, F., and Bystricky, K. 2013. H2A.Z-dependent crosstalk between enhancer and promoter regulates Cyclin D1 expression. *Oncogene* **32**(36): 4243-4251.
- Dawson, Mark A. and Kouzarides, T. 2012. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell* **150**(1): 12-27.
- Deng, X., Berletch, J.B., Ma, W., Nguyen, D.K., Noble, W.S., Shendure, J., and Distche, C.M. 2013. Upregulation of the mammalian X chromosome is associated with enhanced transcription initiation, MOF-mediated H4K16 acetylation, and longer RNA half-life. *Developmental Cell* **25**(1): 55-68.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. 2003. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(15): 8758-8763.
- Dey, A., Nishiyama, A., Karpova, T., McNally, J., and Ozato, K. 2009. Brd4 Marks Select Genes on Mitotic Chromatin and Directs Postmitotic Transcription. *Molecular Biology of the Cell* **20**(23): 4899-4909.
- Di Cerbo, V., Mohn, F., Ryan, D.P., Montellier, E., Kacem, S., Tropberger, P., Kallis, E., Holzner, M., Hoerner, L., Feldmann, A., Richter, F.M., Bannister, A.J., Mittler, G., Michaelis, J., Khochbin, S., Feil, R., Schuebeler, D., Owen-Hughes, T., Daujat, S., and Schneider, R. 2014. Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription. *eLife* **3**: e01632.
- Dialynas, G.K., Vitalini, M.W., and Wallrath, L.L. 2008. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutation research* **647**(1-2): 13-20.
- Doyon, Y. and Côté, J. 2004. The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**(2): 147-154.
- Draker, R., Ng, M.K., Sarcinella, E., Ignatchenko, V., Kislinger, T., and Cheung, P. 2012. A Combination of H2A.Z and H4 Acetylation Recruits Brd2 to Chromatin during Transcriptional Activation. *PLoS Genetics* **8**(11): e1003047.
- Duan, Q., Chen, H., Costa, M., and Dai, W. 2008. Phosphorylation of H3S10 Blocks the Access of H3K9 by Specific Antibodies and Histone Methyltransferase: IMPLICATION IN REGULATING CHROMATIN DYNAMICS AND EPIGENETIC INHERITANCE DURING MITOSIS. *The Journal of Biological Chemistry* **283**(48): 33585-33590.
- Dupont, C., Guimiot, F., Perrin, L., Marey, I., Smiljkovski, D., Le Tessier, D., Lebugle, C., Baumann, C., Bourdoncle, P., Tabet, A.C., Aboura, A., Benzacken, B., and Dupont, J.M. 2012. 3D position of pericentromeric heterochromatin within the nucleus of a patient with ICF syndrome. *Clinical Genetics* **82**(2): 187-192.
- Durrin, L.K., Mann, R.K., Kayne, P.S., and Grunstein, M. 1991. Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell* **65**(6): 1023-1031.
- Ejlassi-Lassalette, A.d., Mocquard, E.s., Arnaud, M.-C., and Thiriet, C. 2011. H4 replication-dependent diacetylation and Hat1 promote S-phase chromatin assembly in vivo. *Molecular Biology of the Cell* **22**(2): 245-255.
- Elgin, S.C.R. and Reuter, G. 2013. Position-Effect Variegation, Heterochromatin Formation, and Gene Silencing in Drosophila. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**(8).
- Enukashvily, N.I., Donev, R., Waisertreiger, I.S.R., and Podgornaya, O.I. 2007. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells. *Cytogenetic and Genome Research* **118**(1): 42-54.
- Eot-Houllier, G.g., Fulcrand, G.r., Magnaghi-Jaulin, L., and Jaulin, C. 2009. Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer Letters* **274**(2): 169-176.

- Eymery, A.I., Horard, B.a., Atifi-Borel, M.I.E., Fourel, G.v., Berger, F.o., Vitte, A.-L., Van den Broeck, A., Brambilla, E., Fournier, A., Callanan, M., Gazzeri, S., Khochbin, S., Rousseaux, S., Gilson, E., and Vourc'h, C. 2009. A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Research* **37**(19): 6340-6354.
- Eymery, A.I., Souchier, C., Vourc'h, C., and Jolly, C. 2010. Heat shock factor 1 binds to and transcribes satellite II and III sequences at several pericentromeric regions in heat-shocked cells. *Experimental Cell Research* **316**(11): 1845-1855.
- Fazio, T.G., Huff, J.T., and Panning, B. 2008. An RNAi Screen of Chromatin Proteins Identifies Tip60-p400 as a Regulator of Embryonic Stem Cell Identity. *Cell* **134**(1): 162-174.
- Fedoseyeva, V.B. and Alexandrov, A.A. 2014. Large-scale periodicity of nucleosome positioning signal in pericentric regions of chromosomes (*Drosophila melanogaster*). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **32**(12): 2042-2050.
- Ferree, P.M. and Prasad, S. 2012. How Can Satellite DNA Divergence Cause Reproductive Isolation? Let Us Count the Chromosomal Ways. *Genetics Research International* **2012**: 11.
- Festenstein, R., Pagakis, S.N., Hiragami, K., Lyon, D., Verreault, A., Sekkali, B., and Kioussis, D. 2003. Modulation of Heterochromatin Protein 1 Dynamics in Primary Mammalian Cells. *Science* **299**(5607): 719-721.
- Filippakopoulos, P., Picaud, S., Mangos, M., Keates, T., Lambert, J.-P., Barsyte-Lovejoy, D., Felletar, I., Volkmer, R., Müller, S., Pawson, T., Gingras, A.-C., Arrowsmith, Cheryl H., and Knapp, S. 2012. Histone Recognition and Large-Scale Structural Analysis of the Human Bromodomain Family. *Cell* **149**(1): 214-231.
- Floyd, S.R., Pacold, M.E., Huang, Q., Clarke, S.M., Lam, F.C., Cannell, I.G., Bryson, B.D., Rameseder, J., Lee, M.J., Blake, E.J., Fydrych, A., Ho, R., Greenberger, B.A., Chen, G.C., Maffa, A., Del Rosario, A.M., Root, D.E., Carpenter, A.E., Hahn, W.C., Sabatini, D.M., Chen, C.C., White, F.M., Bradner, J.E., and Yaffe, M.B. 2013. The Bromodomain Protein Brd4 Insulates Chromatin from DNA Damage Signaling. *Nature* **498**(7453): 246-250.
- Frade, J.M. and Lopez-Sanchez, N. 2010. A novel hypothesis for Alzheimer disease based on neuronal tetraploidy induced by p75NTR. *Cell Cycle* **9**(10): 1934-1941.
- Fukagawa, T. and Earnshaw, William C. 2014. The Centromere: Chromatin Foundation for the Kinetochore Machinery. *Developmental Cell* **30**(5): 496-508.
- Garcia-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A.H.F.M., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. 2004. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* **36**(1): 94-99.
- Garcia, B.A., Hake, S.B., Diaz, R.L., Kauer, M., Morris, S.A., Recht, J., Shabanowitz, J., Mishra, N., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Hunt, D.F. 2007. Organismal Differences in Post-translational Modifications in Histones H3 and H4. *Journal of Biological Chemistry* **282**(10): 7641-7655.
- Gaubatz, J.W. and Cutler, R.G. 1990. Mouse satellite DNA is transcribed in senescent cardiac muscle. *Journal of Biological Chemistry* **265**(29): 17753-17758.
- Gaucher, J., Boussouar, F., Montellier, E., Curtet, S., Buchou, T., Bertrand, S., Hery, P., Jounier, S., Depaux, A., Vitte, A.-L., Guardiola, P., Pernet, K., Debernardi, A., Lopez, F., Holota, H., Imbert, J., Wolgemuth, D.J., Gérard, M., Rousseaux, S., and Khochbin, S. 2012. Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *The EMBO Journal* **31**(19): 3809-3820.
- Gavaravarapu, S. and Kamine, J. 2000. Tip60 Inhibits Activation of CREB Protein by Protein Kinase A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **269**(3): 758-766.
- Ge, Z., Nair, D., Guan, X., Rastogi, N., Freitas, M.A., and Parthun, M.R. 2013. Sites of Acetylation on Newly Synthesized Histone H4 Are Required for Chromatin Assembly and DNA Damage Response Signaling. *Molecular and Cellular Biology* **33**(16): 3286-3298.
- Gilliland, W.D., Colwell, E.M., Osiecki, D.M., Park, S., Lin, D., Rathnam, C., and Barbash, D.A. 2015. Normal Segregation of a Foreign-Species Chromosome During *Drosophila* Female Meiosis Despite Extensive Heterochromatin Divergence. *Genetics* **199**(1): 73-83.

