

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Raphaël RICLET

**Identification et caractérisation des gènes cibles
du corépresseur TIF1 β : vers une meilleure compréhension
de son rôle en tant que régulateur épigénétique de
l'activité transcriptionnelle du génome murin**

Soutenue publiquement le 11 Septembre 2009

Membres du Jury :

Directeur de Thèse : Dr. Florence CAMMAS

Co-Directeur de Thèse : Dr. Régine LOSSON

Rapporteur Interne : Pr. Stéphane VIVILLE

Rapporteur Externe : Dr. Pierre-Antoine DEFOSSEZ

Rapporteur Externe : Dr. Christian MUCHARDT

Examinateur : Dr. Christèle MAISON

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury, le Dr Pierre-Antoine Defossez, le Dr Christian Muchardt, le Dr Christèle Maison et le Pr Stéphane Viville d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie le Professeur Chambon de m'avoir accueilli au sein de l'IGBMC, ainsi que pour l'intérêt porté à ce travail.

Je tiens à remercier plus particulièrement ma Directrice de thèse, le Dr Florence Cammas, pour son soutien, son enthousiasme, ses encouragements, sa grande disponibilité et la confiance qu'elle m'a portée tout au long de ma thèse. Je lui suis vraiment reconnaissant pour la formation qu'elle m'a donnée et le temps qu'elle a passé pour m'initier aux différentes techniques de la biologie moléculaire, avec toujours beaucoup de patience et d'humour.

J'exprime aussi ma reconnaissance à ma co-Directrice de thèse, le Dr Régine Losson, pour m'avoir intégré dans son équipe dès la sortie de ma maîtrise et pour m'avoir ensuite fait confiance tout au long de ma thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe présents et passés, Khalid Ouararhni, Marielle Herzog, Johan Tisserand, Mariam Chendeb, Konstantin Khetchoumian et Margarita Cerviño pour leur sympathie, leurs conseils, et pour la bonne ambiance qu'ils ont su instaurer dans le labo. Merci à Thierry Lerouge pour les moments de discussion (scientifiques ou non) qui ont souvent agrémentés de bons moments de pauses. Un grand merci enfin à la petite dernière, Céline Graber avec qui ce fut pour moi un réel plaisir de passer ma dernière année de thèse. Merci beaucoup pour sa joie, son humour et surtout pour son soutien. Je lui souhaite tout le meilleur pour la suite.

Je remercie toutes les personnes de l'Institut avec lesquelles j'ai pu partager quelques bons moments, ou que lques ne pas a u re staurant universitaire : Gabrielle Mengus, Igor Martianov, Maïka Jangal, Daniel, Silvia, Alessandra Lana et tous ceux que j'ai pu oublier.

Je remercie toutes les personnes de services communs de l'Institut, et plus particulièrement Bernard Jost, Stéphanie Le Gras et Doulaye Dembele de la plate-forme Biopuce et Séquençage. Merci aussi à Amin Choukrallah pour son aide et ses conseils pour le ChIP-seq.

Je remercie tous mes amis et ma famille pour leur soutien. Un grand merci surtout à ma mère qui m'a toujours soutenu dans les moments les plus difficiles et encouragé dans cette voie, sans jamais m'y pousser.

Enfin, je ne pourrais bien sûr jamais oublier ma sœur Eléna qui nous a quitté bien trop tôt et qui me manque encore beaucoup. Sa maladie m'a fait prendre conscience de l'importance du travail de recherche et le souvenir de la joie qu'elle avait, même dans les moments les plus difficiles, a toujours été pour moi d'une grande aide. Ce manuscrit lui est dédié...

Sommaire

<u>Liste des figures et tableaux</u>	5
<u>Abréviations et Acronymes</u>	8
<u>Introduction</u>	13
I. Régulation de la transcription et chromatine	13
1. Généralités sur la transcription	13
a) La machinerie de transcription de base	13
b) Les facteurs de transcription séquence-spécifiques	14
i. Les familles de facteurs de transcription	14
ii. Les séquences régulatrices reconnues par les facteurs de transcription	15
c) Les facteurs intermédiaires de transcription	17
2. La chromatine	17
a) Les niveaux d'organisation et de compaction de la chromatine	18
b) La structure de la chromatine	19
i. Le nucléosome	19
ii. Les histones de la particule cœur	20
iii. Les histones de liaison	20
iv. Les variants d'histone	21
- Les variants de l'histone H3	21
- Les variants de l'histone H2A	22
- Les variants de l'histone H4 et H2B	23
II. Remodelage et modification de la structure de la chromatine	25
1. Les modifications de la chromatine	25
a) La méthylation de l'ADN	25
i. Les méthylases de l'ADN	26
ii. Les médiateurs de l'information	27
iii. Les rôles biologiques de la méthylation	27
b) Les modifications des histones	28
i. Les différents types de modifications des histones et leur effet sur la transcription	29
- L'acétylation des histones	30
- La méthylation des histones	30
- La phosphorylation des histones	31
- L'ubiquitination des histones	32
- L'ADP-ribosylation	33
- Les autres modifications des histones	34

ii. L'interdépendance des modifications des histones	35
- Exemples de régulation en <i>cis</i>	35
- Exemples de régulation en <i>trans</i>	36
c) Les enzymes de modification des histones	37
i. Les histones acétyltransférases (HAT)	37
ii. Les histones déacétylases (HDAC)	39
iii. Les histones méthyltransférases (HMT)	40
iv. Les histones déméthylases (HDM)	42
d) La reconnaissance des modifications des histones	44
e) Hypothèses sur les mécanismes de régulation de la transcription par les modifications des histones	45
i. L'hypothèse « électrostatique »	45
ii. L'hypothèse du code des histones	46
2. Les complexes de remodelage de la chromatine	47
a) La famille SWI/SNF	48
b) La famille ISWI	48
c) La famille Mi-2/CHD	48
d) La famille INO	49
III. Organisation nucléaire de la chromatine	51
1. Les territoires chromosomiques	51
a) Description	51
b) Disposition des chromosomes et des gènes dans les territoires chromosomiques	51
2. La périphérie nucléaire et les complexes des pores nucléaires (NPC)	53
a) La périphérie nucléaire	54
b) Les complexes des pores nucléaires (NPC)	55
3. L'euchromatine et l'hétérochromatine	56
a) L'euchromatine	56
b) L'hétérochromatine	56
i. L'hétérochromatine constitutive	57
ii. L'hétérochromatine facultative	58
iii. Répression de l'expression des gènes par hétérochromatinisation	59
4. Régulation et dynamique du positionnement nucléaire	59
IV. La famille des protéines HP1	62
1. Identification	62
2. Organisation structurale	62
3. Fonctions des protéines HP1	64
a) Formation de l'hétérochromatine	65
b) Répression des gènes dans l'euchromatine	66

c) Les protéines HP1 et la fonction des centromères et télomères.....	66
d) Les protéines HP1 dans la réplication et la réparation de l'ADN	68
e) Les protéines HP1 et l'activation de la transcription	68
f) Fonctions physiologiques des protéines HP1	69
4. Dynamique des interactions des protéines HP1	70
V. La famille des facteurs intermédiaires de transcription TIF1	71
1. Les caractéristiques communes des protéines TIF1	71
a) La structure modulaire	71
i. Le domaine « RBCC »	71
ii. Le « PHD finger » et le bromodomaine	72
iii. La région centrale.....	73
b) La capacité de répression intrinsèque	74
c) Identité/similarité des protéines TIF1	74
2. Les fonctions spécifiques des protéines TIF1	75
a) TIF1 α	75
i. Identification	75
ii. Fonctions de TIF1 α	75
b) TIF1 γ	76
c) TIF1 δ	76
d) Les orthologues Bonus et Moonshine	77
3. TIF1 β	77
a) Identification	77
b) TIF1 β : le corépresseur universel des KRAB-ZFP	78
c) Rôle de TIF1 β dans la répression transcriptionnelle.....	79
i. Interaction avec les protéines HP1	79
ii. Recrutement de complexes de remodelage et de modification des histones..	80
iii. Rôle de TIF1 β au cours de l'apoptose et de la réparation de l'ADN.....	81
iv. Rôle de TIF1 β dans la répression des rétrovirus	83
d) Rôle de TIF1 β dans l'activation transcriptionnelle.....	83
e) Les modifications post-traductionnelles de TIF1 β	84
f) Les rôles physiologiques de TIF1 β	84
i. Le développement embryonnaire	84
ii. La spermatogenèse	85
iii. TIF1 β et la réponse comportementale.....	86
g) TIF1 β , un régulateur essentiel de la différenciation cellulaire	86
Projet de thèse.....	88

<u>Résultats</u>	90
Partie I : TIF1β s'associe avec les protéines HP1 pour établir et maintenir la répression du gène <i>MEST</i>	91
Partie II : Identification de gènes cibles de TIF1β au cours de la différenciation cellulaire	94
I. Projet	96
II. Matériel et Méthodes.....	97
III. Résultats et discussion.....	101
1. Identification des sites de fixation de TIF1 β à l'échelle du génome	101
2. Détermination du nombre de tags permettant de définir un site de fixation de TIF1 β	103
3. Localisation génomique des séquences cibles de TIF1 β	107
4. TIF1 β a une affinité pour les séquences répétées de type LTR et SINE.....	109
5. Analyse fonctionnelle des gènes cibles de TIF1 β	111
<u>Discussion et Perspectives</u>	114
I. Rôle de l'interaction entre TIF1β et les protéines HP1 dans la répression des gènes par hétérochromatinisation	115
1. Etablissement et maintien de la structure de type hétérochromatine	115
2. Recrutement au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique.....	118
3. Quels sont les partenaires d'interaction de TIF1 β impliqués dans la répression des gènes cibles ?	119
II. Quelle est l'implication de TIF1β dans la régulation de l'expression des gènes à l'échelle de génome ?	121
1. Les gènes cibles de TIF1 β sont régulés par différents mécanismes.....	121
2. TIF1 β joue-il un rôle au niveau des LTR et des séquences répétées de type SINE ?	124
3. TIF1 β est un régulateur majeur de la physiologie cellulaire.....	126
4. Par quels mécanismes, les gènes cibles de TIF1 β sont-ils régulés ?.....	128
<u>Annexe I</u>	132
- Tableau R1 : Classement de différentes catégories fonctionnelles de gènes avec le programme Ingenuity en fonction de la p-valeur.....	132
- Tableau R2 : Liste des gènes pour chaque catégorie fonctionnelle	133
<u>Annexe II</u>	140
- Séquences des oligonucléotides	140
<u>Références</u>	143
<u>Résumé</u>	173

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Les trois catégories de facteurs intervenant dans l'initiation de la transcription.....	14
Figure 2 : Les différents niveaux de compaction de la chromatine.....	18
Figure 3 : La structure du nucléosome	19
Figure 4 : Organisation structurale des histones de la particule cœur.....	20
Figure 5 : Les variants des histones canoniques et leurs fonctions.....	22
Figure 6 : Les deux mécanismes de répression exercés par la méthylation de l'ADN	26
Figure 7 : Les principales modifications post-traductionnelles connues des histones.....	29
Figure 8 : Distribution des modifications des histones le long des gènes et leurs rôles dans l'activation ou la répression de la transcription.....	32
Figure 9 : Exemples d'interdépendances des modifications des histones en <i>cis</i>	36
Figure 10 : Exemples d'interdépendances des modifications des histones en <i>trans</i>	36
Figure 11 : L'acétylation de la lysine neutralise la charge positive et induit la décompaction de la chromatine	37
Figure 12 : La méthylation des arginines par les PRMT de type I et II et les niveaux de méthylation des lysines.....	40
Figure 13 : La déméthylation des lysines et Arginines	43
Figure 14 : Existence de domaines protéiques reconnaissant spécifiquement des acides aminés modifiés.....	45
Figure 15 : Les quatre principales familles de complexe de remodelage de la chromatine.....	47
Figure 16 : Modèle d'action du complexe de remodelage de la chromatine NuRD	49
Figure 17 : Modèle de l'organisation nucléaire pendant l'interphase.....	52
Figure 18 : Relocalisation des gènes <i>Hoxb</i> en réponse à un signal de différenciation.....	53
Figure 19 : Répression des télomères à la périphérie du noyau	54
Figure 20 : Activation des gènes au niveau des complexes des pores nucléaires (NPC).....	55
Figure 21 : Deux états de la chromatine vue en microscopie électronique : l'euchromatine et l'hétérochromatine.....	56
Figure 22 : Régulation du positionnement nucléaire et de l'activité transcriptionnelle des gènes.....	61
Figure 23 : Localisation sub-nucléaire distincte des trois isoformes HP1 α , HP1 β et HP1 γ	62

Figure 24 : Organisation structurale des protéines HP1 et quelques exemples de partenaires d'interaction.....	63
Figure 25 : Les protéines HP1 jouent un rôle de plate-forme pour le recrutement d'effecteurs chromatinien.....	64
Figure 26 : Exemples de fonctions potentielles des protéines HP1	65
Figure 27 : Structure modulaire des protéines TIF1.....	72
Figure 28 : Représentation schématique du bromodomaine et structure tertiaire du tandem « PHD finger » / bromodomaine	73
Figure 29 : Fonction de répression intrinsèque par les protéines TIF1	74
Figure 30 : Les KRAB-ZFP : des protéines à doigt de zinc et à domaine « KRAB »	79
Figure 31 : TIF1 β réprime la transcription via le recrutement des protéines HP1 et des complexes HDACs	80
Figure 32 : Modèle de répression de la transcription par le complexe KRAB-ZFP/TIF1 β	81
Figure 33 : TIF1 β est indispensable à l'embryogenèse précoce	85
Figure 34 : TIF1 β est indispensable à la spermatogenèse.....	85
Figure 35 : La relocalisation de TIF1 β à l'hétérochromatine, au cours de la différenciation des cellules F9 en PrE, nécessite son interaction avec les protéines HP1	87
Figure 36 : L'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 est nécessaire pour la différenciation terminale des cellules F9 en endoderme pariétal (PE).....	88
Figure 37 : Schéma illustrant la fixation possible du complexe TFIIC et de TIF1 β au niveau de sites de liaison associés aux SINE	126

Figures Résultats

Figure R1 : Identification des sites de fixation de TIF1 β à l'échelle du génome au cours de la différenciation des cellules F9.....	102
Figure R2 : Détermination du nombre minimum de tags permettant de définir expérimentalement un site de fixation de TIF1 β	104
Figure R3 : Validation de l'expression des gènes cibles de TIF1 β isolés par ChIP-seq.....	106
Figure R4 : Les séquences promotrices et les séquences distales sont enrichies en îlots CpG	108
Figure R5 : TIF1 β a une affinité pour les séquences répétées de type LTR et SINE	110
Figure R6 : Annotation fonctionnelle des gènes cibles de TIF1 β régulés au niveau de la région promotrice.....	112

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques exemples de facteurs de transcription avec des domaines de liaison à l'ADN (DBD) caractéristiques	15
Tableau 2 : La fonction des ADN méthylases et le phénotype des méthylases mutantes.....	27
Tableau 3 : Les différents types de modifications covalentes des histones et leur(s) principale(s) fonction(s) associée(s).....	33
Tableau 4 : Les fonctions et spécificités de substrats des différentes familles de HAT	38
Tableau 5 : Exemples d'histone-lysine-méthyltransférases avec leurs spécificités de substrats et quelques fonctions associées	41
Tableau 6 : Les histone-arginine-méthyltransférases humaines avec leurs spécificités de substrats et quelques fonctions associées	42
Tableau 7 : Les familles des déméthylases avec leurs spécificités de substrat	43
Tableau 8 : Caractéristiques générales de l'euchromatine, l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative.....	57
Tableau 9 : Exemples de partenaires d'interaction des protéines HP1	67
Tableau 10 : Pourcentage d'identité/similarité entre les protéines TIF1.....	75

Tableaux Résultats

Tableau R1 :Classement des différentes catégories fonctionnelles de gènes avec le programme Ingenuity.....	132
Tableau R2 : Liste des gènes pour chaque catégorie fonctionnelle	133

Abréviations et Acronymes

A

A4galt: Alpha 1,4-galactosyltransferase
ac: Acétylation
acétyl-CoA: Acétyl-Coenzyme A
ACF: ATP-utilizing Chromatin remodeling and assembly Factor
 α KG: α -cétoglutarate
Apak: ATM and p53-associated KZNF protein
ar: ADP-ribosylation
AR: Acide Rétinoïque
ARBP: Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0
ASH1: Absent Small and Homeotic discs
ASH1L: Absent Small and Homeotic discs protein 1-Like
ATAC: ADA2A-containing complex
ATM: Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATRX: Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked homolog

B

bFTZ-F1: β Fushi TaraZu Factor 1
bio: Biotinylation
Birc6: Baculoviral IAP repeat-containing 6
BLAST: Basic Local Alignment and Search Tool
BRCA1: BReast CAncer 1
BRE: TFIIB Recognition Element
BRG1: Brahma-related gene 1
BSA: Bovine Serum Albumin

C

C/EBP: CCAAT/Enhancer Binding Protein
CAF1: Chromatin Assembly Factor 1
Calr: Calreticulin
CARM1: Coactivator Associated aRginine Methyltransferase 1
CAT: ChloramphenicolAcetylTransferase
CBP: CREB Binding Protein
Ccdc88a: Coiled coil domain containing 88A
CD: Chromodomain
CENP-A: CENtromeric Protein A
CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHD: Chromodomain Helicase DNA-binding protein
ChIP: Immunoprécipitation de la chromatine
ChIP-seq: Immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage haut débit

C

CHRAC: CHromatin Remodeling and Assembly Complex
cit: Citrullination
Cited2: Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
Cog2: Component of oligomeric golgi complex 2
CoREST: CoREpreSsor element Transcription factor
Cpe: Carboxypeptidase E
CREB: cAMP Responsive Element
CSD: Chromo Shadow Domain
CT: Chromosome Territory
CTCF: CCCTC-binding factor
CTF: CCAAT box binding Transcription Factor (aussi appelés NF-I)
Cyp19a1: Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1

D

dbAMPC: DiButyryl Adénosine MonoPhosphate Cyclique
DBD: DNA Binding Domain
DCE: Downstream Core Element
DDP1: Deafness-Dystonia Peptide 1
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco
DNMT: DNA MethylTransferase
Dot1L: Disrupter Of Telomere silencing protein 1-Like
DPE: Downstream Promoter Element
Dus1l: Dihydrouridine synthase 1-like

E

E2F1: E2F transcription factor 1
Ebf1: Early B-cell factor 1
EC: Embryonal Carcinoma
EHMT: Euchromatic Histone Methyl Transferase
ER: Estrogen Receptor
ES: Embryonic Stem cells
Esa1: Essential SAS2-related Acetyltransferase 1
ESC: Embryonic Stem Cell
ESR1: Estrogen receptor 1
EZH: Enhancer of Zest Homologue

F

FAD: Flavine-Adénine Dinucléotide
FISH: Fluorescence In Situ Hybridization
FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET: Förster Resonance Energy Transfer

G

Gcn5: General Control Nonderepressible-5
γH2A.X: Phospho-Ser139 de H2A.X
Gk5: Glycerol kinase 5
GNAT: Gcn5-N-AcetylTransferase-related
GPAT: Genomic Position Annotation Tool
GTF: General Transcription Factor