- Gomez, E.B., Nugent, R.L., Laria, S.n., and Forsburg, S.L. 2008. Schizosaccharomyces pombe Histone Acetyltransferase Mst1 (KAT5) Is an Essential Protein Required for Damage Response and Chromosome Segregation. *Genetics* **179**(2): 757-771.
- Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., Martinato, F., Sardella, D., Verrecchia, A., Bennett, S., Confalonieri, S., Cesaroni, M., Marchesi, F., Gasco, M., Scanziani, E., Capra, M., Mai, S., Nuciforo, P., Crook, T., Lough, J., and Amati, B. 2007. Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature* **448**(7157): 1063-1067.
- Goudarzi, A., Shiota, H., Rousseaux, S., and Khochbin, S. 2014. Genome-Scale Acetylation-Dependent Histone Eviction during Spermatogenesis. *Journal of Molecular Biology* **426**(20): 3342-3349.
- Grady, D.L., Ratliff, R.L., Robinson, D.L., McCanlies, E.C., Meyne, J., and Moyzis, R.K. 1992. Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(5): 1695-1699.
- Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C.I., and Almouzni, G.v. 2004. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *The Journal of Cell Biology* **166**(4): 493-505.
- Guillemette, B., Drogaris, P., Lin, H.-H.S., Armstrong, H., Hiragami-Hamada, K., Imhof, A., Bonneil, A., Thibault, P., Verreault, A., and Festenstein, R.J. 2011. H3 Lysine 4 Is Acetylated at Active Gene Promoters and Is Regulated by H3 Lysine 4 Methylation. *PLoS Genetics* **7**(3): e1001354.
- Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A.Y., Eck, S., Wörz, S., Sadic, D., Schulte, M., Mallm, J.-P., Maiser, A., Debs, P., von Melchner, H., Leonhardt, H., Schermelleh, L., Rohr, K., Rippe, K., Storchova, Z., and Schotta, G. 2013. Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes & Development* **27**(8): 859-872.
- Hebbes, T.R., Clayton, A.L., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. 1994. Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *The EMBO Journal* **13**(8): 1823-1830.
- Ho, J.W.K., Jung, Y.L., Liu, T., Alver, B.H., Lee, S., Ikegami, K., Sohn, K.-A., Minoda, A., Tolstorukov, M.Y., Appert, A., Parker, S.C.J., Gu, T., Kundaje, A., Riddle, N.C., Bishop, E., Egelhofer, T.A., Hu, S.e.S., Alekseyenko, A.A., Rechtsteiner, A., Asker, D., Belsky, J.A., Bowman, S.K., Chen, Q.B., Chen, R.A.J., Day, D.S., Dong, Y., Dose, A.C., Duan, X., Epstein, C.B., Ercan, S., Feingold, E.A., Ferrari, F., Garrigues, J.M., Gehlenborg, N., Good, P.J., Haseley, P., He, D., Herrmann, M., Hoffman, M.M., Jeffers, T.E., Kharchenko, P.V., Kolasinska-Zwierz, P., Kotwaliwale, C.V., Kumar, N., Langley, S.A., Larschan, E.N., Latorre, I., Libbrecht, M.W., Lin, X., Park, R., Pazin, M.J., Pham, H.N., Plachetka, A., Qin, B., Schwartz, Y.B., Shores, N., Stempor, P., Vielle, A., Wang, C., Whittle, C.M., Xue, H., Kingston, R.E., Kim, J.H., Bernstein, B.E., Dernburg, A.F., Pirrotta, V., Kuroda, M.I., Noble, W.S., Tullius, T.D., Kellis, M., MacAlpine, D.M., Strome, S., Elgin, S.C.R., Liu, X.S., Lieb, J.D., Ahringer, J., Karpen, G.H., and Park, P.J. 2014. Comparative analysis of metazoan chromatin organization. *Nature* **512**(7515): 449-452.
- Houzelstein, D., Bullock, S.L., Lynch, D.E., Grigorieva, E.F., Wilson, V.A., and Beddington, R.S.P. 2002. Growth and Early Postimplantation Defects in Mice Deficient for the Bromodomain-Containing Protein Brd4. *Molecular and Cellular Biology* **22**(11): 3794-3802.
- Hu, Y., Fisher, J.B., Koprowski, S., McAllister, D., Kim, M.-S., and Lough, J. 2009. Homozygous Disruption of the Tip60 Gene Causes Early Embryonic Lethality. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **238**(11): 2912-2921.
- Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. 2000. Involvement of the TIP60 Histone Acetylase Complex in DNA Repair and Apoptosis. *Cell* **102**(4): 463-473.
- Jack, A.P.M., Bussemer, S., Hahn, M., Pünzeler, S., Snyder, M., Wells, M., Csankovszki, G., Solovej, I., Schotta, G., and Hake, S.B. 2013. H3K56me3 Is a Novel, Conserved Heterochromatic Mark That Largely but Not Completely Overlaps with H3K9me3 in Both Regulation and Localization. *PLoS ONE* **8**(2): e51765.

- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., and Tjian, R. 2000. Structure and Function of a Human TAFII250 Double Bromodomain Module. *Science* **288**(5470): 1422-1425.
- James, T.C. and Elgin, S.C. 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Molecular and Cellular Biology* **6**(11): 3862-3872.
- Jasinska, A. and Krzyzosiak, W.J. 2004. Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *FEBS Letters* **567**(1): 136-141.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. 2001. Translating the Histone Code. *Science* **293**(5532): 1074-1080.
- Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., and Chinnadurai, G. 1996. Identification of a Cellular Protein That Specifically Interacts with the Essential Cysteine Region of the HIV-1 Tat Transactivator. *Virology* **216**(2): 357-366.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K. 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes & Development* **19**(4): 489-501.
- Kanno, T., Kanno, Y., Siegel, R.M., Jang, M.K., Lenardo, M.J., and Ozato, K. 2004. Selective Recognition of Acetylated Histones by Bromodomain Proteins Visualized in Living Cells. *Molecular Cell* **13**(1): 33-43.
- Kim, C.-H., Kim, J.-W., Jang, S.-M., An, J.-H., Seo, S.-B., and Choi, K.-H. 2015. The chromodomain-containing histone acetyltransferase TIP60 acts as a code reader, recognizing the epigenetic codes for initiating transcription. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **79**(4): 532-538.
- Kim, J.-W., Jang, S.-M., Kim, C.-H., An, J.-H., Kang, E.-J., and Choi, K.-H. 2011. Tip60 regulates myoblast differentiation by enhancing the transcriptional activity of MyoD via their physical interactions. *FEBS Journal* **278**(22): 4394-4404.
- Kimura, A. and Horikoshi, M. 1998. Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes to Cells* **3**(12): 789-800.
- Kines, K.J. and Belancio, V.P. 2012. Expressing genes do not forget their LINEs: transposable elements and gene expression. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **17**: 1329-1344.
- Kinoshita, A., Whelan, C.M., Berezovska, O., and Hyman, B.T. 2002. The Gamma-Secretase-generated Carboxyl-terminal Domain of the Amyloid Precursor Protein Induces Apoptosis via Tip60 in H4 Cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**(32): 28530-28536.
- Kishi, Y., Kondo, S., and Gotoh, Y. 2012. Transcriptional Activation of Mouse Major Satellite Regions during Neuronal Differentiation. *Cell Structure and Function* **37**(2): 101-110.
- Klose, R.J. and Bird, A.P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* **31**(2): 89-97.
- Koch, B., Kueng, S., Ruckenbauer, C., Wendt, K., and Peters, J.-M. 2008. The Suv39h/HP1 histone methylation pathway is dispensable for enrichment and protection of cohesin at centromeres in mammalian cells. *Chromosoma* **117**(2): 199-210.
- Koito, A. and Ikeda, T. 2013. Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Kuo, M.-H. and Allis, C.D. 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* **20**(8): 615-626.
- Ladurner, A.G., Inouye, C., Jain, R., and Tjian, R. 2003. Bromodomains Mediate an Acetyl-Histone Encoded Antisilencing Function at Heterochromatin Boundaries. *Molecular Cell* **11**(2): 365-376.
- Lee, H.-J., Chun, M., and Kandror, K.V. 2001. Tip60 and HDAC7 Interact with the Endothelin Receptor A and May Be Involved in Downstream Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **276**(20): 16597-16600.
- Leonhardt, H. and Hake, S.B. 2014. Histone glutamine methylation affecting rDNA transcription. *Cell Research* **24**(3): 261-262.
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**(6): 915-926.

- Lin, Y.-J., Umehara, T., Inoue, M., Saito, K., Kigawa, T., Jang, M.-K., Ozato, K., Yokoyama, S., Padmanabhan, B., and Güntert, P. 2008. Solution structure of the extraterminal domain of the bromodomain-containing protein BRD4. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **17**(12): 2174-2179.
- Litt M, Q.Y., Huang S. 2009. Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Bioscience reports* **29**(2): 131-141.
- Lorbeck, M., Pirooznia, K., Sarthi, J., Zhu, X., and Elefant, F. 2011. Microarray Analysis Uncovers a Role for Tip60 in Nervous System Function and General Metabolism. *PLoS ONE* **6**(4): e18412.
- Lough, J.W. 2002. Transient expression of TIP60 protein during early chick heart development. *Developmental Dynamics* **223**(3): 419-425.
- Lu, J. and Gilbert, D.M. 2007. Proliferation-dependent and cell cycle-regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. *The Journal of Cell Biology* **179**(3): 411-421.
- Lu, L.-Y., Wu, J., Ye, L., Gavrilina, G.B., Saunders, T.L., and Yu, X. 2010. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Developmental cell* **18**(3): 371-384.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**(6648): 251-260.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H.F.M., Quivy, J.-P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., and Almouzni, G. 2002. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* **30**(3): 329-334.
- Maison, C., Bailly, D., Roche, D., de Oca, R.M., Probst, A.V., Vassias, I., Dingli, F., Lombard, B., Loew, D., Quivy, J.-P., and Almouzni, G. 2011. SUMOylation promotes de novo targeting of HP1[alpha] to pericentric heterochromatin. *Nat Genet* **43**(3): 220-227.
- Marston, A.L. 2015. Shugoshins: Tension-Sensitive Pericentromeric Adaptors Safeguarding Chromosome Segregation. *Molecular and Cellular Biology* **35**(4): 634-648.
- Mattera, L., Escaffit, F., Pillaire, M.J., Selves, J., Tyteca, S., Hoffmann, J.S., Gourraud, P.A., Chevillard-Briet, M., Cazaux, C., and Trouche, D. 2009. The p400/Tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene* **28**(12): 1506-1517.
- Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. 2003. Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell* **112**(5): 725-736.
- Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A.-L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., Krijgsveld, J., Khochbin, S., Muller, C.W., and Petosa, C. 2009. Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**(7264): 664-668.
- Mosch, B., Morawski, M., Mittag, A., Lenz, D., Tarnok, A., and Arendt, T. 2007. Aneuploidy and DNA Replication in the Normal Human Brain and Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* **27**(26): 6859-6867.
- Muchardt, C., Guilleme, M., Seeler, J.S., Trouche, D., Dejean, A., and Yaniv, M. 2002. *Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1±.*
- Murphy, T.D. and Karpen, G.H. 1998. Centromeres Take Flight: Alpha Satellite and the Quest for the Human Centromere. *Cell* **93**(3): 317-320.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell* **2**(4): 279-289.
- Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A.G., Murzina, N.V., and Laue, E.D. 2002. Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* **416**(6876): 103-107.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P., and Reinberg, D. 2002. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & Development* **16**(4): 479-489.

- O'Carroll, D.n., Scherthan, H., Peters, A.H.F.M., Opravil, S., Haynes, A.R., Laible, G.t., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A., Jerratsch, M., Sattler, L., Mattei, M.G., Denny, P., Brown, S.D.M., Schweizer, D., and Jenuwein, T. 2000. Isolation and Characterization of Suv39h2, a Second Histone H3 Methyltransferase Gene That Displays Testis-Specific Expression. *Molecular and Cellular Biology* **20**(24): 9423-9433.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. 1999. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* **99**(3): 247-257.
- Oliva, R., Bazett-Jones, D., Mezquita, C., and Dixon, G.H. 1987. Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *Journal of Biological Chemistry* **262**(35): 17016-17025.
- Papait, R., Pistore, C., Negri, D., Pecoraro, D., Cantarini, L., and Bonapace, I.M. 2007. Np95 Is Implicated in Pericentromeric Heterochromatin Replication and in Major Satellite Silencing. *Molecular Biology of the Cell* **18**(3): 1098-1106.
- Paradowska, A.S., Miller, D., Spiess, A.-N., Vieweg, M., Cerna, M., Dvorakova-Hortova, K., Bartkuhn, M., Schuppe, H.-C., Weidner, W., and Steger, K. 2012. Genome wide identification of promoter binding sites for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. *Epigenetics* **7**(9): 1057-1070.
- Park, J.H., Sun, X.-J., and Roeder, R.G. 2009. The SANT Domain of p400 ATPase Represses Acetyltransferase Activity and Coactivator Function of TIP60 in Basal p21 Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* **30**(11): 2750-2761.
- Park, S.H., Yu, S.E., Chai, Y.G., and Jang, Y.K. 2014. CDK2-dependent phosphorylation of Suv39H1 is involved in control of heterochromatin replication during cell cycle progression. *Nucleic Acids Research* **42**(10): 6196-6207.
- Parthun, M.R. 2011. Histone Acetyltransferase 1: More than Just an Enzyme? *Biochimica et Biophysica Acta* **1819**(3-4): 256-263.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., Cota, P., Wittnam, J.L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., Salinas-Riester, G., Dettenhofer, M., Kang, H., Farinelli, L., Chen, W., and Fischer, A. 2010. Altered Histone Acetylation Is Associated with Age-Dependent Memory Impairment in Mice. *Science* **328**(5979): 753-756.
- Peters, A.H.F.M., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A.H.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H.A., and Jenuwein, T. 2003. Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Molecular Cell* **12**(6): 1577-1589.
- Peters, A.H.F.M., Mermoud, J.E., O'Carroll, D., Pagani, M., Schweizer, D., Brockdorff, N., and Jenuwein, T. 2002. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet* **30**(1): 77-80.
- Peters, A.H.F.M., O'Carroll, D.n., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schäffer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle, M., Sibilia, M., and Jenuwein, T. 2001. Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability. *Cell* **107**(3): 323-337.
- Pinheiro, I.s., Margueron, R.I., Shukeir, N., Eisold, M., Fritzsche, C., Richter, Florian M., Mittler, G., Genoud, C., Goyama, S., Kurokawa, M., Son, J., Reinberg, D., Lachner, M., and Jenuwein, T. 2012. Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 Methyltransferases Required for Mammalian Heterochromatin Integrity. *Cell* **150**(5): 948-960.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C.c., Govin, J.r.m., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. 2003. Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein. *Molecular and Cellular Biology* **23**(15): 5354-5365.
- Probst, A.V., Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., and Almouzni, G.v. 2010. A Strand-Specific Burst in Transcription of Pericentric Satellites Is Required for Chromocenter Formation and Early Mouse Development. *Developmental Cell* **19**(4): 625-638.