H

H2A.Bbd: H2A Barr body-deficient
H2BFWT: H2B Family member W Testis specific
H3.1t: H3.1 Testis-specific
HAT: Histone AcétylTransférases
HBO1: Histone Acetyltransferase Binding to ORC-1
HC: Hétérochromatine Centromérique
HCC: HepatoCellular Carcinoma
HDA1: Histone DeAcetylase 1
HDAC: Histones DéACétylases
HDM: Histone Déméthylases
HFD: Histone Fold Domain
HMT: Histone MéthylTransférases
HOAP: HP1/ORC-Associated Protein
Hox: HomeOboX
HP1: Heterochromatin Protein 1
HPRT: Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transferase 1
HYPB: Huntingtin Yeast Partner B

I

IC: Interchromatin Compartment
ICM: Inner Cell Mass
IFN: Interféron
IL2rb: Interleukin-2 receptor B
INCENP: INner CENtromere Protein
INM: Inner Nuclear Membrane
INO80: INOsitol 80
Inr: Elément Initiateur
iso: Cis-trans isomérisation
ISWI: Imitation of SWItch

J

JARID: Jumonji At-Rich Interactive Domain
JHDM: JmjC-containing Histone Demethylase
JmjC: Jumonji C
JMJD: Jumonji-domain containing
JPB1: Janus Kinase-Binding protein-1
jpc : jours post coïtum
Jub : Ajuba

K

KAP-1: KRAB-ZFP Associated Protein 1
Kcnj10: Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10
Kctd17: Potassium channel tetramerisation domain containing 17
kDA: KiloDalton
KDM: Lysine (K) DeMethylase
Kid-1: Kidney Ischemia and Developmentary regulated gene 1
KO: Knock-Out
kpb: Kilo paire de base
KRAB: KRüppel-Associated Box
KRAB-ZFP: KRüppel Associated Box-Zinc Finger Protein
KRIP-1: KRAB-A Interacting Protein 1
Krr1: Small subunit (SSU) processome component
KSHV: Kaposi's sarcoma-associated herpes virus

L

LAP2b: Lamina Associated Polypeptide 2 beta
Limk2: LIM motif-containing protein kinase 2
LINE: Long INterspersed Element
LRH1: Liver Receptor Homolog 1
LSD1: Lysine Specific Demethylase 1
LTR: Long Terminal Repeat

M

MACS: Model-based Analysis of ChIP-Seq
MART: Mono-ADP-RibosylTransférase
Mash2: Mammalian achaete-scute homologue 2
MBP: Methyl-CpG-Binding Proteins
MDM2: Mouse Double Minute chromosome 2
me: Méthylation
MEST: Mesoderm specific transcript
MITR: MEF2-interacting transcription repressor

M

MLL: Mixed lineage leukemia
M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus
MOF: Males-absent On the First protein
MOZ: MOncytic leukemia Zinc-finger protein
Mrpl39: Mitochondrial ribosomal protein L39
MTE: Motif Ten Element
MYST: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60

N

NAD+: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
N-CoR1: Nuclear CoReceptor 1
NE: Nuclear Envelope
NGFI-B: Nerve Growth Factor IB
Nos3: Nitric oxide synthase 3
NPC: Nuclear Pore Complex
NR box: Nuclear Receptor box
NSD1: Nuclear receptor-binding SET Domain protein 1
NuA4: Nucleosome Acetyltransferase of histone H4
NuRD: Nucleosome Remodeling and Deacetylating
NURF: NUcleosome Remodeling Factor

O

ONM: Outer Nuclear Membrane
ORC: Origin Recognition Complex

P

p53BP1: p53 Binding Protein 1
PADI4: Peptidyl Arginine Delminase 4
PARP: Poly-ADP-ribosyltransférases
pb: Paire de base
PBS: Primer Binding Site
PCAF: P300/CBP Associated Factor complex
PcG: Polycomb Group
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR: Polymerase Chain Reaction
PE: Endoderme pariétal
PEV: Position Effect Variegation
ph: phosphorylation
PHD: Plant HomeoDomain
PIC: PreInitiation Complex
PIM1: Proviral Integration site for Moloney murine leukemia virus 1
PKCδ: Protein Kinase C delta
Pkm2: Pyruvate kinase, muscle 2

P

Pol II: ARN polymérase II
PR: Progesterone Receptor
PRC: Polycomb Repressive Complex
PRDM: PRDI-BF1 and RIZ homology domain containing protein
PrE: Endoderme primitif
PRMT: Protein aRginine MethylTransferase

R

RAR: Retinoic Acid Receptor
RARE: Retinoic Acid Responsive Element
Rb: Retinoblastoma
RBCC: RING finger, B boxes, Coiled Coil
RING: Really Interesting New Gene
RIZ: Retinoblastoma protein-Interacting Zinc finger gene
RSC: Remodel the Structure of Chromatin
RSF: Remodeling and Spacing Factor
RXR: Retinoid X Receptor

S

SAGA: Spt-Ada-Gcn5 Acetylase coactivator complex
SAM: S-Adenosyl-Methionine
SANT: SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIB
SAS: Something About Silencing
SET: Su(var)3-9, Enhancer of zest, Trithorax
SETD2: SET domain containing protein 2
SETDB1: SET Domain Bifurcated 1
SETMAR: SET domain and MARiner transposase fusion gene-containing protein
SFV: Sérum de Veau Foetal
SINE: Short INterspersed Element
Sir: Silent Information Regulator
SIRT: SIRTuines
SMRT: Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone receptors
SMYD3: SET and MYND domain-containing protein 3
Sox8: SRY-box containing gene 8
spH2B: Human SPerm specific H2B
SRA: SET and Ring finger-Associated
STAGA: SPT3-TAF9-GCN5L Acetylase
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
su: SUMOylation
SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier
Svil: Supervillin

S

SWI/SNF: SWItching/Sucrose Non Fermenting
SWR1: SWI2/Snf2 Related ATPase 1

T

TAF: TBP Associated Factor
tag : courte séquence de 36 bases
TAM: Tamoxifène
TBP: TATA Binding Protein
TFIIIC: Transcription Factor IIIC
TFTC: TBP-Free TAF containing Complex
TIF: Transcriptional Intermediary Factor
TR: Thyroid hormone Receptor
TRIM: Tripartite Motif
TSA: Trichostatine A
TSH2B: Human Testis/Sperm specific H2B
TSS: Transcription Start Site
TSS: TIF1 Signature Sequence

U

UAS: Upstream Activating Sequence
ub: Ubiquitination
UCA1: Urothelial cancer associated 1
UCSC: University of California at Santa Cruz
URS: Upstream Repressing Sequence
UTX/Y: Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat, X/Y chromosome

V

VDR: Vitamin D Receptor
VE: Endoderme Viscéral
VP16: Herpes simplex Virus Protein 16

W

WCRF: Williams syndrome transcription factor
Chromatin Remodeling Factor
WD40: Tryptophane-Aspartic-acid-repeat every
40 residues
WDR5: WD40 Repeat protein 5
WT: Wild-Type

Y

Ylpm1: YLP motif containing 1

Z

ZBTB: Zinc finger and Broad
complex/Tramtrack/Bric-a-brac
ZFP: Zinc Finger Protein

Introduction

INTRODUCTION

I. Régulation de la transcription et chromatine

1. Généralités sur la transcription

Toutes les cellules d'un organisme vivant sont amenées à intégrer et répondre à différents signaux de l'environnement afin de coordonner les différentes étapes du développement et de la différenciation cellulaire. Au cours du développement, les cellules, qui contiennent pourtant le même patrimoine génétique, vont se spécialiser et se multiplier pour former différents organes et tissus. Cette spécialisation dépend de la spécificité fonctionnelle des gènes qui sont exprimés au moment opportun dans les tissus appropriés. C'est pourquoi une régulation très ordonnée de l'expression des gènes est nécessaire pour le métabolisme cellulaire normal et pour le développement et la survie de l'ensemble de l'organisme. L'initiation de la transcription est une étape majeure dans ce contrôle et fait intervenir la machinerie de transcription de base, les facteurs de transcription séquence-spécifiques et les cofacteurs (Malik et Roeder, 2005; Sikorski et Buratowski, 2009).

a) La machinerie de transcription de base

A la différence des procaryotes chez lesquels on retrouve une seule ARN polymérase, chez les eucaryotes, l'ensemble des gènes d'une cellule est transcrit par trois ARN polymérase différentes : l'ARN polymérase I (pol I) qui transcrit les gènes codants pour les ARN ribosomiques (ARNr), l'ARN polymérase II (polII) qui transcrit les gènes codants pour les protéines et les petits ARNs nucléaires (U1-U5) et l'ARN polymérase III (polIII) qui synthétise les ARNs de transfert ainsi que l'ARNr 5S et l'ARN U6.

Chez les eucaryotes, l'ARN polymérase II seule est incapable d'initier la transcription d'un gène. La présence d'un nombre minimum de protéines additionnelles, appelées facteurs généraux de la transcription (*GTF* : *General Transcription Factors*), est nécessaire à la formation de la machinerie de transcription de base. Ces facteurs généraux (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF et TFIIH) vont en effet sélectionner le site d'initiation de la transcription en s'associant à la région promotrice d'un gène transcrit par la polIII et former un complexe de pré-initiation (*PIC* : *PreInitiation Complex*). Celui-ci permettra à la polymérase de se lier au

été répertoriés, parmi lesquels on retrouve par exemple les motifs de types glissière à leucine et la structure en doigt de zinc (**tableau 1**). Certains facteurs peuvent être actifs de façon constitutive dans chaque cellule mais d'autres sont activés et se lient à des séquences régulatrices uniquement en réponse à un signal intra ou extracellulaire (par exemple les facteurs Jun, Fos et CREB), ou encore suite à la liaison d'un ligand, comme dans le cas des récepteurs nucléaires.

Domaines de liaison à l'ADN (DBD)	Type	Exemples
Doigt de zinc	C2H2	KRAB-ZFP, Ikaros, SP1, TFIIIA
	C4	HNF4a, GATA-1, récepteurs hormones stéroïdes (SHR) et récepteurs glucocorticoïdes (GR)
	C6	GAL4, LEU3, PPR1, LAC9
Hélice-tour-hélice	HTH	Oct-1, Oct-2, Pit-1, Hnf-3
Hélice-boucle-hélice	HLH	E2F, Myc, MyoD
Glissière à leucine	LZ	Jun, Fos (AP-1), NRF2, C/EBP

Tableau 1 : Quelques exemples de facteurs de transcription avec des domaines de liaison à l'ADN (DBD) caractéristiques.

ii. Les séquences régulatrices reconnues par les facteurs de transcription

De courtes séquences d'une longueur de l'ordre de 5 à 25 nucléotides (Qiu, 2003; Wray et al., 2003) sont reconnues par les facteurs de transcription. Ces séquences sont souvent situées au niveau de la région promotrice des gènes (pour revues, Smale et Kadonga, 2003; Sandelin et al., 2007) mais peuvent également se retrouver à distance variable du site d'initiation de la transcription (TSS : *Transcription Start Site*) comme dans le cas de « enhancers » et « silencers » (Levine et Davidson, 2005). Ces éléments de régulation peuvent être ainsi classés en trois catégories :

- **Le promoteur minimal** : il contient toutes les séquences reconnues par les facteurs généraux de la transcription. L'élément le plus connu qui le caractérise est la boîte TATA (Gannon et al., 1979) située à une trentaine de paires de bases en amont du TSS et/ou de l'élément initiateur Inr et que l'on retrouve chez les mammifères dans environ 10 à 20% des promoteurs (Gershenson et Ioshikhes, 2005; Cooper et al., 2006). D'autres éléments peuvent

souvent se rajouter tels que par exemple la séquence BRE (*TFIIB Responsive Element*) de reconnaissance du facteur de transcription TFIIB, la séquence DPE (*Downstream Promoter Element*) qui serait reconnue par une sous-unité de TFIID (Burke et Kadonaga, 1997), les éléments MTE (*Motif Ten Element*) et DCE (*Downstream Core Element*) (pour revues, Butler et Kadonaga, 2002; Thomas et Chiang, 2006) (**figure 1**).

- **Les séquences régulatrices proximales** : elles sont localisées généralement entre 40 et 250 paires de bases (pb) en amont du TSS et contiennent la majorité de motifs de régulation reconnus par les facteurs de transcription. Ces séquences peuvent avoir un effet activateur sur la transcription, dans le cas des UAS (*Upstream Activating Sequence*) ou répresseur, dans le cas des URS (*Upstream Repressing Sequences*), selon l'acteur de transcription qui s'y fixe. De nombreux motifs ont ainsi bien été caractérisés dans cette région, parmi lesquels on peut citer par exemple les boîtes CCAAT reconnues par les activateurs transcriptionnels C/EBP (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*) (pour revue, Ramji et Foka, 2002) et CTF (*CCAAT box binding Factor*) (Belikov et al., 2004), les motifs riches en GC reconnus par l'activateur SP1 ou encore les séquences RARE (*Retinoic Acid Responsive Element*) reconnues par les récepteurs nucléaires de type RAR (*Retinoic Acid Receptor*) et RXR (*Retinoid X Receptor*).

- **Les séquences régulatrices distales** : elles correspondent aux éléments « enhancers » et « silencers » reconnus respectivement par les activateurs et les répresseurs transcriptionnels. Ces séquences peuvent aussi bien se situer en amont qu'en aval du TSS et sont localisées parfois jusqu'à plusieurs milliers de paires de bases de la région promotrice (Levine et Tjian, 2003). Ces régions distales peuvent s'étendre sur plus de 5 000 pb et regroupent souvent plusieurs séquences régulatrices reconnues par de nombreux activateurs ou répresseurs transcriptionnels (Levine et Tjian, 2003). Les éléments distaux jouent également un rôle important dans la régulation spatiale et temporelle de l'expression de gènes, en particulier au cours du développement (Howard et Davidson, 2004).

En se fixant au niveau des éléments de régulation, les facteurs de transcription séquence-spécifiques vont activer ou réprimer la transcription de leurs gènes cibles par l'intermédiaire de cofacteurs (**figure 1**).

c) Les facteurs intermédiaires de transcription

Les facteurs intermédiaires de transcription (TIFs), encore appelées cofacteurs, peuvent exercer des effets positifs ou négatifs sur la transcription selon qu'il s'agit de coactivateurs ou de corépresseurs. Ils peuvent exercer leurs effets à plusieurs niveaux :

- Certains agissent directement sur la machinerie de transcription de base en stimulant ou inhibant la formation du complexe de préinitiation (Hampsey et Reinberg, 1999; Lee et Young, 2000).
- Certains agissent sur la modification et le remodelage de la structure de la chromatine (voir chapitre II).
- D'autres exercent un effet positif ou négatif en associant des gènes cibles vers des compartiments spécialisés du noyau (voir chapitre III).

Les coactivateurs et corépresseurs agissent pour la plupart sous forme de complexes multiprotéiques et les échanges entre cofacteurs sont très dynamiques. De nombreuses études ont montré que des cofacteurs dotés de propriétés enzymatiques distinctes sont recrutés de façon séquentielle et cyclique. Ils facilitent ensuite la liaison de l'ARN polymérase II en altérant la structure du promoteur (Shang et al., 2000; Métivier et al., 2003; Métivier et al., 2008). Parmi ces cofacteurs, on peut citer par exemple la famille de corépresseurs transcriptionnels TIF1 (pour *Transcriptional Intermediary Factor 1*) sur laquelle je reviendrai dans le chapitre V.

2. La chromatine

Dans le noyau d'une cellule eucaryote, le matériel génétique est organisé en une structure complexe de nature nucléo-protéique appelée chromatine, composée d'ADN et de petites protéines basiques, les histones (Kornberg, 1974). Du fait de la taille considérable du génome eucaryote (3 milliards de pb équivalent à une longueur d'environ 1,8 mètre), un repliement très hiérarchisé et ordonné de l'ADN est requis pour pouvoir empaqueter ce matériel génétique à l'intérieur d'un compartiment restreint de 6 μm , le noyau des cellules. La chromatine interfère avec l'accessibilité des séquences régulatrices précédemment citées et la modulation de sa structure constitue un niveau de régulation important dit épigénétique.

a) Les niveaux d'organisation et de compaction de la chromatine

Les premières observations de la chromatine en microscopie électronique ont révélé une organisation très régulière et répétée en forme de « collier de perle », communément appelé « fibre de 10 nm » (O lins e t O lins, 1974; O udet e t a l., 1975). Ce pr emier ni veau d'organisation c orrespond a ux nu cléosomes, uni tés fonda mentales d e l a chromatine, régulièrement es pacés par de s segments d'A DN nu (Kornberg, 1974). Dans de s concentrations physiologiques en sel, les nucléosomes se replient en une structure secondaire plus complexe. L'observation en microscopie électronique de fines sections de chromosomes métaphasiques de cel lules Hela m ontre ainsi l a pr ésence d' une fibre chr omatinienne pl us condensée de 30 nm (Marsden et Laemmler, 1979) (**figure 2**). La structure de cette fibre n'est pas encore finement déterminée et deux modèles ont été proposés : le modèle de type hélice ou solénoïde dans lequel une rangée de nucléosomes se replie de façon à être adjacente à une autre rangée (Finch et Klug, 1976) et le modèle d'arrangement en zig-zag des nucléosomes qui forme une hélice à partir de deux sites d'initiation (Dorigo et al., 2004; Schalch et al., 2005).

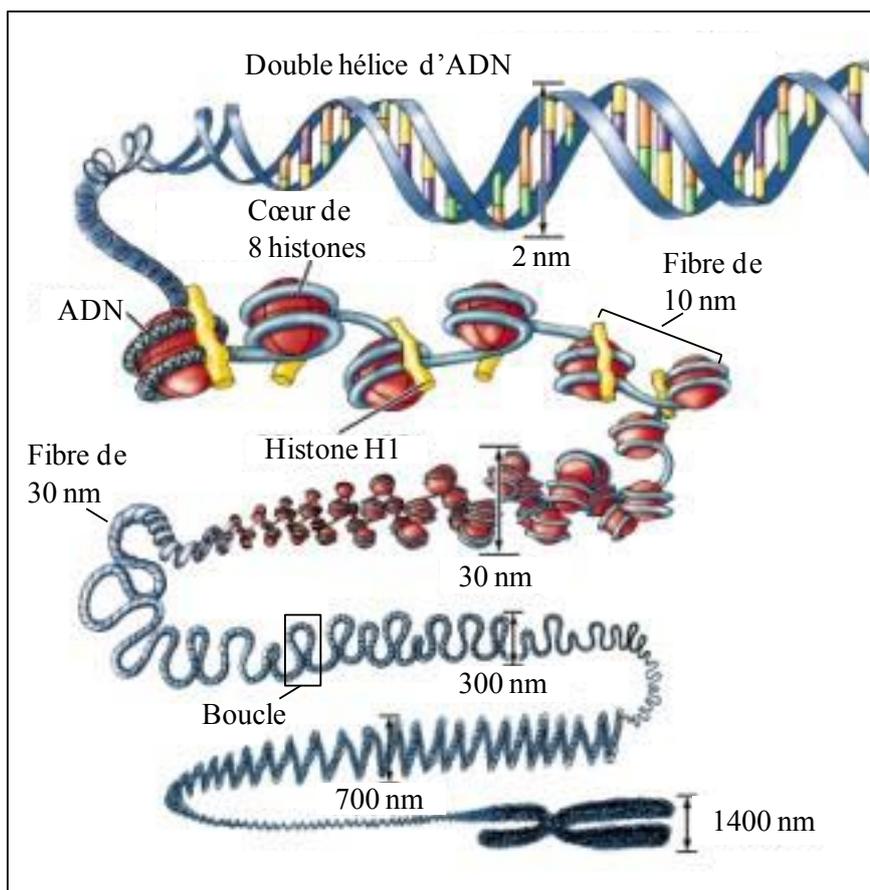


Figure 2 : Les différents niveaux de compaction de la chromatine.