- Puschendorf, M., Terranova, R., Boutsma, E., Mao, X., Isono, K.-i., Brykczynska, U., Kolb, C., Otte, A.P., Koseki, H., Orkin, S.H., van Lohuizen, M., and Peters, A.H.F.M. 2008. PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat Genet* **40**(4): 411-420.
- Qi, D., Jin, H., Lilja, T., and Mannervik, M. 2006. Drosophila Reptin and Other TIP60 Complex Components Promote Generation of Silent Chromatin. *Genetics* **174**(1): 241-251.
- Qian, M.-X., Pang, Y., Liu, C.H., Haratake, K., Du, B.-Y., Ji, D.-Y., Wang, G.-F., Zhu, Q.-Q., Song, W., Yu, Y., Zhang, X.-X., Huang, H.-T., Miao, S., Chen, L.-B., Zhang, Z.-H., Liang, Y.-N., Liu, S., Cha, H., Yang, D., Zhai, Y., Komatsu, T., Tsuruta, F., Li, H., Cao, C., Li, W., Li, G.-H., Cheng, Y., Chiba, T., Wang, L., Goldberg, A.L., Shen, Y., and Qiu, X.-B. 2013. Acetylation-Mediated Proteasomal Degradation of Core Histones during DNA Repair and Spermatogenesis. *Cell* **153**(5): 1012-1024.
- Quivy, J.-P., Gerard, A., Cook, A.J.L., Roche, D., and Almouzni, G. 2008. The HP1-p150/CAF-1 interaction is required for pericentric heterochromatin replication and S-phase progression in mouse cells. *Nat Struct Mol Biol* **15**(9): 972-979.
- Rangasamy, D., Greaves, I., and Tremethick, D.J. 2004. RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* **11**(7): 650-655.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.-W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., and Jenuwein, T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**(6796): 593-599.
- Rousseaux, S. and Khochbin, S. 2015. Histone Acylation beyond Acetylation: Terra Incognita in Chromatin Biology. *Cell Journal (Yakhteh)* **17**(1): 1-6.
- Ruginis, T., Taglia, L., Matusiak, D., Lee, B.-S., and Benya, R.V. 2006. Consequence of Gastrin-Releasing Peptide Receptor Activation in a Human Colon Cancer Cell Line: A Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research* **5**(6): 1460-1468.
- Saksouk, N., Barth, Teresa K., Ziegler-Birling, C., Olova, N., Nowak, A., Rey, E., Mateos-Langerak, J., Urbach, S., Reik, W., Torres-Padilla, M.-E., Imhof, A., and Déjardin, J.r. 2014. Redundant Mechanisms to Form Silent Chromatin at Pericentromeric Regions Rely on BEND3 and DNA Methylation. *Molecular Cell* **56**(4): 580-594.
- Saksouk, N., Simboeck, E., and Déjardin, J. 2015. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics & Chromatin* **8**: 3.
- Sakuraba, K., Yasuda, T., Sakata, M., Kitamura, Y.-H., Shirahata, A., Goto, T., Mizukami, H., Saito, M., Ishibashi, K., Kigawa, G., Nemoto, H., Sanada, Y., and Hibi, K. 2009. Down-regulation of Tip60 Gene as a Potential Marker for the Malignancy of Colorectal Cancer. *Anticancer Research* **29**(10): 3953-3955.
- Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A.J., and Torres-Padilla, M.-E. 2010. Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nature cell biology* **12**(9): 853-862.
- Sapountzi, V., Logan, I.R., and Robson, C.N. 2006. Cellular functions of TIP60. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**(9): 1496-1509.
- Schirling, C., Heseding, C., Heise, F., Kesper, D., Klebes, A., Klein-Hitpass, L., Vortkamp, A., Hoffmann, D., Saumweber, H., and Ehrenhofer-Murray, A. 2010. Widespread regulation of gene expression in the Drosophila genome by the histone acetyltransferase dTip60. *Chromosoma* **119**(1): 99-113.
- Schmauss, C., Lee-McDermott, Z., and Medina, L.R. 2014. Trans-generational Effects of Early Life Stress: The Role of Maternal Behavior. *Scientific Reports* **4**: 4873.
- Schramke, V. and Allshire, R. 2004. Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**(2): 174-180.
- Sciamanna, I., Vitullo, P., Curatolo, A., and Spadafora, C. 2011. A Reverse Transcriptase-Dependent Mechanism Is Essential for Murine Preimplantation Development. *Genes* **2**(2): 360-373.
- Serrano, A., Rodriguez-Corsino, M., and Losada, A. 2009. Heterochromatin Protein 1 (HP1) Proteins Do Not Drive Pericentromeric Cohesin Enrichment in Human Cells. *PLoS ONE* **4**(4): e5118.

- Shang, E., Nickerson, H.D., Wen, D., Wang, X., and Wolgemuth, D.J. 2007. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* **134**(19): 3507-3515.
- Shang, E., Salazar, G., Crowley, T.E., Wang, X., Lopez, R.A., Wang, X., and Wolgemuth, D.J. 2004. Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis. *Gene Expression Patterns* **4**(5): 513-519.
- Shang, E., Wang, X., Wen, D., Greenberg, D.A., and Wolgemuth, D.J. 2009. The Double Bromodomain-containing Gene Brd2 Is Essential for Embryonic Development in Mouse. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **238**(4): 908-917.
- Shestakova, E.A., Mansuroglu, Z., Mokrani, H., Ghinea, N., and Bonnefoy, E. 2004. Transcription factor YY1 associates with pericentromeric gamma-satellite DNA in cycling but not in quiescent (G0) cells. *Nucleic Acids Research* **32**(14): 4390-4399.
- Shi, J., Wang, Y., Zeng, L., Wu, Y., Deng, J., Zhang, Q., Lin, Y., Li, J., Kang, T., Tao, M., Rusinova, E., Zhang, G., Wang, C., Zhu, H., Yao, J., Zeng, Y.-X., Evers, B.M., Zhou, M.-M., and Zhou, B.P. 2014. Disrupting the Interaction of BRD4 with Di-acetylated Twist Suppresses Tumorigenesis in Basal-like Breast Cancer. *Cancer Cell* **25**(2): 210-225.
- Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M., Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T., and Ishizaka, Y. 2011. Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation. *The Journal of Cell Biology* **194**(5): 721-735.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. 2006. Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. *Science* **311**(5762): 844-847.
- Slee, R.B., Steiner, C.M., Herbert, B.S., Vance, G.H., Hickey, R.J., Schwarz, T., Christan, S., Radovich, M., Schneider, B.P., Schindelbauer, D., and Grimes, B.R. 2012. Cancer-associated alteration of pericentromeric heterochromatin may contribute to chromosome instability. *Oncogene* **31**(27): 3244-3253.
- Smith, C.D., Shu, S., Mungall, C.J., and Karpen, G.H. 2007. The Release 5.1 Annotation of *Drosophila melanogaster* Heterochromatin. *Science* **316**(5831): 1586-1591.
- Sun, Y., Jiang, X., and Price, B.D. 2010. Tip60: Connecting chromatin to DNA damage signaling. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **9**(5): 930-936.
- Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrappetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstone, J.R., and Price, B.D. 2009. Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the Tip60 tumor suppressor. *Nature cell biology* **11**(11): 1376-1382.
- Suzuki, T., Fujii, M., and Ayusawa, D. 2002. Demethylation of classical satellite 2 and 3 DNA with chromosomal instability in senescent human fibroblasts. *Experimental Gerontology* **37**(89): 1005-1014.
- Swanson, E.C., Manning, B., Zhang, H., and Lawrence, J.B. 2013. Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *The Journal of Cell Biology* **203**(6): 929-942.
- Taddei, A., Maison, C., Roche, D., and Almouzni, G. 2001. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* **3**(2): 114-120.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B., and Zhao, Y. 2011. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**(6): 1016-1028.
- Terranova, R.m., Sauer, S., Merckenschlager, M., and Fisher, A.G. 2005. The reorganisation of constitutive heterochromatin in differentiating muscle requires HDAC activity. *Experimental Cell Research* **310**(2): 344-356.

- Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., and Kouzarides, T. 2014. Glutamine methylation in Histone H2A is an RNA Polymerase I dedicated modification. *Nature* **505**(7484): 564-568.
- Thomas, T. and Voss, A.K. 2007. The Diverse Biological Roles of MYST Histone Acetyltransferase Family Proteins. *Cell Cycle* **6**(6): 696-704.
- Ting, D.T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B.W., Akhavanfard, S., Coffman, E.J., Contino, G., Deshpande, V., Iafrate, A.J., Letovsky, S., Rivera, M.N., Bardeesy, N., Maheswaran, S., and Haber, D.A. 2011. Aberrant Overexpression of Satellite Repeats in Pancreatic and Other Epithelial Cancers. *Science (New York, NY)* **331**(6017): 593-596.
- Trojer, P. and Reinberg, D. 2007. Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Molecular Cell* **28**(1): 1-13.
- Tropberger, P. and Schneider, R. 2013. Scratching the (lateral) surface of chromatin regulation by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **20**(6): 657-661.
- Turner, B.M., Birley, A.J., and Lavender, J. 1992. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* **69**(2): 375-384.
- Tyteca, S., Legube, G.I., and Trouche, D. 2006a. To Die or Not to Die: A HAT Trick. *Molecular Cell* **24**(6): 807-808.
- Tyteca, S., Vandromme, M., Legube, G., Chevillard-Briet, M., and Trouche, D. 2006b. Tip60 and p400 are both required for UV-induced apoptosis but play antagonistic roles in cell cycle progression. *EMBO J* **25**: 1680-1689.
- Umehara, T., Nakamura, Y., Jang, M.K., Nakano, K., Tanaka, A., Ozato, K., Padmanabhan, B., and Yokoyama, S. 2009. Structural Basis for Acetylated Histone H4 Recognition by the Human BRD2 Bromodomain. *The Journal of Biological Chemistry* **285**(10): 7610-7618.
- Umehara, T., Nakamura, Y., Wakamori, M., Ozato, K., Yokoyama, S., and Padmanabhan, B. 2010. Structural implications for K5/K12-di-acetylated histone H4 recognition by the second bromodomain of BRD2. *FEBS Letters* **584**(18): 3901-3908.
- Upton, Kyle R., Gerhardt, Daniel J., Jesuadian, J S., Richardson, Sandra R., Sanchez-Luque, Francisco J., Bodea, Gabriela O., Ewing, Adam D., Salvador-Palomeque, C., van der Knaap, Marjo S., Brennan, Paul M., Vanderver, A., and Faulkner, Geoffrey J. 2015. Ubiquitous L1 Mosaicism in Hippocampal Neurons. *Cell* **161**(2): 228-239.
- Valgardsdottir, R., Chiodi, I., Giordano, M., Rossi, A., Bazzini, S., Ghigna, C., Riva, S., and Biamonti, G. 2008. Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells. *Nucleic Acids Research* **36**(2): 423-434.
- van den Berg, I.M., Eleveld, C., van der Hoeven, M., Birnie, E., Steegers, E.A.P., Galjaard, R.J., Laven, J.S.E., and van Doorninck, J.H. 2011. Defective deacetylation of histone 4 K12 in human oocytes is associated with advanced maternal age and chromosome misalignment. *Human Reproduction* **26**(5): 1181-1190.
- van der Heijden, G.W., Derijck, A.A.H.A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J., and de Boer, P. 2006. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental Biology* **298**(2): 458-469.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S., and Trouche, D. 2001. Transcriptional Repression by the Retinoblastoma Protein through the Recruitment of a Histone Methyltransferase. *Molecular and Cellular Biology* **21**(19): 6484-6494.
- Verreault, A. 2003. Hétérochromatine : un silence bien bruyant. *Med Sci (Paris)* **19**(12): 1181-1182.
- Verrier, L., Vandromme, M., and Trouche, D. 2011. Histone demethylases in chromatin cross-talks. *Biology of the Cell* **103**(8): 381-401.
- Völkel, P. and Angrand, P.-O. 2007. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **89**(1): 1-20.
- Volpe, T., Schramke, V., Hamilton, G., White, S., Teng, G., Martienssen, R., and Allshire, R. 2003. RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Research* **11**(2): 137-146.