La chromatine peut adopter des niveaux de compaction encore bien supérieurs, avec un repliement de la super-hélice de 30 nm en une fibre de 100 à 300 nm de diamètre constituée de boucles ou « chromomères » de plusieurs centaines de kpb (pour revues, Cook, 1995; Belmont, 2006; Fraser et Bickmore, 2007) (**figure 2**). La compaction extrême de ces boucles de 300 nm donnera ensuite naissance aux chromosomes mitotiques qui, pendant l'interphase, sont localisés dans des régions appelées « territoires chromosomiques » (cf. chapitre III.).

b) La structure de la chromatine

i. Le nucléosome

Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine est composé d'une quantité équivalente d'ADN et de petites protéines basiques, les histones (Kornberg et Thomas, 1974). La structure du nucléosome a pu être déterminée de façon précise par cristallographie aux rayons X à une résolution de 2.8 Å (Luger et al., 1997) puis, plus récemment, à une résolution de 1.9 Å (Davey et al., 2002) (**figure 3**); le nucléosome est formé d'une particule cœur centrale composée de 146 pb d'ADN enroulées en 1.65 tours autour d'un octamère d'histones et d'une séquence internucléosomale ou « ADN linker » qui relie les particules cœur entre elles. L'octamère est organisé en un tétramère (H3/H4)₂ autour duquel sont fixés deux hétérodimères H2A/H2B (Kornberg et Lorch, 1999). De nombreuses interactions de type électrostatique et hydrogène confèrent aux nucléosomes une grande stabilité.

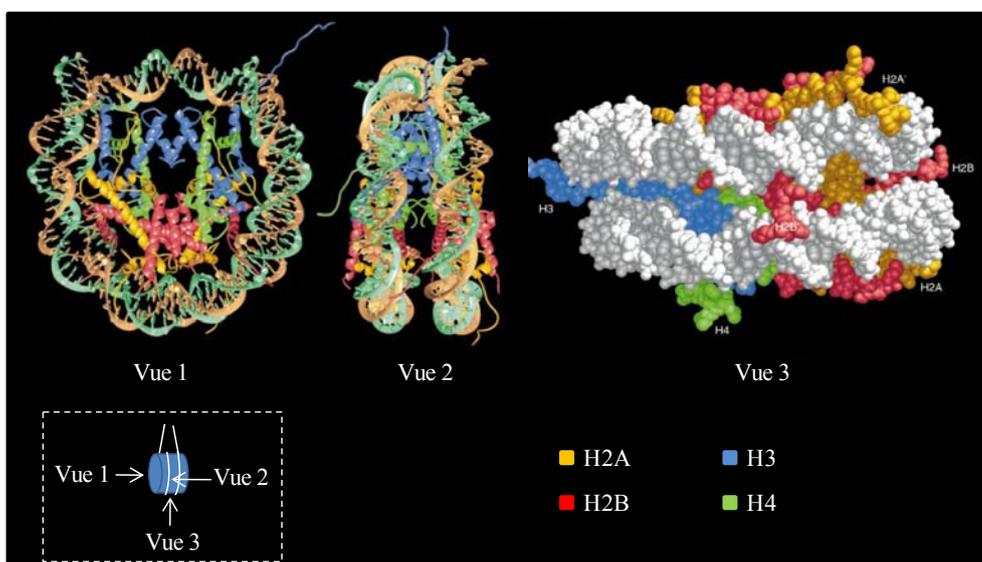


Figure 3 : La structure du nucléosome (modifié de Luger et al., 1997).

ii. Les histones de la particule cœur

Les histones de la particule cœur (histones H3, H4, H2A et H2B) sont de petites protéines basiques d'environ 15 kDa, très conservées en longueur et en séquence au cours de l'évolution (Sullivan et Landsman, 2003; et pour revue, Malik et Henikoff, 2003). Ces protéines sont formées d'un domaine central « histone-fold » structuré en trois α -hélices reliées entre elles par des boucles flexibles et, de part et d'autre, on retrouve des extrémités N- et C-terminales non structurées (**figure 4**).

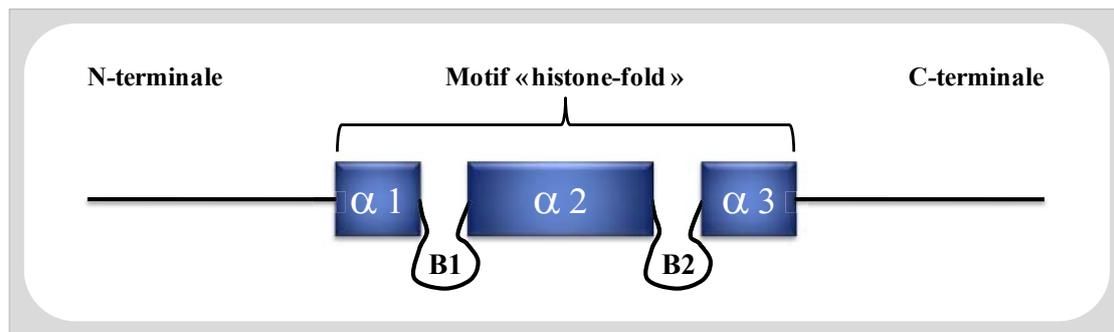


Figure 4 : Organisation structurale des histones de la particule cœur.

Les trois hélices α (α) du domaine « histone-fold » sont reliées par des boucles (B).

Les régions N- et C-terminales sont soumises à un grand nombre de modifications post-traductionnelles (voir chapitre II) et sont engagées dans des interactions impliquant d'autres nucléosomes ou d'autres protéines. Ces régions jouent ainsi un rôle important dans l'organisation et la modification de la structure de la chromatine (Hecht et al., 1995; Dorigo et al., 2003).

iii. Les histones de liaison

Les histones de liaison ou histones « linker » sont des protéines peu conservées entre les espèces qui présentent des disparités et des spécificités d'expression au cours du développement et de la différenciation cellulaires (pour revues, Zlatanova et al., 1996; Khochbin, 2001; Godde et Ura, 2009). La structure de ces histones, dont le prototype majeur est l'histone H1, est constituée d'un domaine central globulaire flanqué de part et d'autre d'une courte région N-terminale et d'une longue région C-terminale basique peu structurée (Zlatanova et van Holde, 1996; Khochbin, 2001). Du fait de leurs propriétés de pontage inter-nucléosomal, les histones de liaison jouent un rôle important dans l'espacement des unités

nucléosomales et dans la topologie et le degré de compaction de l'ADN au sein du nucléosome (pour revue, Robinson et Rhodes, 2006; Woodcock, 2006).

iv. Les variants d'histone

Dans la plupart des organismes, les formes majeures d'histones existent en de multiples copies et sont exprimées principalement en phase S du cycle cellulaire, mais il existe aussi une fraction d'histones non -alléliques (formes de remplacement) qui présentent de s différences notables en séquences (Franklin et Zweidler, 1977). Ces variants sont exprimés tout au long du cycle cellulaire et certaines formes de remplacement ont des propriétés biochimiques qui leur permettent d'altérer la structure du nucléosome, alors que d'autres présentent des localisations sub-cellulaires spécifiques et peuvent remplacer une histone majeure au cours des étapes de différenciation et du développement par exemple (Brandt et al., 1979; Wunsch et al., 1991). L'incorporation de variants d'histones permet ainsi de moduler l'accès à l'ADN chromatinien.

Des histones de remplacement ont été décrits pour chaque type d'histone majeure, à l'exception de l'histone H4, et présentent des fonctions spécifiques (pour revues, Kamakaka et Biggins, 2005; Sarma et Reinberg, 2005; Bernstein et Hake, 2006) (**figure 5**).

Les variants de l'histone H3

Chez les mammifères, on retrouve cinq isoformes distincts de l'histone H3 : les variants H3.1, H3.2, H3.3 et l'isoforme CENP-A (*CEN*tronic *P*rotein *A*) spécifique des centromères (Ahmad et Henikoff, 2002) ainsi que le variant H3.1t (*H3.1 Testis-specific*), exprimé spécifiquement dans les testicules (Witt et al., 1996).

Les variants spécifiques des centromères (cenH3), tels que CENP-A chez les mammifères, se lient spécifiquement au niveau des centromères où ils jouent un rôle important pour la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose et la méiose en participant à la formation d'un kinétochore actif (Blower et Karpen, 2001).

Les variants H3.3 et H3.1t ne diffèrent que de quelques acides aminés par rapport aux histones majeures. Mais H3.3 est exprimé tout au long du cycle cellulaire à la différence de l'histone H3, et est souvent localisé au niveau de régions transcriptionnellement actives des chromosomes (Ahmad et Henikoff, 2002). Ce variant est en effet enrichi en marques actives telles que l'acétylation de la lysine 36 et la diméthylation de la lysine 79 (Hake et al., 2006).

Le variant H3.2 semble, par contre, impliqué dans la répression de gènes en étant méthylé au niveau de la lysine 27 alors que le variant H3.1 possède des marques associées à l'activation des gènes (acétylation de la lysine 14) et à la répression de la transcription (diméthylation de la lysine 9) (Hake et al., 2006). Ce variant H3.1 semble ainsi exercer des fonctions biologiques distinctes de H3.2.

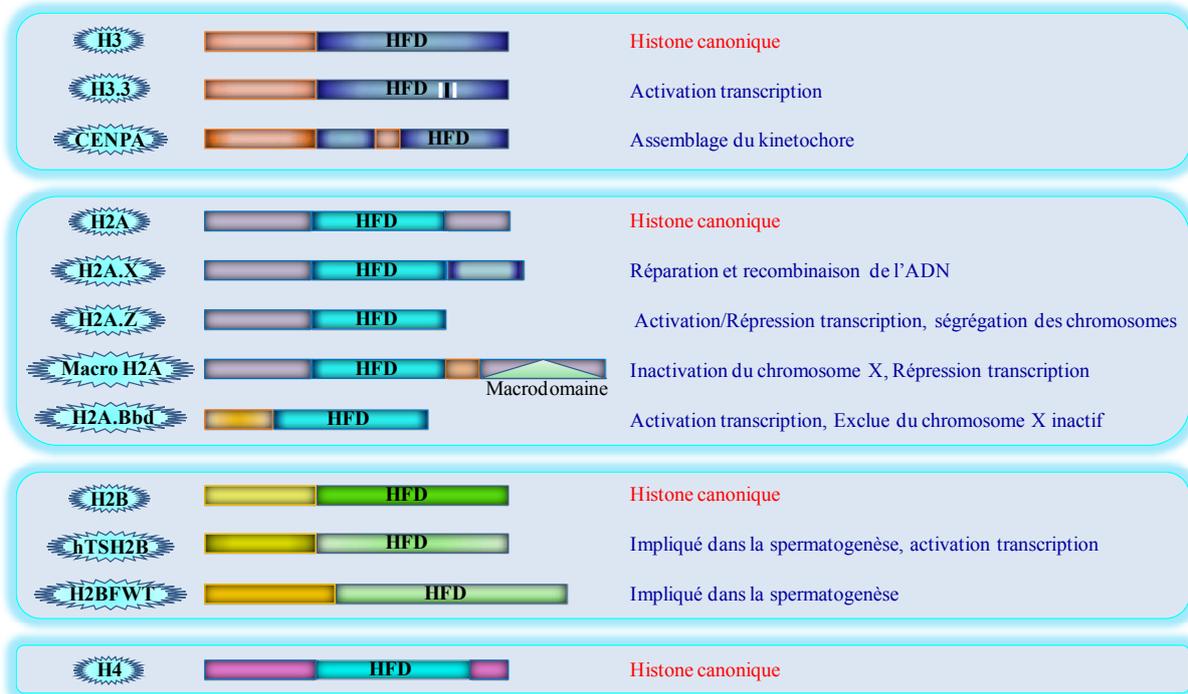


Figure 5 : Les variants des histones canoniques et leurs fonctions.

✚ Les variants de l'histone H2A

Quatre histones de remplacement ont été décrites pour l'histone H2A : les variants H2A.X, H2A.Z, macroH2A et H2A.Bbd (*H2A Barr body-deficient*) qui se distinguent de l'histone H2A essentiellement par leur région C-terminale.

Le variant H2A.X est retrouvé de la levure à l'homme et sa fonction est largement conservée au cours de l'évolution. Cette histone est caractérisée par la présence d'un motif SQ(E/D) très conservé dans la région C-terminal dont la sérine (139 chez les mammifères et 129 chez la levure) est phosphorylée en réponse aux cassures d'ADN double brin (Rogakou et al., 1998). Cette forme phosphorylée est appelée γ H2A.X (*H2A.X phospho-Ser139*) et joue un rôle crucial dans la fixation et l'accumulation de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Celeste et al., 2003).

Le variant H2A.Z est relativement divergent par rapport à l'histone canonique car les deux protéines ne partagent que 63% d'homologie. Chez la levure, H2A.Z est associé à l'activation de la transcription en étant incorporé près de régions inactives et en limitant la propagation de structures chromatinienne condensées répressives (Meneghini et al., 2003). Chez les mammifères, ce variant semble plutôt impliqué dans la répression de l'expression des gènes et dans la formation de structures chromatinienne condensées de type hétérochromatine, grâce notamment à son interaction avec les protéines HP1 α (Fan et al., 2004; Rangasamy et al., 2004).

MacroH2A est un variant spécifique des vertébrés qui est associé à une répression forte de la transcription; il joue un rôle essentiel dans l'établissement ou le maintien de l'hétérochromatine et est enrichi au niveau du chromosome X inactif chez les mammifères (Costanzi et Pehrson, 1998). Cette histone de remplacement joue un rôle général dans la répression car son domaine « macro » C-terminal inhibe la liaison de facteurs de transcription et le domaine « histone-fold » N-terminal inhibe le remodelage de la chromatine par les complexes SWI/SNF (Angelov et al., 2003).

Le variant H2A.Bbd semble jouer un rôle contraire à celui de macroH2A car il est exclu du chromosome X inactif dans les cellules femelles de mammifères en interphase et en mitose et co-localise avec l'histone H4 lorsqu'il est acétylé sur la lysine 12 au niveau de l'euchromatine (Chadwick et Willard, 2001). Ce variant est ainsi impliqué dans l'activation transcriptionnelle et son incorporation au sein du nucléosome génère une chromatine décondensée (Bao et al., 2004).

Les variants des histones H4 et H2B

L'histone H4 est l'une des protéines qui a le moins dérivé au cours de l'évolution et qui ne semble pas avoir de séquences variantes. Cependant, certains gènes de l'histone H4 sont exprimés de façon constitutive tout au long du cycle cellulaire et codent pour des protéines qui sont identiques en séquence à la forme majeure de H4 (Akhmanova et al., 1996).

L'histone H2B présente au moins trois formes de remplacement mais leurs fonctions restent encore mal définies : les variants spH2B, TSH2B et H2BFWT (pour revue, Bernstein et Hake, 2006).

Les variants spH2B (*human Sperm specific H2B*) et TS H2B (*human Testis/Sperm specific H2B*) sont spécifiques de cellules germinales de vertébrés mâles (Gineitis et al.,

2000; Zalensky et al., 2002). La forme spH2B est caractérisée par une longue région N-terminale riche en acides aminés basiques qui joue un rôle dans la condensation et l'empaquetage de la chromatine dans les spermatozoïdes.

Le variant H2BFWT (*H2B Family member W Testis specific*) est également exprimé exclusivement dans les testicules et est présent au niveau des télomères (Churikov et al., 2004). À la différence de la forme majeure H2B, ce variant est incapable de recruter des facteurs de condensation des chromosomes et de participer à l'assemblage des chromosomes mitotiques (Boulard et al., 2006).

II. Remodelage et modification de la structure de la chromatine

1. Les modifications de la chromatine

Pour assurer ses fonctions, la chromatine doit pouvoir être modulée de façon très dynamique. L'ensemble des mécanismes intervenant dans ce remodelage ainsi que l'organisation sub-nucléaire de la chromatine (voir chapitre III) permettent de définir le phénotype d'une cellule et de réguler l'expression des gènes sans altérer la séquence d'ADN, en codant une information dite « épigénétique » (Wu et Morris, 2001; Goldberg et al., 2007). La combinaison de ces modifications épigénétiques est à l'origine de l'identité des cellules et peut être modifiée au cours du développement et de la différenciation cellulaire (pour revue, Sasaki et Matsui, 2008).

a) La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est l'une des modifications de la chromatine les mieux caractérisées actuellement. On l'on retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. A la différence des procaryotes chez lesquels la méthylation de l'ADN peut se faire aussi bien sur des cytosines que sur des adénines, chez les mammifères, la méthylation est produite presque exclusivement sur des cytosines localisées en 5' d'une guanine (Hermann et al., 2004). Ces dinucléotides CpG sont sous-représentés dans le génome humain et sont souvent regroupés au niveau de régions riches en cytosines (C) et guanine (G) appelées « îlots CpG » (pour revue, Bird, 2002). Ces îlots recouvrent environ 0.7% du génome humain et contiennent environ 7% des dinucléotides CpG (Lander et al., 2001; Fazzari et Greally, 2004); plus de la moitié de ces îlots sont localisés au niveau des régions promotrices de gènes codant pour des protéines ou à proximité du site d'initiation de la transcription (Antequera et Bird, 1993). La méthylation de l'ADN est associée à un état réprimé de la chromatine et à l'inhibition de l'expression des gènes (Bird et Wolffe, 1999; Goll et Bestor, 2005). Deux mécanismes principaux sont envisagés pour expliquer cette inhibition : (1) la méthylation des cytosines peut empêcher l'association de certains facteurs de transcription au niveau de séquences spécifiques d'ADN (Watt et Molloy, 1988) ou, (2) la reconnaissance de sites CpG méthylés par des protéines spécifiques (telles que la famille des MeBD) exerce un effet

répresseur en recrutant d'autres complexes d'inhibition de la transcription (Boyes et Bird, 1991; Hendrich et Bird, 1998) (**figure 6**).

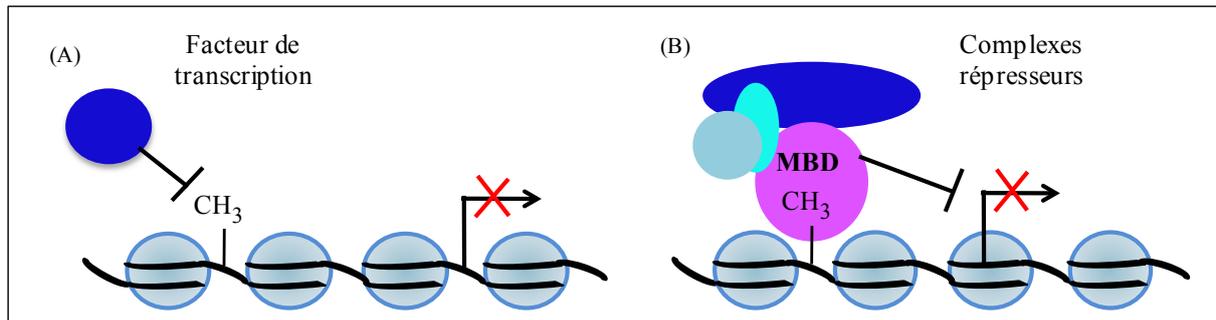


Figure 6 : Les deux mécanismes de répression exercés par la méthylation de l'ADN.

La méthylation au niveau de séquences spécifiques empêche la fixation d'un facteur de transcription (A) ou réprime la transcription en recrutant des complexes répresseurs (B).

i. Les méthylases de l'ADN

Les enzymes capables de méthyler l'ADN peuvent être regroupées en deux grandes classes principales :

- les méthylases de maintenance impliquées dans le maintien de la méthylation, telles que DNMT1 (*DNA MethylTransferase 1*) qui copie les motifs méthylés, préexistants dans le nouveau brin d'ADN au cours de la réplication (Leonhardt et al., 1992).

- les méthylases *de novo* telles que DNMT3a et DNMT3b qui méthylent des sites CpG exempts de toute méthylation (Okano et al., 1999) et qui coopèrent avec DNMT1 pour propager la méthylation au cours de la division cellulaire (Liang et al., 2002).

D'autres méthylases de l'ADN ont été identifiées telles que DNMT2 qui a une faible activité méthyltransférase *in vitro* (Hermann et al., 2003), DNMT3L qui module l'activité de DNMT3a et DNMT3b (Suetake et al., 2004) et est essentielle pour maintenir l'empreinte génomique maternelle chez la souris (Hata et al., 2002), ainsi que DNMT1o spécifique des oocytes et responsable également du maintien de l'empreinte génomique maternelle (Howell et al., 2001) (**tableau 2**).

<u>Méthyltransférases</u>	<u>Fonction</u>	<u>Phénotype mutant</u>
Dnmt1	Maintenance de la méthylation	Létale au niveau embryonnaire, perte de l’empreinte parentale et de l’inactivation du chr X
Dnmt1o	Isoforme spécifique des oocytes	Perte de l’empreinte maternelle
Dnmt2	Faible activité, méthylation de séquences non-CpG chez la drosophile	Pas de phénotype
Dnmt3a, Dnmt3b	Méthylases de novo, établissement de la méthylation	Létale au niveau embryonnaire
Dnmt3L	Pas d’activité catalytique, colocalise avec Dnmt3a et Dnmt3b	Empreinte maternelle anormale

Tableau 2 : La fonction des ADN méthylases et le phénotype des méthylases mutantes.

(d’après Jaenisch et Bird, 2003).

ii. Les médiateurs de l’information

La reconnaissance des dinucléotides CpG méthylés est réalisée principalement par une famille de protéines, la famille MBP (*Methyl-CpG-Binding Proteins*). Membres de cette famille, les protéines MBD1, MBD2, MBD4 et MBD5 reconnaissent l’ADN par l’intermédiaire de leur domaine MBD (*Methyl CpG binding domain*) (Meehan et al., 1992; Nan et al., 1993; et pour revue, Sasai et Defossez, 2009). Mais il a été découvert récemment que d’autres protéines, la protéine Kaiso (Prokhortchouk et al., 2001) et les protéines ZBTB4 et ZBTB38 (ZBTB : *Zinc finger and Broad complex/Tramtrack/Bric-a-brac domain-containing protein*) (Filion et al., 2006) reconnaissent l’ADN méthylé par l’intermédiaire d’un domaine en doigt de zinc, alors que les protéines UHRF1 et UHRF2 reconnaissent les CpG méthylés grâce à un domaine SRA (*SET and Ring finger-associated*). Ces protéines reconnaissant l’ADN méthylé répriment l’expression des gènes en recrutant des complexes corépresseurs de remodelage de la chromatine au niveau des régions d’ADN méthylées (Jones et al., 1998; Wade et al., 1999; Zhang et al., 1999).

iii. Les rôles biologiques de la méthylation

Chez les mammifères, la méthylation de l’ADN est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques liées principalement au développement, la différenciation, l’inactivation du chromosome X, l’empreinte parentale et l’expression de gènes tissu-spécifiques (pour

revue, Li, 2002). Elle joue un rôle primordial pour la survie cellulaire et l'intégrité du génome (pour revues, Laird, 2005; Esteller, 2007).

Au cours du développement embryonnaire précoce, des changements de profil de méthylation s'opèrent de façon très précise et ordonnée. Juste après la fécondation, les chromosomes maternels et paternels subissent une vague de déméthylation qui efface progressivement la plupart des marques de méthylation héritées des parents tout en maintenant intacts les gènes d'empreinte (Howlett et Reik, 1991; Rougier et al., 1998). L'embryon établit ensuite son propre patron de méthylation de l'ADN juste avant la gastrulation, au cours d'une phase de re-méthylation *de novo*. Ces cycles de déméthylation suivis d'une re-méthylation sont ainsi importants pour déterminer les profils somatiques de méthylation de l'ADN.

Chez les mammifères, certains gènes sont soumis à l'empreinte génomique parentale et sont exprimés de façon mono-allélique uniquement à partir de l'allèle maternel ou paternel. Ces gènes, dont le nombre est actuellement estimé à 75 (Murphy et Jirtle, 2003), possèdent un allèle maintenu inactif et silencieux par un taux de méthylation élevé au niveau de sa séquence d'ADN (pour revues, Bestor, 2003; Paoloni-Giacobino, 2007). D'autre part, au cours de l'embryogenèse précoce, l'un des deux chromosomes X est inactivé de façon irréversible chez la femelle par une méthylation importante au niveau des îlots CpG, de façon à obtenir un dosage-génique identique entre mâle et femelle (pour revue, Heard, 2004).

La méthylation de l'ADN joue également un rôle important de protection contre les parasites intra-génomiques tels que les rétrovirus endogènes et les rétrotransposons; les transgènes sont en effet rendus inactifs par une méthylation importante au niveau de leur région promotrice (Walsh et al., 1998; Mutskov et Felsenfeld, 2004).

b) Les modifications des histones

Les histones de la particule cœur des nucléosomes sont la cible d'une multitude de modifications post-traductionnelles qui contrôlent une grande variété de processus physiologiques. Ces modifications sont localisées principalement sur les régions aminoterminales flexibles des histones mais peuvent également se retrouver dans certains cas sur le domaine « histone-fold » central et les régions carboxy-terminales (Hyland et al., 2005).

i. Les différents types de modifications des histones et leur effet sur la transcription

A l'heure actuelle, neuf types de modifications covalentes distinctes ont été identifiées et répertoriées au niveau de résidus spécifiques des histones : l'acétylation (ac), la méthylation (me), l'ubiquitination (ub), la SUMOylation (su) et la biotinylation (bio) des résidus lysines (K); la méthylation, la citrullination (cit) et l'ADP-ribosylation (ar) des résidus lysines (K); la méthylation, la citrullination (cit) et l'ADP-ribosylation (ar) des résidus arginines (R); l'ADP-ribosylation de l'acide glutamique (E); la phosphorylation (ph) des résidus sérines (S) et thréonine (T) et la cis-trans isomérisation (iso) des prolines (P) (pour revues, Kouzarides, 2007; Latham et Dent, 2007) (**figure 7**). De plus, des approches récentes utilisant la technique de spectrométrie de masse ne cessent d'accroître l'identification de nouvelles modifications (Garcia et al., 2007). Les résidus lysines et arginines sont d'un intérêt particulier car ils peuvent être sujets à différents types de modifications et de plus de méthylation, ce qui augmente d'autant plus les possibilités de combinaisons pouvant conduire à une réponse biologique spécifique (Strahl et Alis, 2000; Turner, 2000).

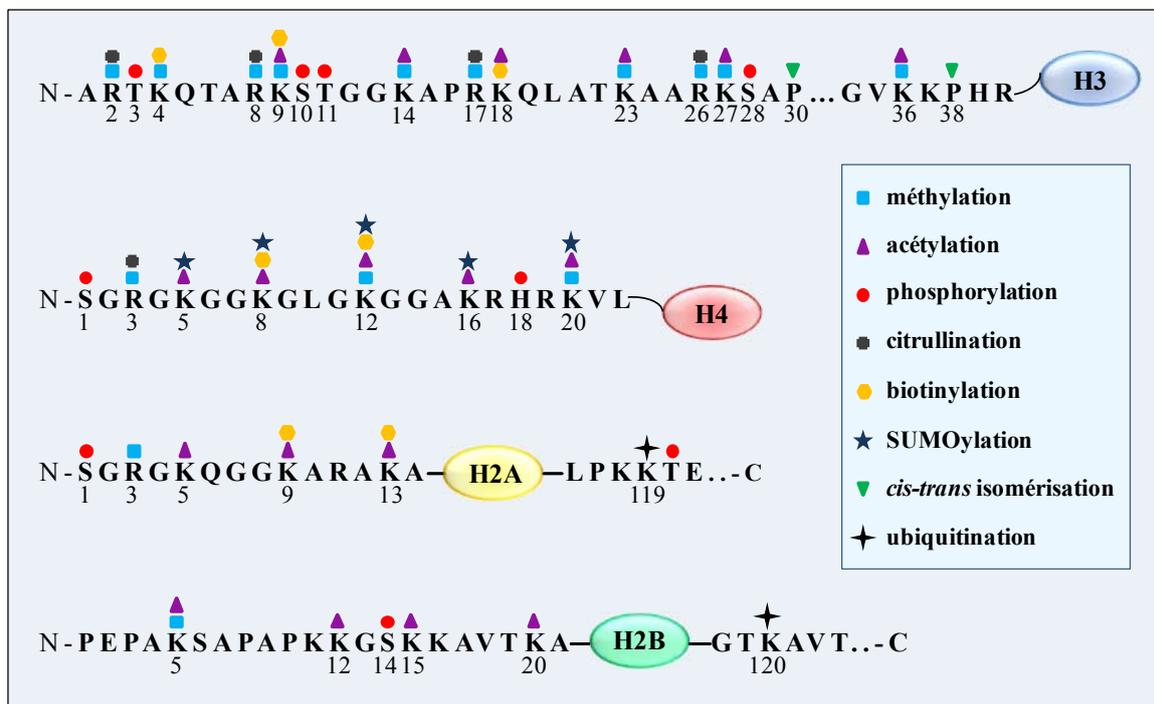


Figure 7 : Les principales modifications post-traductionnelles connues des histones.

Toutes les modifications sont trouvées chez les mammifères sauf l'isomérisation des prolines sur H3 et la SUMOylation sur H4 qui sont trouvées chez *S. cerevisiae*. Les modifications sont mutuellement exclusives sur un même résidu.

Le développement récent de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Orlando et Paro, 1993) a permis d'étudier la dynamique de ces modifications dans le

génomique. Il a ainsi pu être mis en évidence que ces modifications peuvent être associées aussi bien à l'activation qu'à la répression de l'expression de gènes, définissant des états spécifiques de la chromatine qui donnent lieu à des réponses biologiques variées (prolifération cellulaire, différenciation cellulaire) (Kouzarides, 2007; Latham et Dent, 2007).

L'acétylation des histones

L'acétylation des histones au niveau des résidus lysines est associée d'une façon générale à la formation d'une structure chromatinienne plus relâchée qui favorise l'activation de la transcription (Allfrey et al., 1964, Hebbes et al., 1988) en facilitant notamment l'accès des facteurs de transcription au niveau de leurs séquences régulatrices cibles (Lee et al., 1993). Des analyses globales à l'échelle du génome, réalisées à la fois chez la drosophile, la souris et l'homme, en utilisant la technique de ChIP et de DNA microarray, ont montré que cette modification est particulièrement enrichie au niveau des régions promotrices et de séquences codantes des gènes (Schübeler et al., 2004; Bernstein et al., 2005) (**figure 8**). Cette modification joue un rôle important dans la progression du cycle cellulaire, la recombinaison et la réparation de l'ADN ainsi qu'au cours de l'apoptose et du développement (pour revue, Carrozza et al., 2003). L'acétylation de la lysine 56 de l'histone H3 est par exemple impliquée dans la réparation, la préservation de la stabilité du génome ainsi que dans la réplication de l'ADN (Maas et al., 2006; Han et al., 2007). D'autre part, il a été montré que l'acétylation de la lysine 8 de l'histone H4 (acH4K8) intervient dans la réplication et l'initiation de la phase S du cycle cellulaire (Doyon et al., 2006), et que l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 (acH4K16) joue un rôle au cours du cycle cellulaire dans la décondensation de la chromatine (Shogren-Knaak et al., 2006) (**tableau 3**).

La méthylation des histones

La méthylation des histones joue un rôle plus complexe car elle est souvent associée à une répression de la transcription (méthylation de K9 et K27 de l'histone H3 et de K20 de l'histone H4) (pour revue, Martin et Zang, 2005), mais peut également être associée à un état transcriptionnellement actif de la chromatine (méthylation de K4, K36, K79, R2, R17 et R23 de l'histone H3 et de R3 de l'histone H4) (pour revues, Jenuwein et Allis, 2001; Lacoste et Cote, 2003). La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par des histones méthyltransférases favorise en général la formation d'une structure chromatinienne condensée, donc inactive, en stimulant par exemple l'activité des ADN méthyltransférases (Smallwood et al., 2007). Mais

la di- et triméthylation de H3K9 a également été observée au niveau de gènes activement transcrits dans des cellules de mammifères (Vakoc et al., 2005), suggérant ainsi que l'effet de cette modification peut dépendre de sa position sur le gène (région promotrice ou codante) ou de son association avec une autre modification.

Les marques de diméthylation de H3K9, triméthylation de H3K27 et triméthylation de H4K20 sont retrouvées au niveau des gènes soumis à l'empreinte parentale (Fournier et al., 2002; Delaval et al., 2007) et servent au maintien de l'inactivation du chromosome X (Fang et al., 2004). La méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 est également impliquée dans la progression du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Martin et Zang, 2005) (**tableau 3**).

Les études génomiques ont montré une évolution du degré de méthylation de H3K4 le long de la phase codante des gènes : triméthylation au niveau du TSS, diméthylation dans la région transcrite et monométhylation à la fin de la phase codante, suggérant un rôle de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 dans l'activation de la transcription (**figure 8**).

La méthylation des arginines est, quant à elle, retrouvée principalement au niveau des gènes activement transcrits (pour revue, Lee et al., 2005). Cette modification peut apparaître de façon transitoire et cyclique au cours de l'activation transcriptionnelle induite par les récepteurs aux œstrogènes (Métivier et al., 2003).

La phosphorylation des histones

La phosphorylation des histones est importante pour l'activation de la transcription, la réparation, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. L'une des modifications la mieux caractérisée est la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3, qui est associée à une activation de la transcription aussi bien chez la levure que chez les mammifères (Chadee et al., 1999; Nowak et Corces, 2000; Lo et al., 2001). Cette phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 par la kinase Aurora B est aussi corrélée à la condensation de la chromatine au cours de la mitose (Cheung et al., 2000; Fischle et al., 2005). C'est aussi le cas pour la phosphorylation de la sérine 28 de l'histone H3 (Hans et Dimitrov, 2001) et de la thréonine 3 de l'histone H3 qui est nécessaire pour l'alignement des chromosomes en métaphase (Dai et al., 2005). La phosphorylation de la thréonine 11 de l'histone H3 est également associée à une activation de la transcription en étant induite au cours de l'activation des gènes dépendants des récepteurs aux androgènes (Metzger et al., 2008). Cette modification intervient aussi au cours de la réparation, car la thréonine 11 est déphosphorylée au niveau des dommages de l'ADN (Shimada et al., 2008). La phosphorylation est enfin aussi impliquée dans l'apoptose

car la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H2B chez la levure et de la sérine 14 de l'histone H2B chez les mammifères est par exemple importante pour l'induction de ce processus (Cheung et al., 2003; Ahn et al., 2006).

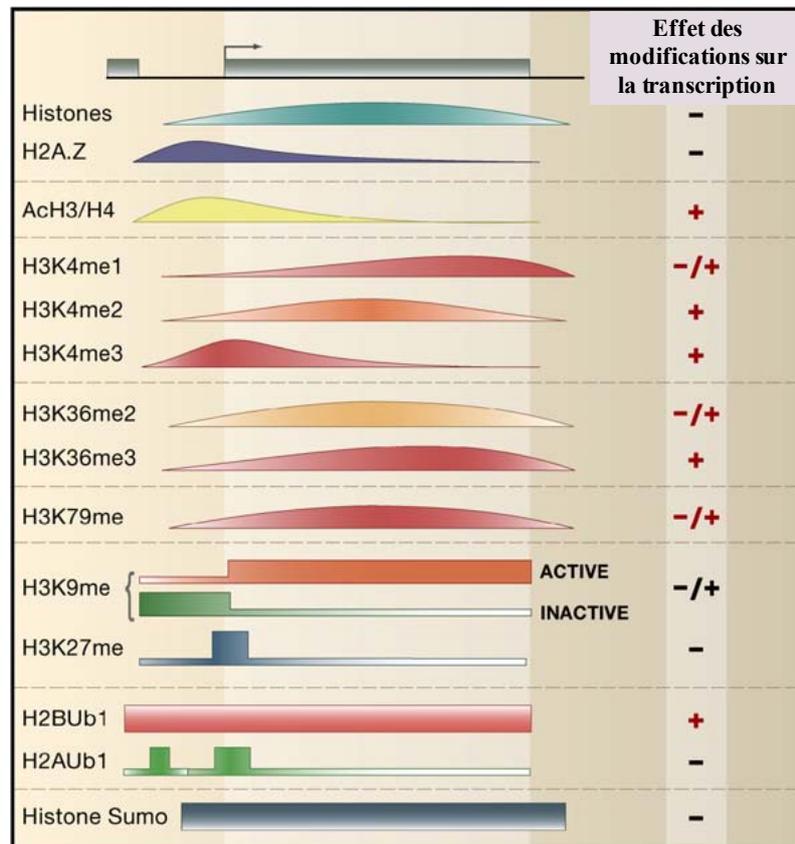


Figure 8 : Distribution des modifications des histones le long des gènes et leurs rôles dans l'activation ou la répression de la transcription.

La distribution des modifications des histones à l'échelle du génome est représentée le long d'un gène arbitraire par rapport à la région promotrice (région intergénique en 5'), la région transcrite et la région intergénique en 3'. Pour les modifications représentées par des rectangles, les données sont basées sur un nombre limité d'études (d'après Li et al., 2007a).

L'ubiquitination des histones

L'ubiquitination des histones intervient principalement au cours de la transcription, de la réparation et de la condensation de la chromatine (**tableau 3**). Au niveau de la transcription, cette modification peut jouer un rôle bivalent. Ainsi, l'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A chez l'homme est associée à une répression de la transcription (Wang et al., 2006) et à une inhibition de la phase d'élongation par l'ARN pol II (Zhou et al., 2008), alors que l'ubiquitination de la lysine 120 de l'histone H2B chez l'homme et la levure

est associée à une activation de la transcription (Zhu et al., 2005). Lors de la réparation, l'ubiquitination est aussi induite sur les histones H3 et H4 au niveau des dommages de l'ADN causés par les UV et constitue un signal pour le recrutement de la protéine de réparation XPC (Wang et al., 2006).

Modifications covalentes	Résidus modifiés	Rôle dans la transcription	Fonctions régulées
Acétylation Lysine (K)	H3 (9, 14, 18, 23)	Activation	Transcription, Réparation, Réplication, Condensation
	H4 (5, 8, 13, 16)	Activation	
	H2A, H2B	Activation	
Phosphorylation Sérine/Thréonine (pH S/T)	H3 (3, 10, 11, 28)	Activation	Transcription, Réparation, Condensation
	H2A, H2B	Activation	
Méthylation Arginine (R)	H3 (2, 17, 23)	Activation	Transcription
	H4 (3)	Activation	
Méthylation Lysine (K)	H3 (4, 36, 79)	Activation	Transcription, Réparation,
	H3 (9, 27)	Répression	
	H4 (20)	Répression	
Ubiquitination Lysine (K)	H2A (119)	Répression	Transcription, Réparation, Condensation
	H2B (120)	Activation	
ADP-ribosylation Ac. Glut/Arginine (E/R)	H1	Activation	Transcription, Réparation, Réplication,
	H2B	Activation	
Sumoylation Lysine (K)	H2A (126)	Répression	Transcription
	H2B (6, 7)	Répression	
Citrullination Arginine (R)	H3, H4	Répression	Transcription
Biotinylation Lysine (K)	H3, H4, H2A	Répression	Transcription, Réparation, Condensation
Isomérisation Proline (P)	H3 (30-38)	Activation/ Répression	Transcription

Tableau 3 : Les différents types de modifications covalentes des histones et leur(s) principale(s) fonction(s) associée(s). (d'après Kouzarides, 2007).