- Wang, C.-Y. and Filippakopoulos, P. 2015. Beating the odds: BETs in disease. *Trends in Biochemical Sciences* **40**(8): 468-479.
- Wang, J., Lawry, S., Cohen, A., and Jia, S. 2014. Chromosome boundary elements and regulation of heterochromatin spreading. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**(24): 4841-4852.
- Wang, L., Xie, L., Ramachandran, S., Lee, Y., Yan, Z., Zhou, L., Krajewski, K., Liu, F., Zhu, C., Chen, David J., Strahl, Brian D., Jin, J., Dokholyan, Nikolay V., and Chen, X. 2015. Non-canonical Bromodomain within DNA-PKcs Promotes DNA Damage Response and Radioresistance through Recognizing an IR-Induced Acetyl-Lysine on H2AX. *Chemistry & Biology* **22**(7): 849-861.
- Wang, R., Li, Q., Helfer, C.M., Jiao, J., and You, J. 2012. Bromodomain Protein Brd4 Associated with Acetylated Chromatin Is Important for Maintenance of Higher-order Chromatin Structure. *The Journal of Biological Chemistry* **287**(14): 10738-10752.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D.E., Barski, A., Peng, W., and Zhao, K. 2009. Genome-wide Mapping of HATs and HDACs Reveals Distinct Functions in Active and Inactive Genes. *Cell* **138**(5): 1019-1031.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Peng, W., Zhang, M.Q., and Zhao, K. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature genetics* **40**(7): 897-903.
- Weidtkamp-Peters, S., Rahn, H.-P., Cardoso, M.C., and Hemmerich, P. 2006. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts takes place in early, middle, and late S phase. *Histochemistry and Cell Biology* **125**(1-2): 91-102.
- Wijchers, P.J., Geeven, G., Eyres, M., Bergsma, A.J., Janssen, M., Versteegen, M., Zhu, Y., Schell, Y., Vermeulen, C., de Wit, E., and de Laat, W. 2015. Characterization and dynamics of pericentromere-associated domains in mice. *Genome Research*.
- Xhemalce, B. and Kouzarides, T. 2009. A chromodomain switch mediated by histone H3 Lys 4 acetylation regulates heterochromatin assembly. *Genes & Development* **24**(7): 647-652.
- Xiao, H., Chung, J., Kao, H.-Y., and Yang, Y.-C. 2003. Tip60 Is a Co-repressor for STAT3. *Journal of Biological Chemistry* **278**(13): 11197-11204.
- Xiao, Y., Nagai, Y., Deng, G., Ohtani, T., Zhu, Z., Zhou, Z., Zhang, H., Ji, M.Q., Hancock, W.W., Samanta, A., Lough, J.W., and Greene, M.I. 2014. Dynamic Interactions Between TIP60 and p300 Regulate FOXP3 Function Through a Structural Switch Defined by a Single Lysine on TIP60. *Cell reports* **7**(5): 1471-1480.
- Yang, N. and Kazazian, H.H. 2006. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat Struct Mol Biol* **13**(9): 763-771.
- Ye, J., Ai, X., Eugeni, E.E., Zhang, L., Carpenter, L.R., Jelinek, M.A., Freitas, M.A., and Parthun, M.R. 2005. Histone H4 Lysine 91 Acetylation: Short Article A Core Domain Modification Associated with Chromatin Assembly. *Molecular Cell* **18**(1): 123-130.
- Zeng, L., Zhang, Q., Li, S., Plotnikov, A.N., Walsh, M.J., and Zhou, M.-M. 2010. Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature* **466**(7303): 258-262.
- Zheng, H., Seit-Nebi, A., Han, X., Aslanian, A., Tat, J., Liao, R., Yates, J.R., and Sun, P. 2013. A Posttranslational Modification Cascade Involving p38, Tip60 and PRAK Mediates Oncogene-Induced Senescence. *Molecular Cell* **50**(5): 699-710.
- Zhou, B.O., Wang, S.-S., Zhang, Y., Fu, X.-H., Dang, W., Lenzmeier, B.A., and Zhou, J.-Q. 2011. Histone H4 Lysine 12 Acetylation Regulates Telomeric Heterochromatin Plasticity in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics* **7**(1): e1001272.
- Zhu, X., Singh, N., Donnelly, C., Boimel, P., and Elefant, F. 2007. The Cloning and Characterization of the Histone Acetyltransferase Human Homolog Dmel\TIP60 in *Drosophila melanogaster*: Dmel\TIP60 Is Essential for Multicellular Development. *Genetics* **175**(3): 1229-1240.
- Zofall, M. and Grewal, S.I.S. 2006. Swi6/HP1 Recruits a JmjC Domain Protein to Facilitate Transcription of Heterochromatic Repeats. *Molecular Cell* **22**(5): 681-692.

MATÉRIELS ET MÉTHODES COMPLÉMENTAIRE

- Culture cellulaire, transfection :

Les MEFs dérivées de souris SUV39H ½ -/- sont cultivées en milieu DMEM avec glutamine, entre 10 et 20% de serum plus antibiotiques. Lors de la culture, ces cellules ont tendance à arrêter de proliférer et adopter une morphologie particulière, qui pourrait correspondre à de la sénescence. Leur incubation dans un milieu contrôlé en oxygène s'est révélée bénéfique, je les ai donc mises en incubateur hypoxie lors de certaines expériences, par exemple lors de la sélection puromycine (2ug/ml) qui a permis l'obtention des lignées complémentées avec le vecteur vide ou SUV39H. Les autres lignées sont cultivées en milieu DMEM avec Glutamax, 10 % sérum et antibiotiques. Les électroporations sont réalisées avec une machine Amaxa. Les lignées humaines sont électroporées avec du tampon V (Lonza), programme X001. Les lignées de souris sont électroporées avec du tampon Mirus (seule l'électroporation de plasmides dans les SUV39h ½ -/- est réalisée avec un tampon Mefs2 (Lonza)) avec le programme d'électroporation U030. Pour les expériences de tests luciférase, les cellules ont été transfectées à l'aide de DharmaFECT (Dharmacon).

- Extraction d'ARN :

Les extractions d'ARNm sont réalisées avec des colonnes Qiagen, selon le protocole du fournisseur, avec un traitement de 15 minutes avec de la DNase Promega directement incubée sur la colonne entre les deux premiers lavages. En raison du bruit de fond dû à la nature répétée des séquences satellites, leur extraction est réalisée au Trizol (Sigma). Le Trizol est ajouté sur les boîtes de culture préalablement lavées au PBS, à raison de 3ml de Trizol pour un diamètre 100. Après grattage à la spatule, le Trizol est récupéré dans un tube Falcon de 15ml, vortexé 15s puis laissé quelques minutes à température ambiante, avant d'y ajouter du chloroforme à raison de 200µl/ml de Trizol. Après 15min de centrifugation à 4°C, la moitié de la phase supérieure est délicatement récupérée à la P200, à raison de 600 µl/ tube Eppendorf 1,5 ml. L'ARN est ensuite précipité en ajoutant de 600µl d'isopropanol par tube, mélangé puis laissé 10min à température ambiante avant d'être centrifugé 10min à 4°C à vitesse maximale. Les culots sont ensuite rassemblés entre eux si besoin, et lavés deux fois à l'EtOH 70%, puis repris dans 140µl d'H₂O. A ensuite lieu un traitement d'1H30 avec un mélange de DNase I et de DNase Z (Epicentre), par ajout de 20µl de chaque buffer 10X et 10µl de chaque enzyme. Puis les DNases sont inactivées (10 minutes à 65°C avec ajout d'un tampon stop DNase de chez Epicentre). Elles sont ensuite dégradées par ajout de 200µl/tube d'un tampon de lyse (Epicentre), puis après vortex pendant 5, ajout de 200µl d'un tampon de précipitation protéique (Epicentre), puis vortex 10s et incubation 5min sur la glace. Par deux fois, le surnageant est récupéré après 10 minutes de centrifugation à 4°C à vitesse maximale. Puis l'ARN est à nouveau précipité par ajout d'isopropanol et 2 lavages à l'EtOH 70% comme précédemment. Les ARNs sont repris dans de l'H₂O et conservés à -20°C avec de l'inhibiteur de RNase (Promega).