L'ADP-ribosylation

Cette modification consiste en un transfert d'un ou de plusieurs groupements ADP-riboses sur des substrats protéiques, réalisé respectivement par des enzymes à activité mono-ADP-ribosyltransférases (MART) ou poly-ADP-ribosyltransférases (PARP). Ils peuvent être éliminés par l'enzyme poly(ADP-ribose) glycohydrolase (Boulikas, 1990; et pour revue,

Hassa et al., 2006). L'ADP-ribosylation est retrouvée principalement sur les résidus acides glutamiques (E) des histones H1 et H2B ou encore sur l'arginine R33 de l'histone H1 (Hassa et al., 2006) et elle est souvent associée à une activation de la transcription. Mais l'ADP-ribosylation des histones semble aussi être importante lors de la réplication, la réparation, la recombinaison ainsi qu'au cours de l'apoptose (Hassa et al., 2006).

Les autres modifications des histones

D'autres modifications post-traductionnelles des histones ont été caractérisées et jouent un rôle au cours de la transcription :

-La SUMOylation des lysines peut avoir lieu sur les quatre histones de la particule cœur et consiste en l'ajout d'un groupement d'environ 12 kDa, la protéine SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*), par une enzyme à activité SUMO-ligase (Nathan et al., 2006). Cette modification est impliquée dans la répression transcriptionnelle chez l'homme et la formation d'une structure condensée de la chromatine chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, en exerçant un effet antagoniste sur l'acétylation ou l'ubiquitination du même résidu lysine modifié (Shiio et Eisenman, 2003; Shin et al., 2005).

-La biotinylation des lysines peut avoir lieu sur les histones H3, H4, et H2B; elle consiste en l'addition d'un groupement biotine, connu aussi sous le nom de vitamine H ou vitamine B₇, par des enzymes appelées biotinidases (pour revue, Hassan et Zemleni, 2006). Cette modification est associée à une répression transcriptionnelle, car la biotinylation de la lysine 12 de l'histone H4 par exemple s'oppose à l'acétylation du même résidu et est enrichie au niveau de structures chromatiniennes condensées inactives (Camporeale et al., 2007).

-La citrullination est une réaction de déimination qui convertit des arginines en citrullines au niveau des histones H3 et H4, réalisée par la peptidyl arginine deiminase 4 (PADI4) chez l'homme (Cuthbert et al., 2004). Cette modification a un effet antagoniste à la méthylation des arginines et est ainsi associée à une répression de la transcription (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004).

-L'isomérisation des prolines est un changement de conformation des prolines de la forme *cis* à la forme *trans* et *vice versa*, qui crée une distorsion sévère de la chaîne polypeptidique. Chez la levure *S. cerevisiae*, l'isomérisation de la proline 38 de l'histone H3 provoque par exemple un changement de conformation du résidu adjacent et une inhibition de la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (Nelson et al., 2006). Cette modification des

prolines régule ainsi la transcription et le degré de compaction de la chromatine en modulant les interactions ADN-histones et le niveau de méthylation de la lysine 36 de l'histone H3.

ii. L'interdépendance des modifications des histones

L'étude des modifications post-traductionnelles des histones a permis d'établir de façon claire que le type de modification, la nature et la position du résidu modifié ainsi que le degré de modification (mono-, di- ou tri- méthylé par exemple) jouent un rôle fondamental sur la transcription et le degré de compaction de la chromatine. De plus, des approches par spectrométrie de masse ont montré que plusieurs modifications spécifiques peuvent apparaître de façon simultanée, permettant d'envisager plusieurs milliers de combinaisons pour une même protéine histone (Cheung et al., 2000b; Zhang et al., 2002). De nombreuses études suggèrent ainsi que les modifications des histones peuvent s'influencer entre elles positivement ou négativement ou « dialoguer » avec d'autres modifications, soit en *cis* sur la même histone, ou en *trans* avec des modifications présentes sur une autre histone (pour revues, Margueron et al., 2005; Latham et Dent, 2007).

Exemples de régulation en cis

L'exclusion mutuelle de deux modifications différentes sur un même acide aminé tel que la méthylation et l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 est un cas d'influence négative bien connu (Turner, 2005). Un autre exemple de régulation en *cis* bien caractérisé concerne la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3; elle favorise l'acétylation de la lysine 14 de l'histone H3 au niveau de régions promotrices spécifiques aussi bien chez la levure que chez les mammifères (Cheung et al., 2000b; Lo et al., 2000) et inhibe la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Fischle et al., 2005). La triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3, associée à la répression transcriptionnelle et la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3, associée à l'activation, sont également deux marques mutuellement exclusives (Nishioka et al., 2002; Vakoc et al., 2005) (**figure 9**). De nombreuses régulations en *cis* sont aussi observées au niveau de l'histone H4 : par exemple la triméthylation de la lysine 20 qui a un effet antagoniste sur l'acétylation de l'histone H4 et, vice versa, l'hyperacétylation de l'histone H4 qui empêche la triméthylation de la lysine 20 (Nishioka et al., 2002; Sarg et al., 2004).

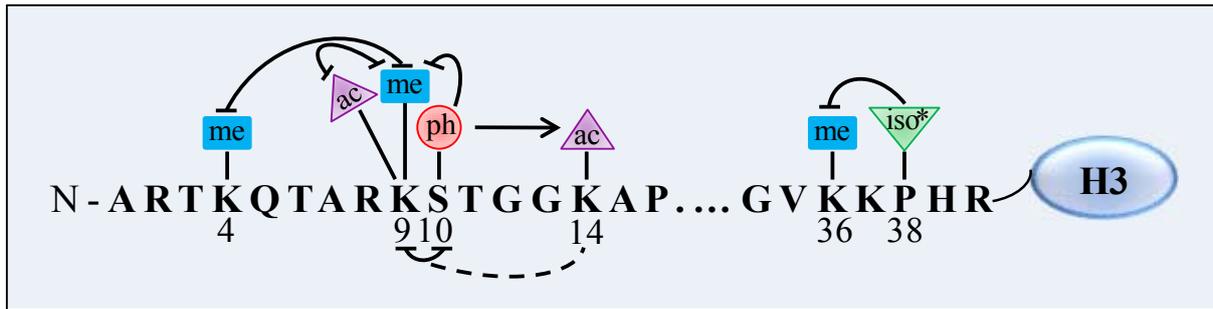


Figure 9 : Exemples d'interdépendances des modifications des histones en *cis*.

L'astérisque indique que la modification a lieu chez *S. cerevisiae*.

✚ Exemples de régulation en *trans*

Plusieurs études ont également montré que des modifications présentes sur une histone peuvent exercer un effet sur des modifications présentes sur une autre histone. L'exemple le mieux caractérisé est celui de la mono-ubiquitination de la lysine 123 de l'histone H2B chez la levure, qui est requise pour la méthylation des lysines 4 et 79 de l'histone H3 au cours de l'activation de la transcription (Ng et al., 2002; Sun et Allis, 2002). Cette régulation en *trans* est aussi conservée chez l'homme (mono-ubiquitination de la lysine 120 de l'histone H2B) (pour revues, Shilatifard, 2006; Latham et Dent, 2007). D'autres études permettent également d'envisager un lien fonctionnel entre la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et la méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 pour organiser la structure condensée de la chromatine (Sims et al., 2006) (**figure 10**).

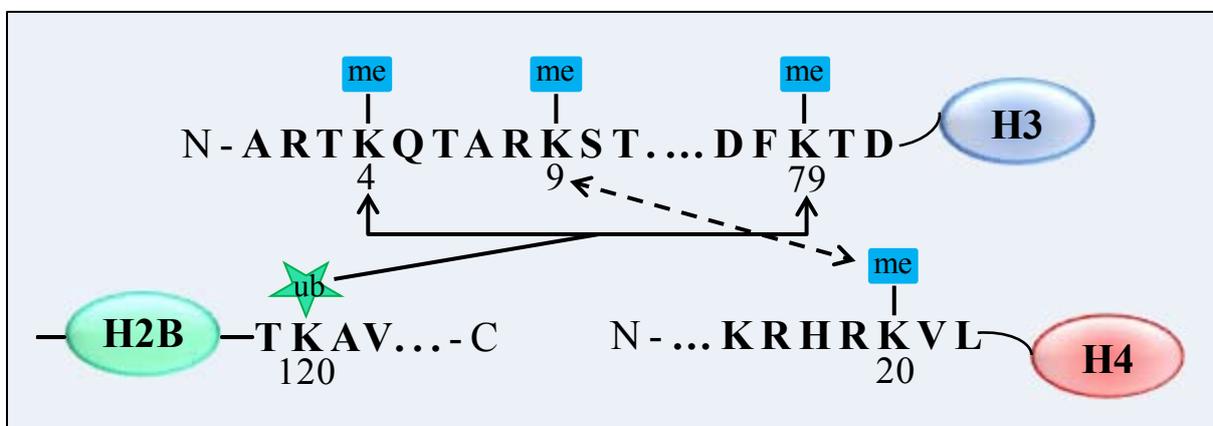


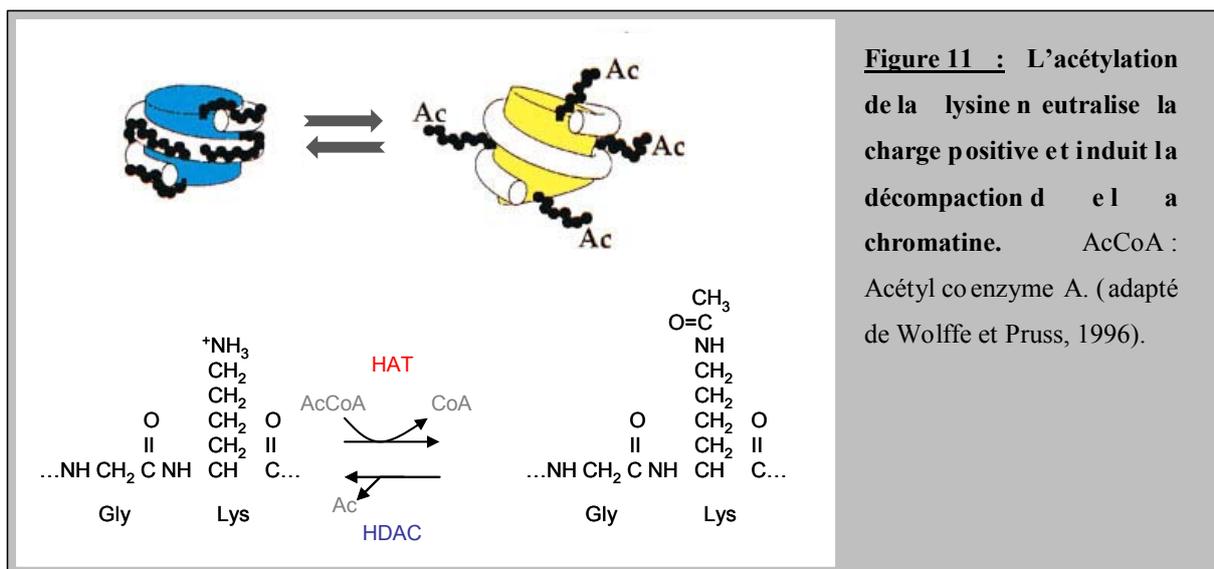
Figure 10 : Exemples d'interdépendances des modifications des histones en *trans*.

c) Les enzymes de modification des histones

De nombreux enzymes, capables de mettre en place ou d'enlever des modifications des histones au niveau de sites spécifiques, sont actuellement bien caractérisées. Nous porterons notre attention plus particulièrement sur les enzymes qui régulent les niveaux d'acétylation et de méthylation des histones. Ainsi les groupements acétyles sont greffés par des Histones AcétylTransférases (HAT) et éliminés par des Histones DéAcétylases (HDAC) alors que les groupements méthyles sont mis en place par des Histones MéthylTransférases (HMT) et éliminés par des Histones Déméthylases (HDM).

i. Les histones acétyltransférases (HAT)

Les HAT catalysent le transfert d'un groupement acétyle ($\text{CH}_3\text{-CO-}$) à partir d'un cofacteur, l'acétyl-coenzyme A (*Acétyl-CoA*); ceci se fait au niveau des régions ϵ -amines de résidus lysines spécifiques (Roth et al., 2001). L'acétylation a pour effet d'enlever une charge positive des lysines, ce qui diminue l'affinité des histones pour l'ADN chargé négativement (Wolffe et Pruss, 1996). La chromatine adopte alors une structure plus relâchée qui facilite l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription (**figure 11**).



Les HAT ont été regroupées phylogénétiquement en plusieurs classes qui diffèrent beaucoup en séquence et présentent des affinités distinctes pour des lysines spécifiques (pour revues, Marmorstein, 2001; Berndsen et Denu, 2008). On retrouve ainsi trois familles principales : la famille GNAT/PCAF (*Gcn5-N-Acetyltransferase-related*), la famille MYST

(*MOZ*, *Ybf2/Sas3*, *Sas2*, *Tip60*) et la famille p300/CBP (*CREB Binding Protein*) (Sterner et Berger, 2000; Allis et al., 2007; Hodawadekar et Marmorstein, 2007) (**Tableau 4**).

Les protéines de la famille GNAT/PCAF sont des coactivateurs, qui possèdent plusieurs domaines fonctionnels dont un domaine HAT bien conservé et un bromodomaine qui reconnaît spécifiquement les lysines acétylées (Dhalluin et al., 1999; Ornaghi et al., 1999).

La famille MYST est plus grande que la famille GNAT et plus diverse. La plupart des protéines de cette famille possèdent en effet un chromodomaine, mais d'autres membres sont caractérisés par la présence d'un domaine PHD (*Plant HomeoDomain*) ou encore par la présence de motifs en doigt de zinc (pour revue, Yang, 2004). Les membres de cette famille interviennent dans une grande variété de fonctions biologiques telles que l'extinction-génique (Reifnyder et al., 1996), la régulation du cycle cellulaire chez la levure (Clarke et al., 1999), la régulation de la transcription et la réparation de l'ADN (pour revue, Utley et Cote, 2003), ou encore le développement de certains cancers tels que la leucémie myéloïde chez l'homme (Borrow et al., 1996).

Les protéines de la famille p300/CBP sont des régulateurs plus globaux de la transcription, capables d'acétyler aussi bien des protéines histones que non-histones; ces protéines contiennent un domaine HAT, un bromodomaine et trois motifs riches en cystéines et histidines leur permettant d'interagir avec d'autres protéines.

Famille	Enzyme	Organisme	Complexes protéiques associés	Substrat	Fonction
GNAT/ PCAF	Gcn5	De <i>S. cerevisiae</i> à l'homme	SAGA, ATAC, TFTC	H3-K9, 14, 18, 36 H2B	Coactivateur
	PCAF	Homme	STAGA	H3-K14	Coactivateur
MYST	Esa1/Tip60	<i>S. cerevisiae</i> / Homme	NuA4, Piccolo NuA4	H4-K5, 8, 12, 16	Coactivateur, réparation de l'ADN, cycle cellulaire
	Sas2/MOF	<i>S. cerevisiae</i> / Homme	SAS	H4-K16	Répression/ Compensation de dosage
	Sas3	<i>S. cerevisiae</i>	NuA3	H3-K14, 23	Répression
	MOZ	Homme	MOZ	H3-K14	Coactivateur
	HBO1	Homme	HBO1	H3/H4	Réplication de l'ADN
CBP/ p300	CBP, p300, Rtt109	Du ver à l'homme	nombreux	H2A/H2B/H3/H4, Autres protéines non-histones	Coactivateur, réplication et réparation de l'ADN

Tableau 4 : Les fonctions et spécificités de substrats de différentes familles de HAT. (pour revues, Marmorstein, 2001; Berndsen et Denu, 2008).

ii. Les histones déacétylases (HDAC)

Les HDAC interviennent essentiellement dans la répression transcriptionnelle et peuvent être classifiées chez les mammifères en quatre familles, qui diffèrent par leurs structures, leurs fonctions enzymatiques, leur localisation subcellulaire et leurs profils d'expression (pour revues, Haberland et al., 2009; Witt et al., 2009).

La classe I contient des enzymes (HDAC1, 2, 3 et 8) qui sont exprimées de façon ubiquitaire et qui ont une localisation presque exclusivement nucléaire. Les HDAC1 et HDAC2 de cette famille sont les mieux caractérisées. Ils exercent souvent leur activité au sein de complexes répresseurs multiprotéiques tels que les complexes Sin3, Mi2/NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylating*), CoREST (*CoREpressor element Transcription factor*) et PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) (Yang et Seto, 2003). HDAC3 quant à elle est retrouvée au sein des complexes répresseurs SMRT (*Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone receptors*) et N-CoR1 (*Nuclear receptor CoRepressor 1*).

La classe II contient les enzymes apparentées à la protéine HDA1 de levure (HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10) et sont localisées aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau. Ces enzymes ont souvent des profils d'expression assez restreints (dans le muscle, le cœur, le cerveau par exemple), suggérant qu'elles exercent des rôles plus spécifiques au cours de la différenciation cellulaire et du développement (Buggy et al., 2000; Galasinski et al., 2002).

La classe III a été découverte plus récemment et contient les homologues de la protéine Sir2 de la levure. Les enzymes de cette classe ont la particularité de nécessiter du NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) comme coenzyme pour déacétyler les histones (Imai et al., 2000). Chez l'homme, on retrouve actuellement sept protéines Sir2 encore appelées SIRTuines (SIRT1 à SIRT7) qui jouent un rôle dans divers phénomènes tels que la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, le métabolisme, la tumorigénèse ou encore le vieillissement (pour revue, Yamamoto et al., 2007).

La classe IV comprend actuellement un seul membre, l'histone déacétylase HDAC11 qui présente certaines homologues avec les enzymes de la classe I et II, mais sa fonction n'est pas encore bien déterminée (Liu et al., 2008).

iii. Les histones méthyltransférases (HMT)

Les HMT sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupement méthyle (-CH₃), à partir d'une molécule donneuse, le cofacteur SAM (*S-Adenosyl-Methionine* ou *AdoMet*), vers un résidu lysine ou arginine. Les arginines peuvent être mono- et di-méthylées par des PRMT (*Protein arginine MethylTransferase*) alors que les lysines peuvent être mono, di-, et tri-méthylées par des protéines contenant un domaine SET (*Su(var)3-9*, *Enhancer of zest*, *Trithorax*) ainsi que par la protéine Dot1L (*Disrupter Of Telomere silencing protein 1-Like*) (pour revue, Zhang et Reinberg, 2001) (**figure 12**).