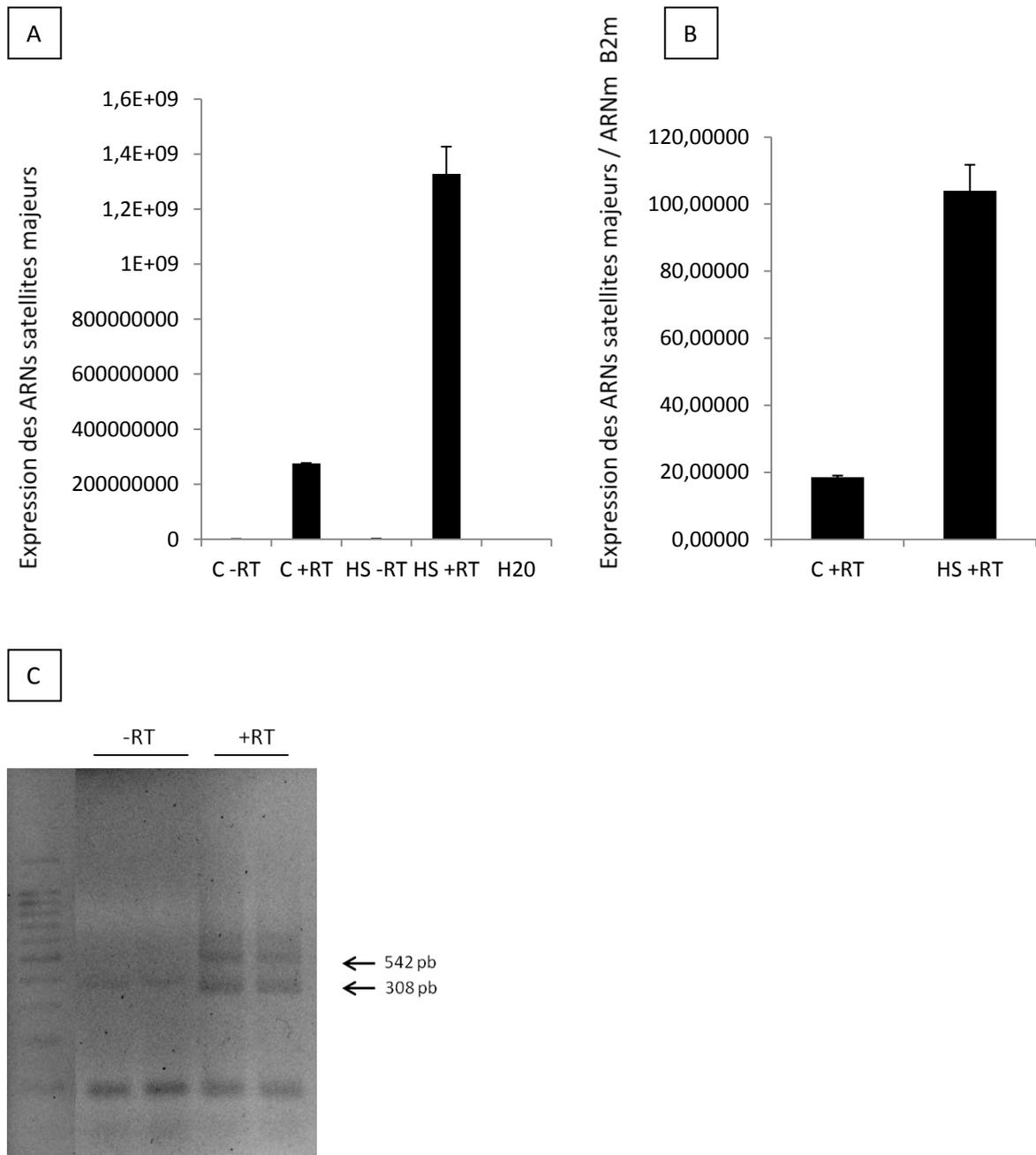


Figure 48 : Amplification des ARNs satellites majeurs dans les NIH3T3. Un Choc thermique (HS : Heat shock) entraîne une surexpression des séquences satellites. Les cellules sont incubées 1H à 42°C puis à nouveau 2H à 37°C. C : Contrôle. L'expression des ARNs satellites est normalisée (B) ou non (A) par l'ARNm B2m. H2O : Point de QPCR où l'échantillon est remplacé par de l'eau. Expérience représentative. Les écarts-types représentent les triplicats de QPCR. C) Des produits d'amplification de QPCR –RT ou +RT réalisée avec des primers de séquences satellites majeurs sont déposés en duplicats sur un gel d'Agarose 1% révélé au Bromure d'Ethidium.

- Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel :

Les ARNs sont ensuite dosés au Nanodrop, et une quantité identique (entre 100ng et 1ug) est prise dans chacun des points pour effectuer la réverse transcription. La quantité d'ARN désirée est ainsi ramenée à un volume de 10µl par ajout d'H₂O (Promega), puis incubée pendant 5 minutes à 65°C avec un mélange contenant des dNTPs (1mM) et des hexamères aléatoires (40ng/µl, Promega). L'échantillon est ensuite incubé avec 4µl de tampon AMV Buffer (Promega), 1µl d'inhibiteurs de RNase (Promega), 2µl de DTT (0,01M), et 0,5µl de réverse-transcriptase AMV (Promega), pendant 50 minutes à 42°C, puis 15 minutes à 70°C. Les points où la réverse-transcriptase est remplacée par de l'H₂O (-RT) sont toujours réalisés et contrôlés en QPCR lors de l'analyse des séquences satellites. Comme la détection de ces séquences est délicate, j'ai validé ce protocole d'extraction en soumettant des NIH3T3 à un choc thermique. Ainsi je détecte une augmentation importante de la transcription, de manière similaire à ce qui est publiée dans des lignées humaines (Fig 48A) (Eymery et al. 2010). De même le dépôt d'un produit de QPCR sur gel m'a permis de valider la taille des produits amplifiés, et la différence entre le point -RT et +RT (Fig 48B). Les PQCRs sont réalisées avec du mix IQ de chez Biorad, dans un volume de 12,5µl par puit contenant 4ul d'échantillon dilué au dixième, 6,25µl de mix, 0,1µl de primer (100uM) (0,05µl pour les primers des séquences satellites), qsp avec de l'H₂O. Chaque point est réalisé en triplicats.

- Immunoprécipitation de chromatine :

Les cellules sont fixées avec 1% de formaldéhyde pendant 15 minutes. Les cellules SUV39H ½ -/- étant peu adhérentes, elles sont fixées en liquide par ajout du formaldéhyde directement dans le milieu de culture dans lesquelles ont été reprises les cellules après trypsinisation et rinçage. Les NIH3T3 et U2OS peuvent être fixées de manière indifférente en solide (par ajout de formaldéhyde dans les boîtes préalablement rincées, puis récupérées par grattage) ou en liquide. De la glycine 0.125M est ajoutée pendant 5 minutes pour titrer le formaldéhyde. Les cellules sont reprises dans un tampon de lyse cellulaire (Fig 49), puis après 10 minutes d'incubation sur glace, lysées mécaniquement à l'aide d'un homogénéiseur (20 coups). Après centrifugation, les noyaux sont repris dans un tampon de lyse nucléaire 10% SDS (Fig 49), incubés 10 minutes sur glace et sonicés avec une sonde manuelle. La chromatine est ensuite dosée afin d'en ajuster la quantité entre les points, puis diluée au dixième dans un tampon de dilution (Fig 49). Le préclearing est effectué entre 30 minutes et une heure avec des billes de streptavidine (préalablement saturées avec de la BSA et de l'ADN de sperme de hareng). Les anticorps sont incubés sur la nuit à 4°C avec agitation, dans le plus petit volume possible. L'immunoprécipitation se fait ensuite par ajout de billes A/G (préalablement saturées avec de la BSA