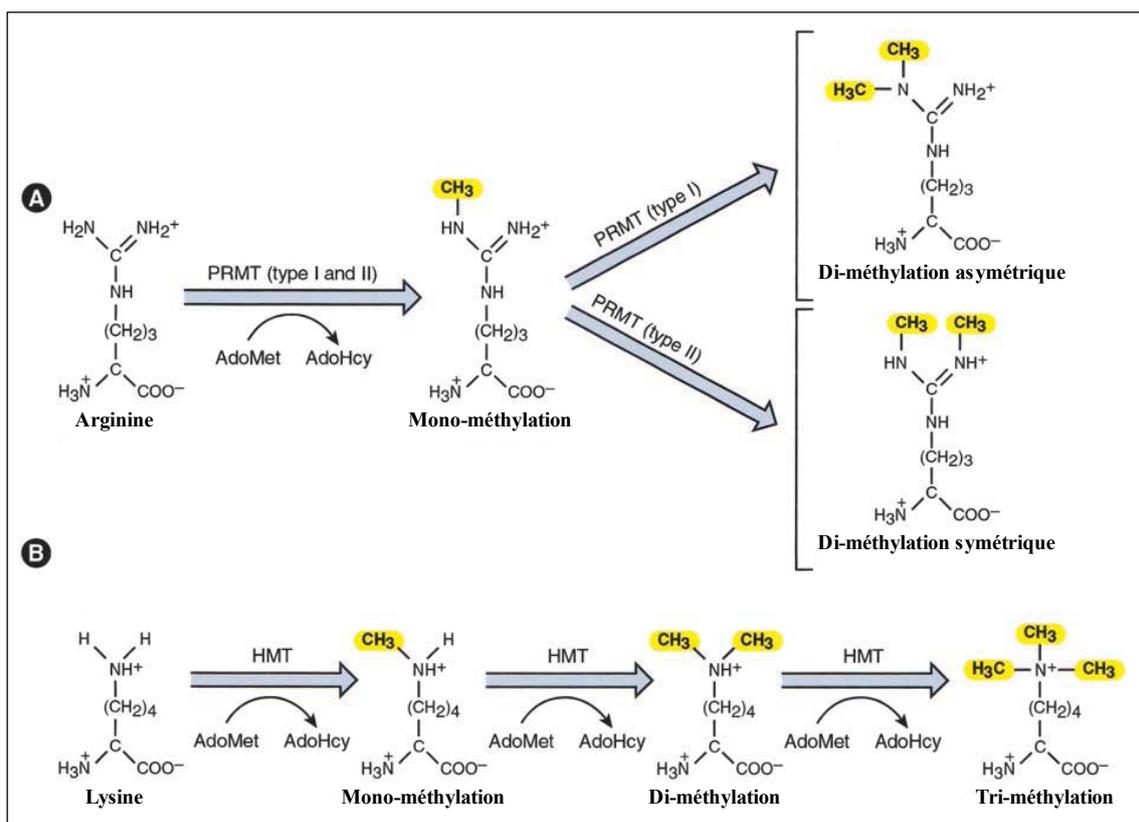


Figure 12 : La méthylation des arginines par les PRMT de type I et II (A) et les niveaux de méthylation des lysines (B). (d'après Zhang et Reinberg, 2001).

Les HMT spécifiques des lysines ont été classées en plusieurs familles en fonction de similarités de séquences à l'intérieur du domaine SET et de leurs propriétés structurales (pour revue, Völkel et Angrand, 2007). Ces protéines ont souvent des spécificités de substrat bien déterminées et sont impliquées généralement dans la régulation transcriptionnelle ou dans la réponse aux dommages de l'ADN (pour revues, Margueron et al., 2005; Martin et Zhang,

2005). Les enzymes impliquées dans la méthylation des lysines 4, 36 et 79 de l’histone H3 (associées à l’activation transcriptionnelle), ainsi que celles impliquées dans la méthylation des lysines 9 et 27 de l’histone H3 et de la lysine 20 de l’histone H4 (associées à la répression transcriptionnelle) sont actuellement les mieux caractérisées (Lachner et Jenuwein, 2002). On peut citer par exemple les protéines à domaine SET de la famille SUV39 (SUV39H1/2, G9a, EUMT1, SETDB1/2 (*SET Domain Bifurcated 1/2*) et SETMAR (*SET domain and MARiner transposase fusion gene-containing protein*) qui ciblent spécifiquement la lysine 9 de l’histone H3, excepté G9a qui parvient aussi à méthyler la lysine 27 de l’histone H3 in vitro (Tachibana et al., 2001). On connaît aussi les protéines de la famille EZH (*Enhancer of Zest Homologues*), EZH1 et EZH2 qui répriment la transcription en ciblant spécifiquement la lysine 27 de l’histone H3 (Kuzmichev et al., 2004), tout comme les protéines SUV4-H20 qui ciblent la lysine 20 de l’histone H4 (Schotta et al., 2004). La protéine Dot1L, dépourvue de domaine SET, permet par contre une activation de la transcription en méthylant spécifiquement la lysine 79 de l’histone H3 (Feng et al., 2002) (**tableau 5**).

Substrat	Histone lysine méthyltransférases (HMT)			Fonctions associées
	S. cerevisiae	Drosophile	Homme	
H3K4	Set1	Trithorax, ASH1	SET1, MLL, SET7/SET9, ASH1L, SMYD3, PRDM9, SETMAR	Activation transcriptionnelle
H3K9	Clr4	Su(var)3-9, ASH1	SUV39H1/2, EHMT1/2, SETDB1, ASH1L, ESET, G9a, GLP, RIZ,	Répression transcriptionnelle, formation de l’hétérochromatine, inactivation du chromosome X
H3K27		E(Z)	EZH1/2, EHMT2	Répression, inactivation du chromosome X
H3K36	Set2		NSD1, SETD2/HYPB, SETMAR	Elongation de la transcription
H3K79	Dot1		DOT1L	Activation transcriptionnelle
H4K20	Set9	Su(var)4-20, ASH1	SUV4-20H1/2, SET8, NSD1, ASH1L	Répression, formation de l’hétérochromatine

Tableau 5 : Exemples d’histone-lysine-méthyltransférases avec leurs spécificités de substrats et quelques fonctions associées. (pour revues, Martin et Zhang, 2005; Völkel et Angrand, 2007).

Les protéines PRMT capables de méthyler les résidus arginines sont conservées de la levure à l’homme et actuellement onze PRMT ont été caractérisées chez l’homme (PRMT1 à 11) dont sept capables de méthyler les histones : PRMT1, PRMT4/CARM1 (*Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1*), PRMT5/JPB1 (*Janus Kinase-Binding protein-1*), PRMT6, PRMT7, PRMT8 et PRMT9 (pour revue, Pal et Sif, 2007). Ces enzymes ont été regroupées en deux classes distinctes : la classe I qui catalyse la monométhylation et la

diméthylation asymétrique des arginines et la classe II qui catalyse la monométhylation et la diméthylation symétrique des arginines (Gary et Clarke, 1998; McBride et Silver, 2001) (**figure 12**). Ces protéines ont des spécificités de substrats bien définies et sont souvent impliquées dans l'activation ou la répression de la transcription, mais peuvent également jouer un rôle au cours de la différenciation, du développement et de la réparation de l'ADN ainsi qu'au cours de la tumorigénèse (Pal et Sif, 2007) (**tableau 6**).

PRMT	Classe	Spécificité de substrat	Fonctions associées
PRMT1	I	H4-R3	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN
PRMT4/CARM1	I	H3-R2, R17, R26, R128, R129, R131, R134	Activation transcriptionnelle, différenciation, développement, tumorigénèse
PRMT5/JPB1	II	H3-R8, H4-R3	Répression transcriptionnelle
PRMT6	I	H3-R2	Répression transcriptionnelle, réparation de l'ADN
PRMT7	II	H2A, H4-R3	Empreinte parentale dans les cellules germinales mâles
PRMT8	I	H4	Indéterminées
PRMT9	II	H2A, H4	Indéterminées

Tableau 6 : Les histone-arginine-méthyltransférases humaines avec leurs spécificités de substrats et quelques fonctions associées. (pour revue, Pal et Sif, 2007).

iv. Les histones déméthylases (HDM)

La méthylation des histones est une modification réversible qui peut être enlevée par plusieurs familles de protéines découvertes récemment (pour revues, Völkel et Angrand, 2007; Lan et al., 2008) (**Tableau 7**). La première déméthylase identifiée a été la protéine LSD1 (*Lysine Specific Demethylase 1*) qui déméthyle spécifiquement les lysines 4 et 9 de l'histone H3 lorsqu'elles sont mono- ou di-méthylées; elle le fait par une réaction d'oxydation qui nécessite de la flavine comme cofacteur (Shi et al., 2004). Une grande famille de déméthylases, la famille KDM (*Lysine (K) DeMethylase*), contenant le domaine *Jumonji C* (JmjC) a ensuite été caractérisée; elles sont capables d'enlever les trois états de méthylation (mono-, di- et tri-méthylation) des lysines à travers une réaction d'oxydation qui nécessite du fer Fe(II) et de l' α -cétoglutarate (α KG) comme cofacteur (Tsukada et al., 2006). Les arginines mono-méthylées quant à elles, peuvent être converties en citrulline par l'enzyme

PADI4 (*PeptidylArginine Deiminase 4*) (Wang et al., 2004) mais il a aussi été découvert récemment qu'elles peuvent être déméthylées par l'enzyme JMJD6 contenant le domaine JmjC (Chang et al., 2007) (**figure 13**).

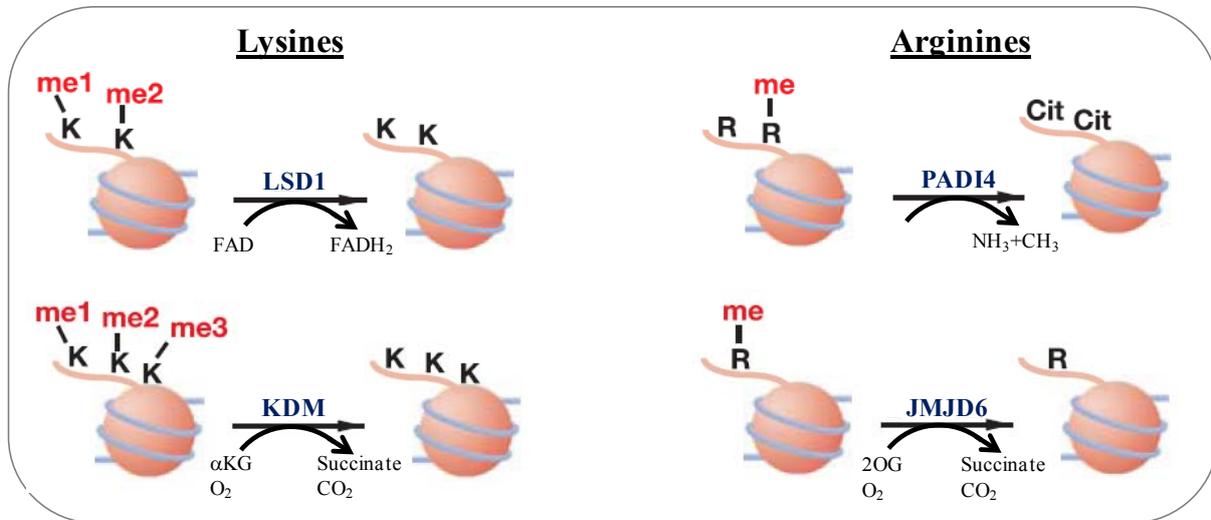


Figure 13 : La déméthylation de s lysines et A rginines. (K : L ysine; R : A rginine; me : mé thyle; C it : citrulline; FAD : Flavine-Adénine Dinucléotide; α KG : α -cétoglutarate; 2OG : 2-oxoglutarate).

Famille	Enzyme	Substrat
PADI	PADI4	H3R2, R8, R17, R26, H4R3
KDM1	LSD1	H3K4me2/1, H3K9me2/1
KDM2	JHDM1A, JHDM1B	H3K36me2/1, H3K4me3
KDM3	JMJD1A, JMJD1B, JMJD1C	H3K9me2/1
KDM4	JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C, JMJD2D	H3K9me2/1, H3K36me3/2
KDM5	JARID1A, JARID1B, JARID1C, JARID1D	H3K4me3/2
KDM6	UTX, UTY, JMJD3	H3K27me3/2
JMJD6	JMJD6	H3R2, H4R3

Tableau 7 : Les familles des déméthylases avec leurs spécificités de substrat.

(pour revues, Klose et Zhang, 2007; Lan et al., 2008).

d) **La reconnaissance des modifications des histones**

Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent remplir leur fonction du fait de leur seule présence sur les histones, mais également grâce à l'intervention de protéines intermédiaires capables de reconnaître et de « lire » les marques épigénétiques présentes sur la chromatine. Ces protéines possèdent des domaines spécifiques capables de reconnaître des modifications bien précises et recrutent d'autres facteurs de régulation de la transcription ou de remodelage de la chromatine, qui vont dicter l'activité transcriptionnelle (pour revues, Featherstone, 2002; Martin et Zhang, 2005; Taverna et al., 2007) (**figure 14**).

Le **bromodomaine** reconnaît les lysines acétylées et il est souvent impliqué dans l'activation transcriptionnelle et le remodelage de la chromatine (Dhalluin et al., 1999). Ce domaine est retrouvé dans de nombreux coactivateurs à activité histone acétyltransférase (HAT), telles que les protéines de la famille GNAT et de la famille CBP/p300 chez l'homme (Zeng et Zhou, 2002), mais aussi dans certains corépresseurs transcriptionnels (par exemple dans les corépresseurs TIF1) et dans certaines histone méthyltransférases (HMT) telles que MLL (*Mixed Lineage Leukemia protein*) chez l'homme (Caldas et al., 1998).

Les **chromodomains** des protéines HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) et de la protéine Polycomb (PC) chez la dr osophile reconnaissent respectivement les lysines 9 et 27 de l'histone H3 lorsqu'elles sont méthylées (de préférence triméthylées) (Nielsen et al., 2001a; Müller et al., 2002). Ces protéines impliquées dans la répression sont capables de recruter d'autres répresseurs travaillant en synergie pour établir une structure chromatinienne compacte (Grewal et Jia, 2007). Chez *S. cerevisiae*, la protéine activatrice CHD1 (*Chromodomain Helicase DNA-binding protein 1*) du complexe SAGA (*Spt-Ada-Gcn5 Acetylase coactivator complex*) reconnaît par contre la lysine 4 méthylée de l'histone H3, associée à l'activation transcriptionnelle grâce à la présence de deux chromodomains (Pray-Grant et al, 2005).

Le **domaine Tudor** est capable de reconnaître les arginines méthylées à la surface des histones (Kim et al., 2006) mais également les lysines méthylées : le domaine Tudor de p53BP1 (*p53 Binding Protein 1*) reconnaît par exemple la lysine 79 méthylée de l'histone H3 chez les mammifères (Huyen et al., 2004) alors que celui de la déméthylase JMJ2A reconnaît la lysine 4 méthylée de l'histone H3 et la lysine 20 de l'histone H4 (Huang et al., 2006).

Les **répétitions WD40** de l'activateur transcriptionnel WDR5 (*WD40 Repeat protein 5*) sont des motifs qui reconnaissent l'arginine 2 et la lysine 4 de l'histone H3 lorsqu'elles sont méthylées (Wysocka et al., 2005; Couture et al., 2006).

Le **domaine en doigt de zinc de type PHD** est un motif de reconnaissance des lysines méthylées. Ce domaine peut aussi bien être impliqué dans l'activation que dans la répression des gènes en reconnaissant essentiellement la lysine 4 tri-méthylée de l'histone H3 mais également les lysines 9 et 36 tri-méthylées de cette même histone (pour revue, Taverna et al., 2007).

Le **domaine 14-3-3** de la famille de protéines 14-3-3 reconnaît spécifiquement la sérine 10 phosphorylée de l'histone H3 (Macdonald et al., 2005). Cette famille de protéines joue un rôle important dans la régulation de la transduction du signal, la condensation des chromosomes ainsi qu'au cours de l'apoptose en reconnaissant les sérines et thréonines phosphorylées grâce à ce domaine 14-3-3 (Dougherty et Morrison, 2004; Seet et al., 2006).

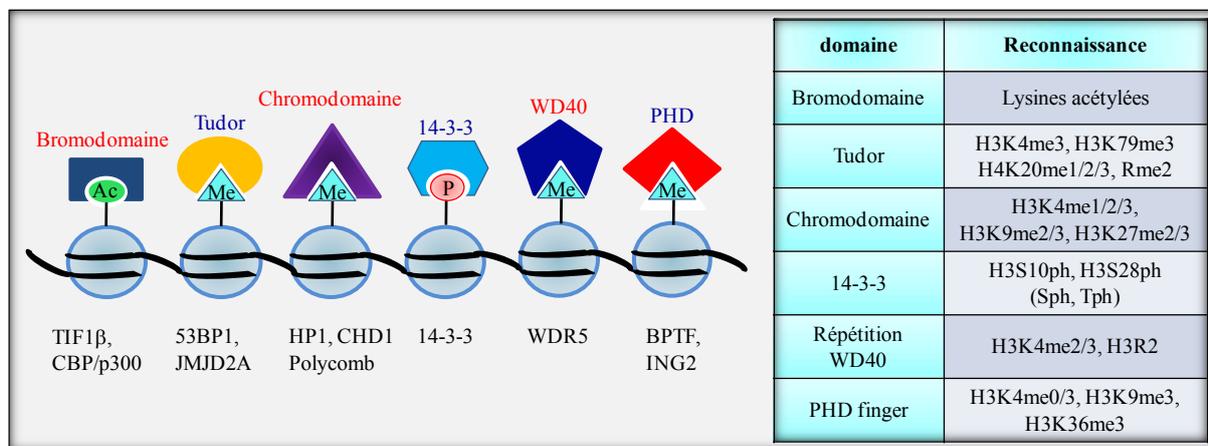


Figure 14 : Existence de domaines protéiques reconnaissant spécifiquement des acides aminés modifiés.

e) Hypothèses sur les mécanismes de régulation de la transcription par les modifications des histones

i. L'hypothèse « électrostatique »

Pendant longtemps, il a été envisagé que les modifications post-traductionnelles des histones régulent l'expression des gènes à travers un mécanisme d'action de type « électrostatique ». Cette hypothèse repose sur l'idée que des modifications de charges au niveau des histones jouent un rôle dans le repliement et la condensation de la fibre

chromatinienne. En effet, l'acétylation des histones par exemple peut réduire les interactions avec les phosphates de l'ADN en neutralisant les charges positives des lysines, de façon à rendre l'ADN plus accessible aux facteurs de transcription (Wade et al., 1997; Hong et al., 1993). La phosphorylation des histones par contre, peut induire une décondensation de la fibre chromatinienne en ajoutant des charges négatives (Roth et Allis, 1992). Mais certaines modifications telles que la méthylation des lysines n'affecte pas leur charge et ne jouent ainsi aucun rôle dans le remodelage de la chromatine. De plus, le rôle de la phosphorylation des histones n'est pas toujours restreint à une « ouverture » de la chromatine; en effet, la phosphorylation des sérines 10 et 28 de l'histone H3 est par exemple impliquée dans la condensation des chromosomes durant la mitose et la méiose (Hendzel et al., 1997; Wei et al., 1999). La modulation de la structure chromatinienne par la multitude des modifications post-traductionnelles semble ainsi faire appel à des mécanismes moléculaires bien plus complexes que de simples neutralisations et/ou changements de charges des histones.

ii. L'hypothèse du code des histones

L'hypothèse du « code des histones » a ensuite été proposée pour expliquer comment une cellule est capable d'assurer une réponse rapide en fonction de différentes conditions environnementales (Turner, 1993; Strahl et Allis, 2000; Jenuein et Allis, 2001). Cette hypothèse stipule que des combinaisons de modifications post-traductionnelles des histones détermineraient des états spécifiques de la chromatine, et serviraient de surface de reconnaissance pour des protéines effectrices spécifiques, afin d'assurer des réponses biologiques distinctes (Henikoff, 2005; Berger, 2007; Kouzarides, 2007). Les nombreuses observations d'interdépendance des modifications en *cis* et en *trans* sont en accord avec ce modèle; il est par exemple possible d'envisager que les phosphorylations des sérines 10 et 28 de l'histone H3 constituent un site de reconnaissance pour un facteur de transcription spécifique impliqué dans la condensation et la ségrégation des chromosomes. De plus, de nombreuses protéines possèdent des domaines spécifiques (bromodomaine, chromodomaine par exemple) qui semblent leur permettre de pouvoir « lire » ce code. Cependant ce modèle a également ses limites car certains sites modifiés, tels que les lysines 4 et 36 de l'histone H3 par exemple, sont reconnus aussi bien par des activateurs que des répresseurs transcriptionnels, qui induisent ainsi des réponses biologiques différentes (Keogh et al., 2005; Shi et al., 2006).