Tampon	Composition
Lyse cellulaire	Pipes 5mM pH8, KCL 85mM, NP-40 0,5%, et inhibiteur de protéases (Complete-mini EDTA-free, Roche)
Lyse nucléaire	Tris 50mM pH8,1, EDTA 10mM, SDS 1%, inhibiteurs de protéases (Complete-mini EDTA-free, Roche)
Immunoprécipitation (IP)	1 volume de tampon de lyse nucléaire/ 9 volumes de tampon de dilution
Dilution	SDS 0,01%, Triton X100 1,1%, EDTA 1,2mM, Tris 16,7 mM pH8,1, NaCL 167mM, inhibiteurs de protéases (Complete-mini EDTA-free, Roche)
Dialyse	EDTA 2mM, Tris 50mM pH8,1, Sarkosyl 0,2%
Lavage	Tris 0,1M pH8,8, LiCL 0,5M, NP-40 1%, NaDoc 1%
Elution	Tris pH8,1 10mM, EDTA 1mM

Figure 49 : Composition des tampons de ChIP.

et de l'ADN de sperme de hareng). Une étape de centrifugation en tubes eppendorf 1,5ml pendant 20 min à vitesse maxi avant l'ajout de ces billes diminue sensiblement le bruit de fond. C'est à cause de cette étape supplémentaire que je me suis mise à utiliser pour le préclearing des billes de streptavidine, pour ne pas perdre de signal à cette centrifugation en cas de reste de billes de préclearing. L'incubation avec les billes de protéines A/G pour l'immunoprécipitation a lieu pendant 1H à 4°C dans le plus grand volume possible. Puis les billes sont reprises dans le tampon de dialyse (Fig 49), avant d'être lavées 5 fois dans le tampon de lavage et deux fois dans du tampon d'élution (Fig 49), puis reprises dans 200µl de ce dernier. Après 30 minutes d'incubation avec de la RNaseA, la réversion du cross-link a lieu sur la nuit par ajout de SDS et agitation à 70°C. Après traitement à la protéinase K pendant 1H30, l'ADN est purifié sur colonnes GE Healthcare selon le protocole du fournisseur. Uniquement dans le cas de l'hybridation sur puce, l'ADN a été purifié par extraction phénol-chloroforme, avant d'être amplifié à l'aide d'un kit spécifique.

- Immunofluorescence, analyse en cytométrie, analyse du DAPI CV : voir publication
- Primers, siRNA et anticorps : voir publication et partie résultat
- siRNAs et oligonucléotides des résultats supplémentaires :

Souris :

siRNA BRD4 : GGAUGAAGAUGCGCUGGAA-dTdT

siRNA P400 : GAGUCUCUUAAGAUGUUC-dTdT

Oligos QPCR P400 : sens 5'-GAAGTTGGCTGCTGCTAAGA-3', antisens 5'-CCTCTTCTGGAACTTTCTG-3'

Oligos QPCR FAM171a1 : sens 5'-CACAAATGCCTATGTCGCAGC-3', antisens 5'-

GAGAGCTTCAGCATGGGTGT-3'

Oligos QPCR Nmt2 : sens 5'-TTTTGGGACACACAGCCAGT-3', antisens 5'-ATCGGTGCCAATACCTGCAA-3'

Humain :

siRNA contrôle : CAUGUCAUGUGUCACAUCU-dTdT

siRNA TIP60 : CGUCUGGAUGAAUGGGUGA-dTdT

In eukaryote cells, DNA is wrapped around histones proteins, organizing a nucleo-proteic structure called chromatin. Chromatin can compact or decompact itself in a very dynamic manner, depending on specific regions and processes. One example is that, to be transcribed, a gene needs chromatin to be in a decompacted state, whereas transcriptional repression will correlate with compacted chromatin. Among mechanisms implicated in this dynamics, histones acetylation is largely associated with chromatin decompaction. Thus, compacted chromatin, called heterochromatin, is generally considered as hardly dynamic with hypo-acetylated histones. However, studies in yeast suggest the involvement of histone acetylation in heterochromatin in order to allow its plasticity. Moreover, recent data in mouse directly involve histone acetylation in compaction processes *via* double bromodomain proteins (BET) recruitment, shedding a new light on the biological function of histones acetylation. Pericentromeres are heterochromatin regions whose correct compaction is critical to allow normal chromosome segregation during cell division. Here, we used SUV39H $\frac{1}{2}$ *-/-* mouse cells, in which the classical pericentromeric heterochromatin pathway is affected. Our results support a model in which the histone acetyl transferase TIP60 is recruited to pericentromeres in SUV39H $\frac{1}{2}$ *-/-* cells, allowing compaction by H4K12 acetylation and BET proteins recruitment, which constitute a new example of acetylation-mediated compaction *via* a BET protein in mammals. This back-up compaction pathway may be used by the cell in physiological or pathological contexts with defective pericentric heterochromatin, such as some types of cancers. Indeed, this is the first time that TIP60 is implicated in pericentromeres, an important structure for genetic stability, which makes sense with the known function of TIP60 as a tumor suppressor.

Au sein du noyau des cellules eucaryotes, la molécule d'ADN s'enroule autour de protéines histones, formant la chromatine. Ce mécanisme de compaction est dynamique selon les régions et les processus en cours, régulant l'accès à l'ADN. Pour exemple, la transcription d'un gène nécessite localement la décompaction de la chromatine, ce qui permet l'accès à la machinerie de transcription. Au contraire, La répression de ce gène sera corrélée à une forme compactée de cette portion de chromatine. Le phénomène d'acétylation des histones est associé à une décompaction. Les régions d'hétérochromatine (forme compactée considérée comme peu dynamique et peu transcrite) sont donc pauvres en acétylations d'histones. Pourtant des études chez la levure, suggèrent la présence de ces acétylations de manière fine dans l'hétérochromatine afin d'en permettre la plasticité. De récentes données chez la souris impliquent ces acétylations dans la compaction *via* le recrutement de protéines à doubles bromodomaine (BET). Notre vision de la fonction des acétylations d'histones est donc en train de changer. Les péricentromères sont des zones d'hétérochromatine dont la compaction correcte est nécessaire pour le bon déroulement de la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire. Ici nous travaillons sur des cellules de souris SUV39H $\frac{1}{2}$ $-/-$, où la voie classique de compaction des péricentromères est défectueuse. Nos données nous permettent de poser un modèle où l'acétyltransférase TIP60 est recrutée à l'hétérochromatine péricentromérique dans les cellules SUV39H $\frac{1}{2}$ $-/-$, où elle maintient la compaction en acétylant H4K12, permettant le recrutement d'une protéine à double bromodomaine. Ceci constitue un nouveau cas de compaction *via* une acétylation d'histone et une protéine BET chez les mammifères. Cette voie alternative de compaction pourrait être utilisée par les cellules lors de déstructurations de ces régions au cours de divers processus physiologiques, ou pathologiques, comme dans le cadre des cancers. En effet, c'est la première fois qu'un rôle de TIP60 est décrit aux péricentromères, région importante pour la stabilité génétique de la cellule, ce qui est cohérent avec la fonction connue de suppresseur de tumeur de TIP60.