La modulation de la structure de la chromatine est donc un processus plus complexe qu'il n'y paraît et semble aussi bien en faire appel au « code de histones » qu'à des changements de charges induites par les modifications des histones, proposés par l'hypothèse « électrostatique ».

2. Les complexes de remodelage de la chromatine

En plus de ses modifications post-traductionnelles de histones, des complexes de remodelage de la structure de la chromatine participent aussi à la régulation de la transcription. Ces complexes utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour déplacer, insérer ou restructurer les nucléosomes, de façon à faciliter ou réduire l'accessibilité de l'ADN à des facteurs de transcription, de réplication ou de réparation (pour revue, Mohrmann et Verrijzer, 2005; Saha et al., 2006). Ils sont caractérisés par la présence d'une sous-unité catalytique ATPase et peuvent être classés en quatre familles selon la présence d'autres domaines structuraux caractéristiques : les familles SWI/SNF, ISWI, NuRD/Mi2 et INO (pour revue, Tsukiyama, 2002) (**figure 15**).

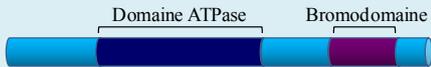
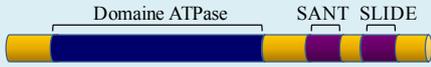
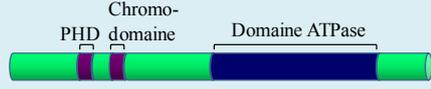
	<u>Famille</u>	<u>Complexes</u>	<u>Fonctions biologiques</u>
Famille SWI/SNF 	S. cerevisiae	SWI/SNF, RSC	Régulation Pol II et Pol III, Elongation, Réparation, Cycle cellulaire, Activation transcription
	Drosophile	Brahma	Régulation Pol II, Développement, Elongation
	Homme	SWI/SNF	Différenciation, Développement, Elongation
Famille ISWI 	S. cerevisiae	ISW1, ISW2	Répression Pol II, Elongation, Réplication, Différenciation, Développement
	Drosophile	NURF, ACF, CHRAC	Activation transcription, Assemblage chromatine, Espacement nucléosomes,
	Homme	WCRF, CHRAC, RSF	Activation et répression de la transcription, Espacement nucléosomes
Famille NuRD/Mi-2 	S. cerevisiae/ Drosophile	CHD1	Elongation/ Activation transcription
	Homme	NuRD	Répression transcription Remodelage chromatine
Famille INO 	S. cerevisiae	INO80, SWR1	Activation Pol II, Réparation ADN
	Drosophile	SWR1	Réparation ADN

Figure 15 : Les quatre principales familles de complexe de remodelage de la chromatine.

a) La famille SWI/SNF

La famille SWI/SNF (*SWItching/Sucrose Non Fermenting*) possède en plus du domaine ATPase, un bromodomaine impliqué dans la reconnaissance des lysines acétylées (Dhalluin et al., 1999). Il existe deux complexes majeurs représentant cette famille, le complexe SWI/SNF et le complexe RSC (*Remodel the Structure of Chromatin*), conservés de la levure à l'homme. Ils agissent essentiellement comme des coactivateurs de la transcription en réorganisant la structure des nucléosomes pour les rendre plus accessibles aux facteurs de transcription, mais peuvent également être impliqués dans la répression de la transcription (Martens et Winston, 2002).

b) La famille ISWI

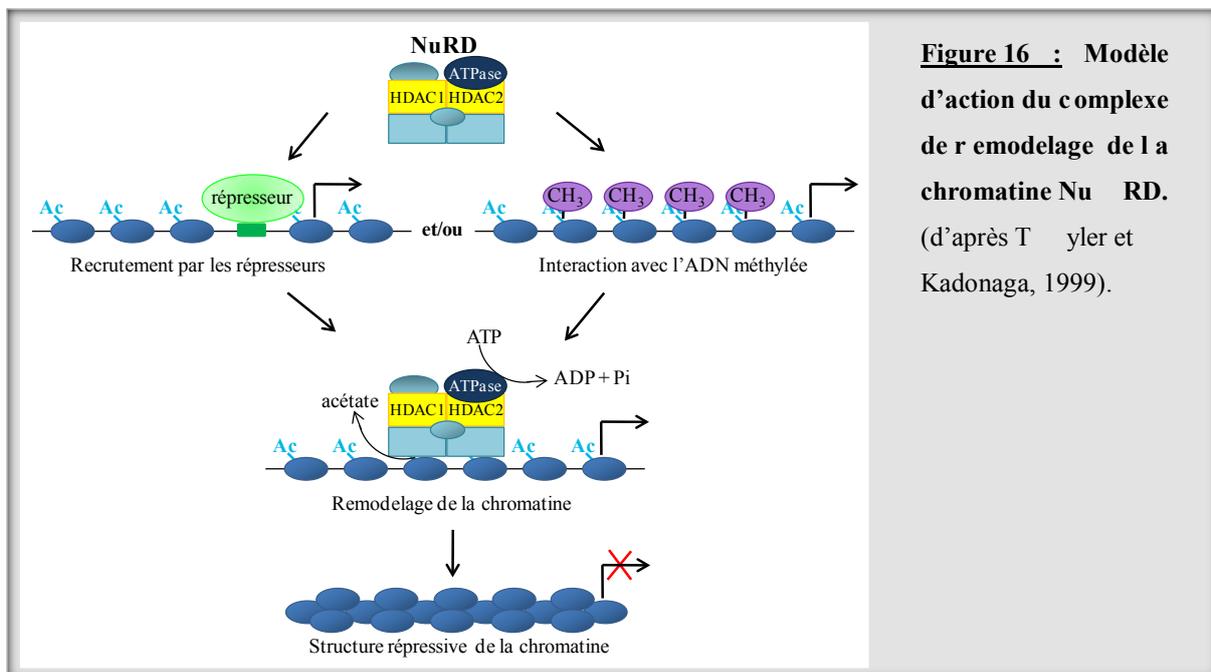
La famille ISWI (*Imitation of SWItch*) est caractérisée par une structure contenant en plus du domaine ATPase, un domaine SANT (*SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIB*) et un domaine SLIDE impliqués dans la liaison au niveau des queues des histones et au niveau de l'ADN « linker » respectivement (Grüne et al., 2003). Les principaux complexes représentant cette famille sont les complexes NURF (*NUcleosome Remodeling Factor*), CHRAC (*CHromatin Remodeling and Assembly Complex*) et ACF (*ATP-utilizing Chromatin remodeling and assembly Factor*) chez la drosophile, les complexes ISW1 et ISW2 chez *S. cerevisiae* et les complexes RSF (*Remodeling and Spacing Factor*) et WCRF (*Williams syndrome transcription factor Chromatin Remodeling Factor*) chez l'homme (Saha et al., 2006). Tous ces complexes sont capables de réorganiser ou espacer les nucléosomes et de changer la conformation des contacts entre l'ADN et les histones en faisant glisser par exemple les nucléosomes le long de l'ADN (Loyola et al., 2003). Ils interviennent aussi bien dans l'activation que la répression de la transcription (Goldmark et al., 2000; Badenhurst et al., 2002).

c) La famille Mi-2/CHD

Les complexes de remodelage de la famille Mi2/CHD sont souvent impliqués dans la répression transcriptionnelle. Chez les mammifères par exemple, le complexe NURD (*Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation*) possède à la fois l'activité de remodelage de la chromatine (grâce à la sous-unité ATPase Mi-2 β) et l'activité histone déacétylase (HDAC1 et HDAC2), généralement associée à la répression (Xue et al., 1998).

Des interactions entre la sous-unité ATPase Mi-2 et des répresseurs séquence-spécifiques comme Ikaros (Kim et al., 1999) ou le co-répresseur TIF1 β ont été observées (Schultz et al., 2001), suggérant que le complexe NuRD est activement recruté au niveau des gènes qu'il réprime. Ce complexe est aussi formé de protéines capables d'interagir avec les îlots CpG méthylés de l'ADN et pourrait ainsi participer à la répression médiée par la méthylation de l'ADN (Zhang et al., 1999; Wade et al., 1999) (**figure 16**).

De façon opposée, l'homologue de Mi-2 chez la drosophile, la protéine Chd1, est localisée principalement au niveau des domaines actifs des chromosomes polytènes, ce qui évoque un rôle positif de cette protéine dans la transcription (Stokes et al., 1996). Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine Chd1 est l'unique membre de la famille Mi-2/CHD et est plutôt impliquée dans l'élongation de la transcription (Woodage et al., 1997).



d) La famille INO

La famille INO se distingue des autres complexes de remodelage de la chromatine par la présence d'un domaine enzymatique ATPase divisé en deux sous-domaines et d'un motif DBINO de liaison à l'ADN (Tsujiyama, 2002; Bakshi et al., 2004). Chez la levure, cette famille est représentée par les complexes INO80 (*INO*sitol *80*) et SWR1 (*SWI2/Snf2 Related ATPase 1*) (pour revue, Baotshen, 2007). Le complexe INO80 est impliqué dans l'activation transcriptionnelle car il est nécessaire à l'activation du gène *INO1* en absence

d'inositol (Ebbert et al., 1999). Ce complexe est caractérisé par la présence de deux protéines homologues à l'ADN hélicase bactérienne Ruvb, les protéines Rvb1 et Rvb2; cela lui confère une activité ADN-hélicase et suggère un rôle dans la réparation des dommages de l'ADN (Shen et al., 2000). Le complexe SWR1 a une fonction particulière, car il est capable de réaliser l'échange d'un dimère H2A/H2B contenu dans la chromatine avec un dimère H2A.Z-H2B (Mizuguchi et al., 2004). Cet échange est dépendant de l'ATP et modifie la structure de la chromatine en incorporant un variant d'histone.

III. Organisation nucléaire de la chromatine

1. Les territoires chromosomiques

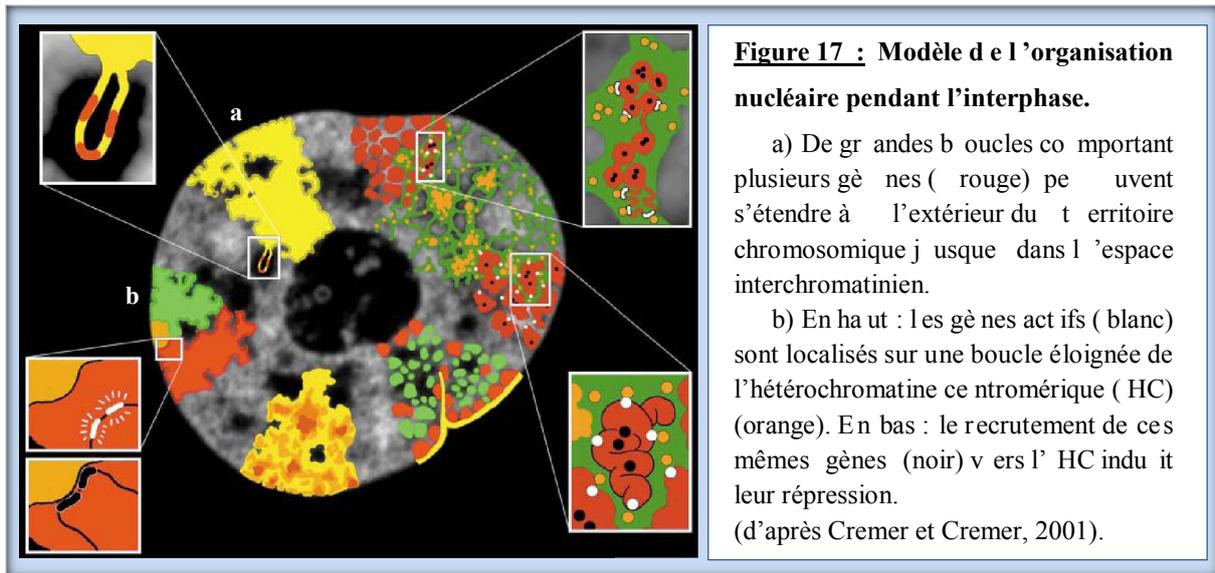
De nombreuses études réalisées ces dernières années ont mis en évidence que l'organisation spatiale des génomes ainsi que la compartimentation nucléaire constituent aussi un autre niveau de régulation épigénétique.

a) Description

Le développement de techniques de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) en utilisant des sondes marquées avec différents fluorochromes pour visualiser simultanément plusieurs chromosomes dans une cellule, a révélé que pendant l'interphase, les différents chromosomes du noyau sont localisés dans des espaces bien définis du noyau, appelés « territoires chromosomiques » (CT) (Cremer et Cremer, 2001; Parada et Misteli, 2002; Bolzer et al., 2005). Ces territoires contiennent chacun un chromosome particulier et sont séparés les uns des autres par des « espaces interchromatiniens » (IC), riches en complexes macromoléculaires qui interviennent au cours de la transcription, réplication, réparation ainsi qu'au cours de l'épissage (Cremer et al., 2000) (**figure 17**).

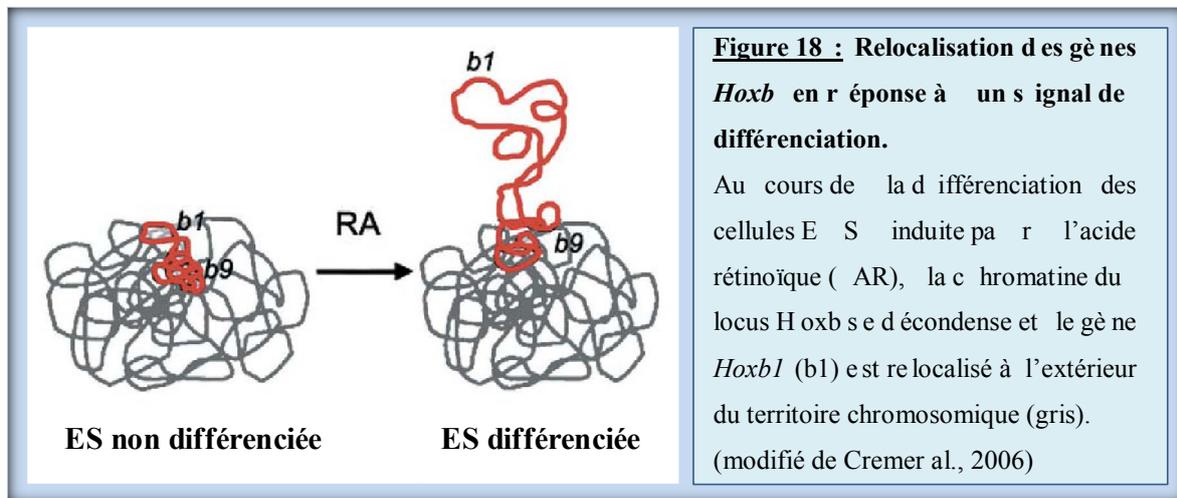
b) Disposition des chromosomes et des gènes dans les territoires chromosomiques

L'organisation des chromosomes les uns par rapport aux autres dans le noyau est encore controversée. Il semble néanmoins que la taille des chromosomes a une influence sur la localisation des territoires chromosomiques : les petits chromosomes sont en effet situés généralement au centre du noyau et les grands chromosomes en périphérie (Sun et al., 2000, et pour revue, Francastel et al., 2000). Pour des chromosomes de taille similaire, la contenance en gènes semble alors être déterminante pour leur positionnement. Chez l'homme par exemple, le chromosome 18, pauvre en gènes, est retrouvé en périphérie du noyau alors que le chromosome 19, riche en gènes, a une position plus centrale (Croft et al., 1999).



Différentes études ont montré que la position des territoires chromosomiques dans le noyau ainsi que la disposition des gènes à l'intérieur du territoire sont également déterminantes pour l'activité transcriptionnelle (Finlan et al., 2008). Les gènes sont en effet compartimentalisés dans des régions actives et inactives : les séquences non codantes sont retrouvées de façon préférentielle à l'intérieur et sont distribuées uniformément dans le territoire chromosomique (Verschure et al., 1999) alors que les gènes transcriptionnellement actifs sont localisés plutôt en périphérie du territoire (Kurz et al., 1996). De plus, des clusters de gènes transcriptionnellement actifs peuvent être retrouvés au niveau de grandes boucles de chromatine qui s'étendent à l'extérieur de la surface du territoire chromosomique jusque dans l'espace interchromatinien, dans un environnement permissif pour la transcription. Cela a été observé par exemple pour le complexe majeur d'histocompatibilité, dans son état activé (Volpi et al., 2000) (**figure 17**). C'est le cas aussi du cluster de gènes *Hoxb* qui est activé en même temps qu'il se relocalise à l'extérieur du territoire chromosomique. L'organisation sub-nucléaire de ce groupe de gènes Hox (*HomeOboX*) semble ainsi jouer un rôle essentiel pour leur expression en réponse à un signal de différenciation (Chambeyron et Bickmore, 2004 ; Sproul et al., 2005) (**figure 18**). Des changements de position très importants de certains loci ont aussi été observés au cours de la différenciation des lymphocytes T (LT). Le locus CD4 est par exemple relocalisé vers la périphérie nucléaire au cours de la différenciation des cellules LT double positives CD4⁺CD8⁺ en cellules CD8⁺, alors qu'il se relocalise vers le centre du noyau au cours de la différenciation en cellules CD4⁺ (Kim et al., 2004).

Cette organisation nucléaire a aussi une importance dans le processus d'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles : les gènes portés par le chromosome X inactif sont localisés en effet principalement au centre du territoire assigné au chromosome X inactif alors que les gènes qui échappent à l'inactivation sont plutôt relocalisés à l'extérieur de ce territoire (Chaumeil et al., 2006).

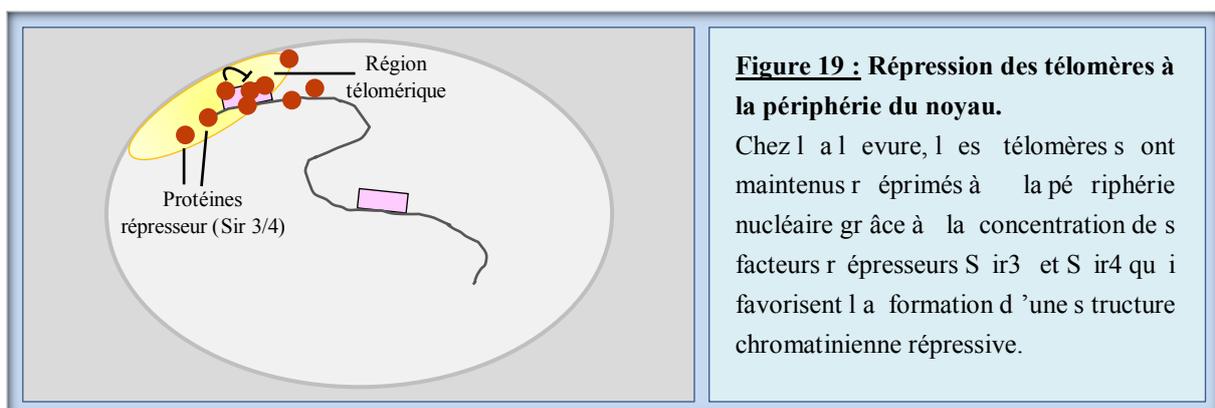


2. La périphérie nucléaire et les complexes des pores nucléaires (NPC)

La périphérie nucléaire est un compartiment dynamique qui prend une part importante dans la régulation transcriptionnelle. L'enveloppe nucléaire (NE pour *Nuclear Envelope*) qui sépare le noyau du cytoplasme, est composée d'une membrane externe (ONM pour *Outer Nuclear Membrane*) et d'une membrane interne (INM pour *Inner Nuclear Membrane*), accolée à la lamina nucléaire. Des études cytologiques ont montré qu'une grande partie des régions de chromatine condensée, telles que les télomères et les centromères, sont en contact avec la membrane interne. Les lamines de l'enveloppe nucléaire jouent un rôle important dans le contrôle de la structure de la chromatine et de l'architecture nucléaire et une grande partie de l'activité transcriptionnelle est régulée au niveau des NPC (pour *Nuclear Pore Complex*), insérés dans la membrane nucléaire et impliqués dans les échanges nucléaires (pour revues, Sexton et al., 2007; Taddei, 2007; Fedorova et Zink, 2008).

a) La périphérie nucléaire

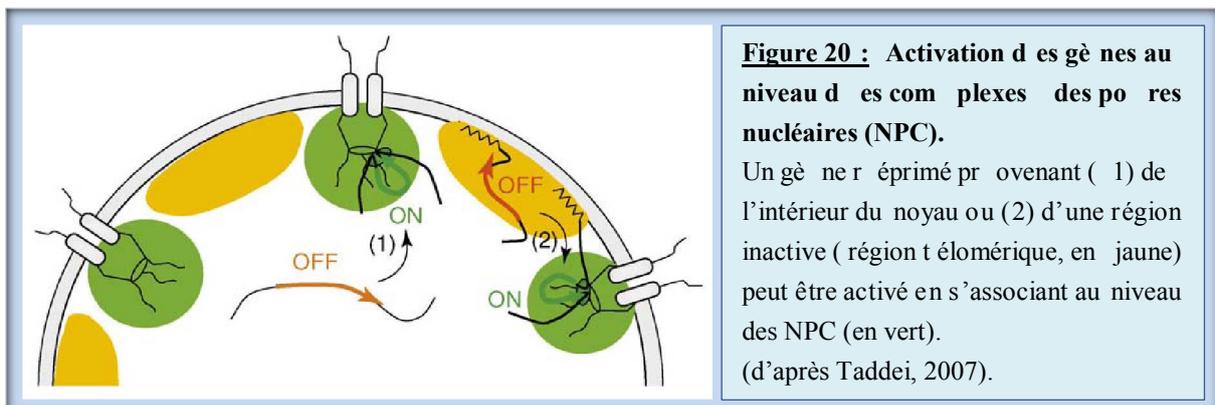
L'association de séquences chromatiniques dans des régions condensées de type hétérochromatine à la périphérie nucléaire est en général corrélée à une répression des gènes. Chez *S. cerevisiae*, la formation d'une structure chromatinienne répressive au niveau des télomères et de certaines silencieuses de type sexuel (locus *HMR* et *HML*) nécessite par exemple une localisation au niveau de la périphérie nucléaire (Gotta et al., 1996; Maillet et al., 1996). La structure chromatinienne est alors maintenue répressive au niveau des télomères grâce à la concentration élevée en protéines répresseurs Sir3 et Sir4 (pour *Silent Information Regulator*) au niveau de l'enveloppe nucléaire (Andrulis et al., 1998) (**figure 19**). Des études réalisées chez la drôsophilie ont montré également que l'aplupart des gènes réprimés interagissent avec les lamines nucléaires à la périphérie du noyau (Pickersgill et al., 2006). Cette relocalisation dynamique de certains gènes actifs dans un environnement chromosomique répressif a aussi été observée chez la souris, dans les lymphocytes B et T (Brown et al., 1997; Brown et al., 1999). Il a été démontré que cette relocalisation est sous le contrôle de la protéine Ikaros, qui se lie à la fois au promoteur des gènes inactivés et à l'ADN satellite centromérique et entraînerait de ce fait le recrutement de ces gènes au niveau de l'hétérochromatine centromérique (Cobb et al., 2000). De façon similaire, il a été observé qu'au cours du développement des cellules érythroïdes, le locus de la β -globine humaine s'associe au niveau des régions d'hétérochromatine centromériques lorsqu'il est réprimé et s'en dissocie lorsqu'il est activé (Schübeler et al., 2000). Une localisation préférentielle des gènes à l'état réprimé a également été observée à la périphérie chez l'homme : c'est le cas par exemple du gène *CFTR* et de ses locus adjacents qui s'associent à l'hétérochromatine périnucléaire lors de leur répression (Zink et al., 2004).



Quelques études récentes, tendent à montrer que certaines zones à la périphérie nucléaire pourraient également être impliquées dans l'activation de la transcription. Chez *D. melanogaster* par exemple, cette région semble favoriser une augmentation de l'expression de certains gènes, notamment les gènes impliqués dans la compensation de dosage, présents sur le chromosome X des mâles (Akhtar et Gasser, 2007).

b) Les complexes des pores nucléaires (NPC)

Les complexes des pores nucléaires (NPC) jouent aussi un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, aussi bien chez la levure que la drosophile. Chez la levure, l'interaction avec les NPC est parfois associée à un état répressif (Galy et al., 2000), mais elle est le plus souvent corrélée à une activation transcriptionnelle (**figure 20**). Les gènes *GALI*, *INO1* et *HXK1* de levure s'associent par exemple avec des protéines des pores nucléaires et sont relocalisés au niveau de l'enveloppe nucléaire lorsqu'ils sont activés (Brickner et al., 2004; Taddei et al., 2006). Chez la levure et la drosophile, certains gènes fortement exprimés ont aussi été retrouvés associés à des composants de la machinerie d'export de sARN messagers et avec le complexe SAGA impliqué dans l'activation de la transcription au niveau des NPC (Casolari et al., 2004; Rodríguez-Navarro et al., 2004; Kurshakova et al., 2007). D'autres études ont montré aussi que chez les mammifères, le chromosome X inactif est localisé préférentiellement au niveau d'un compartiment périnucléaire silencieux alors que le chromosome X actif pourrait être associé avec un complexe impliqué dans la compensation de dosage au niveau des NPC (pour revue, Sexton et al., 2007). Ces données suggèrent que la périphérie nucléaire est compartimentalisée en domaines transcriptionnellement actifs et répressifs, et que les NPC permettent de faire le lien entre ces différentes régions.

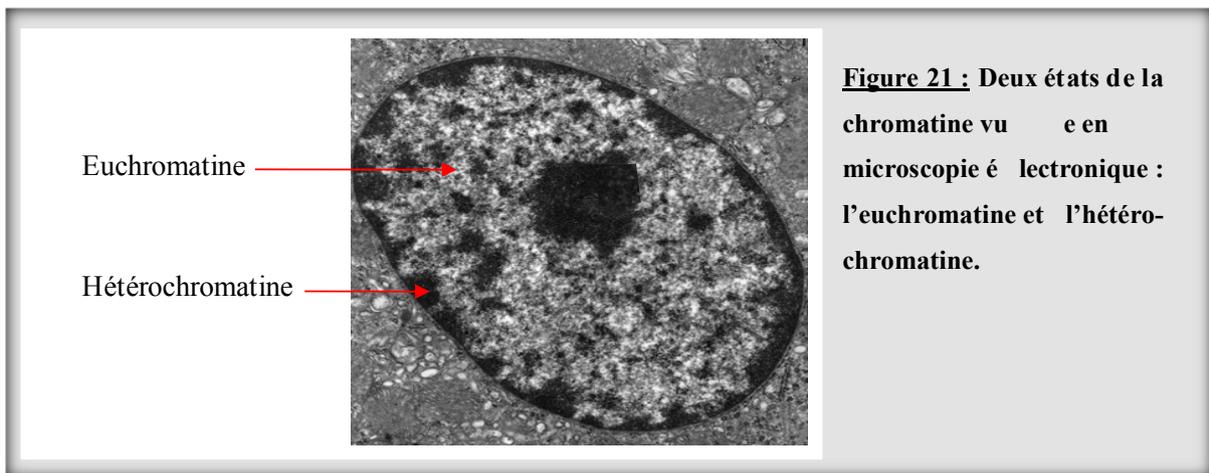


3. L'euchromatine et l'hétérochromatine

Dans les noyaux en interphase de nombreuses cellules eucaryotes, la chromatine se présente sous deux formes ayant des degrés de compaction différents : l'euchromatine et l'hétérochromatine (Heitz, 1928). De nombreuses études ont montré que chacune de ces deux structures chromatiniennes présente des caractéristiques et des fonctions particulières (pour revues, Dillon et Festenstein, 2002; Fedorova et Zink, 2008).

a) L'euchromatine

L'euchromatine correspond à des régions de chromatine décondensées et facilement accessibles à la machinerie de transcription; elle est définie comme la partie de la chromatine transcriptionnellement compétente ou activement transcrite qui se réplique précocement au cours de la phase S du cycle cellulaire (**figure 21**). L'euchromatine est caractérisée par une hyperacétylation des résidus lysines des histones H3 et H4 et par une triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (Kouzarides, 2007). Ces régions sont de plus riches en gènes, fortement exprimés et actifs, et les séquences d'ADN sont très peu méthylées (**tableau 8**).



b) L'hétérochromatine

À la différence de l'euchromatine, l'hétérochromatine correspond à des régions de chromatine fortement condensées tout au long du cycle cellulaire, difficilement accessibles à la machinerie de transcription (**figure 21**). Ces régions sont généralement transcriptionnellement inactives et se répliquent tardivement en phase S. L'hétérochromatine

est caractérisée par une hypoacétylation des histones H3 et H4, une triméthylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 27 et une triméthylation de l'histone H4 sur la lysine 20 (Kouzarides, 2007). Ces régions de chromatine sont pauvres en gènes codant pour des protéines et l'ADN est méthylé au niveau de sites nucléotides CpG (pour revue, Richards et Egin, 2002) (**tableau 8**). Par ailleurs, différentes études suggèrent l'implication de petits ARN non codants dans l'établissement et le maintien de structures hétérochromatiniennes (Hall et al., 2002; Maison et al., 2002; Kanellopoulou, 2005). On distingue deux types d'hétérochromatine : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative (Brown, 1966; et pour revue, Grewal et Jia, 2007).

Caractéristiques de la chromatine	Euchromatine	Hétérochromatine constitutive	Hétérochromatine facultative
Méthylation de l'ADN	Hypométhylation	Méthylation	Méthylation
Modification des histones	H3/H4 hyperacétylation H3K4me2/3 H3K36me3, H3K79me3 H3R2, R17, R26 méthylation H3 phosphorylation	H3/H4 hypoacétylation H3K9me3 H4K20me3	H3K4 hypoacétylation H3K9me2 H3K27me3 H4K20me1 H2AK119ub1
Facteurs protéiques caractéristiques	Activateurs Complexes de remodelage H3.3, H2A.Z	Protéines HP1 (HP1 α/β) Su(var) 3-9	Protéines PcG (PRC1, PRC2) Protéines HP1 (HP1 γ) Répresseurs Complexes de remodelage macroH2A
Réplication	Précoce	Tardive	Variable
Caractéristiques générales de la chromatine	Ouverte	Compacte Au niveau des centromères et télomères	Compacte Sous forme de foci d'hétérochromatine?
Transcription	Gènes actifs Transcrits non-géniques	Petits ARN (<i>S. pombe</i> , possible chez les mammifères)	Gènes réprimés ARN (chromosome X inactif...)

Tableau 8 : Caractéristiques générales de l'euchromatine, l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative. (K, Lysine; R, Arginine; PcG, protéines du groupe Polycomb).

i. L'hétérochromatine constitutive

Dans une cellule typique de mammifère, l'hétérochromatine constitutive correspond à environ 10% du génome. Cette fraction se trouve souvent associée aux régions péri-centromériques et télomériques à la périphérie du noyau et du nucléole, qui restent condensées tout au long du cycle cellulaire (pour revue, Maison et Almouzni, 2004). L'hétérochromatine péri-centromérique est constituée de séquences d'ADN répétées riches en A+T, qui favorisent la compaction de l'ADN et la fixation des protéines (Fitzgerald et al., 1994). Ces séquences incluent des éléments d'ADN transposables et des séquences satellites,

appelées satellites α chez l'homme et satellites majeurs chez la souris (ou satellite γ : Pardue et Gall, 1970; Jones, 1970). Les satellites majeurs sont composés d'unités répétées de 234pb qui peuvent s'étendre sur des distances de 240kb jusqu'à 2000kb chez la souris (Vissel et Choo, 1989) alors que les satellites α sont composés d'unités répétées de 171pb chez l'homme (Schueler et al., 2001). En plus de séquences répétées, l'hétérochromatine constitutive est enrichie en « marques épigénétiques » qui doivent être stablement transmises au cours de générations : les histones sont spécifiquement méthylées sur la lysine 9 de l'histone H3 et la lysine 20 de l'histone H4 et on observe un enrichissement en protéines HP1 (*Heterochromatin Protein 1*; voir chapitre IV) (**tableau 8**). L'hétérochromatine constitutive est stable et garde ses propriétés à tous les stades du développement et dans tous les tissus. Elle n'est cependant plus considérée aujourd'hui comme une région inerte, et peut être le siège de gènes activement transcrits qui seraient impliqués dans le maintien de la structure hétérochromatinienne (pour revue, Dimitri et al., 2005).

ii. L'hétérochromatine facultative

L'hétérochromatine facultative, elle, correspond à la fraction de chromatine condensée qui varie d'un type cellulaire à l'autre et qui se trouve au niveau des gènes dont l'expression est régulée au cours du développement (Grewal et Jia, 2007). Elle joue un rôle important au cours de la différenciation cellulaire car elle permet la perte de totipotence et l'acquisition de fonctions spécialisées pour les cellules en voie de différenciation (pour revue, Surani et al., 2007). Les régions d'hétérochromatine facultative sont caractérisées par une diméthylation de la lysine 9 et une triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 ainsi que la monométhylation de la lysine 20 de l'histone H4 (pour revue, Trojer et Reinberg, 2007) (**tableau 8**). Le chromosome X des mammifères est un exemple bien caractérisé d'hétérochromatine facultative : chez les individus femelles, un seul des deux chromosomes X est actif, l'autre est inactivé à un stade précoce du développement, avant l'implantation de l'embryon et demeure sous forme d'hétérochromatine facultative. La majorité des gènes de ce chromosome sont ainsi maintenus silencieux ce qui permet un niveau d'expression des gènes du chromosome X identique chez les mâles et les femelles.

iii. Répression de l'expression des gènes par hétérochromatinisation

La première preuve de l'influence du degré de compaction de la chromatine sur l'activité transcriptionnelle des gènes provient de la découverte du phénomène d'extinction par effet de position PEV (*Position Effect Variegation*) chez la drosophile (Muller, 1930). Au cours du PEV, des gènes de l'euchromatine se retrouvent placés dans ou à proximité de l'hétérochromatine suite à des insertions/translocations chromosomiques et sont réprimés. Des études génétiques chez la drosophile ont permis de mieux comprendre ce phénomène et d'identifier les facteurs suppresseurs (Su(var)s) tels que les protéines HP1 et « Enhancer » (E(var)s) du PEV (pour revues, Weiler et Wakimoto, 1995; Wallrath, 1998). Des drosophiles mutantes obtenues par irradiation aux rayons X présentent par exemple une expression mosaïque du gène *white*, responsable normalement de la pigmentation rouge des yeux. La répression stochastique du gène *white* est la conséquence d'une translocation chromosomique qui place ce gène, s'exprimant normalement dans un contexte euchromatinen, au voisinage de régions d'hétérochromatine (Muller, 1930). D'autres études ont montré que l'insertion d'un bloc d'ADN satellite d'hétérochromatine au niveau du gène *brown*, entraîne l'inactivation des deux allèles du gène ainsi que leur relocalisation à proximité de l'hétérochromatine périnucléaire (Csink et Henikoff, 1996; Dernburg et al., 1996). Il a été démontré aussi chez la drosophile que des mutations dans le gène *Su(var)2-5* qui code pour la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) provoquent une forte suppression du phénomène PEV (Eissenberg et al., 1990).

Ce phénomène de répression par recrutement d'un gène au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique a aussi été décrit par la suite dans différents organismes, de la levure aux mammifères (pour revue, Dillon et Festenstein, 2002).

4. Régulation et dynamique du positionnement nucléaire

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le ciblage spécifique de gènes au niveau de régions nucléaires bien précises, restent actuellement en core largement méconnus. Des découvertes récentes tendent pourtant à démontrer que les modifications des histones jouent un rôle important sur le repositionnement nucléaire des gènes. Par exemple l'acquisition des marques d'activation telles que l'acétylation de la lysine 9 et la diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 favorisent la décondensation de la chromatine et la formation de boucles chromatiniennes qui s'étendent à l'extérieur du territoire chromosomique (Chambeyron et

Bickmore, 2004). De même, l'enrichissement en marques caractéristiques de l'hétérochromatine, telles que la triméthylation de la lysine 27 et la diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3, a un niveau du chromosome X inactif, pourrait favoriser la position préférentielle de ce chromosome à la périphérie nucléaire (Bártová et al., 2001; Heard et al., 2001).

Différentes études ont montré par ailleurs que les répresseurs transcriptionnels et l'histone déacétylase HDAC3 sont fortement enrichis au niveau des lamines, à la périphérie nucléaire (Somech et al., 2005; Holaska et Wilson, 2007). Les protéines HP1 interagissent aussi avec des constituants de l'enveloppe nucléaire tel que la lamine B et le polypeptide LAP β (*Lamina Associated Polypeptide 2 beta*) (Kourmouli et al., 2000; Polioudaki et al., 2001). De plus, il a été démontré récemment que la relocalisation du corépresseur TIF1 β au niveau des régions d'hétérochromatine péricentromérique est dépendante de la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3, catalysée par les histones méthyltransférases SUV39h1/h2 (Briers et al., 2009). La relocalisation des gènes à la périphérie semble ainsi favorable à la déacétylation des histones et au renforcement de ses marques de répression (**figure 22**). En accord avec cette hypothèse, il a été montré chez l'homme (Zink et al., 2004) et la drosophile (Pickersgill et al., 2006) qu'un traitement avec un inhibiteur de histones déacétylases, la trichostatine A (TSA), entraîne une dissociation de certains gènes de la périphérie nucléaire et une relocalisation vers les complexes des pores nucléaires (NPC) (Brown et al., 2008).

L'ensemble de ces données suggère fortement que les facteurs de transcription et les complexes de modification des histones, ne sont pas seulement impliqués dans la régulation de la structure locale de la chromatine, mais régulent aussi le positionnement nucléaire des gènes et leur interaction avec des structures spécifiques présentes au niveau de régions nucléaires bien précises (**figure 22**). Des gènes réprimés par un mécanisme d'hétérochromatinisation pourraient être ainsi séquestrés à la périphérie du noyau grâce à des interactions entre les protéines HP1, des complexes répresseurs (tels que le corépresseur TIF1 β) et des modifications des histones, ainsi que des composants de l'enveloppe nucléaire.

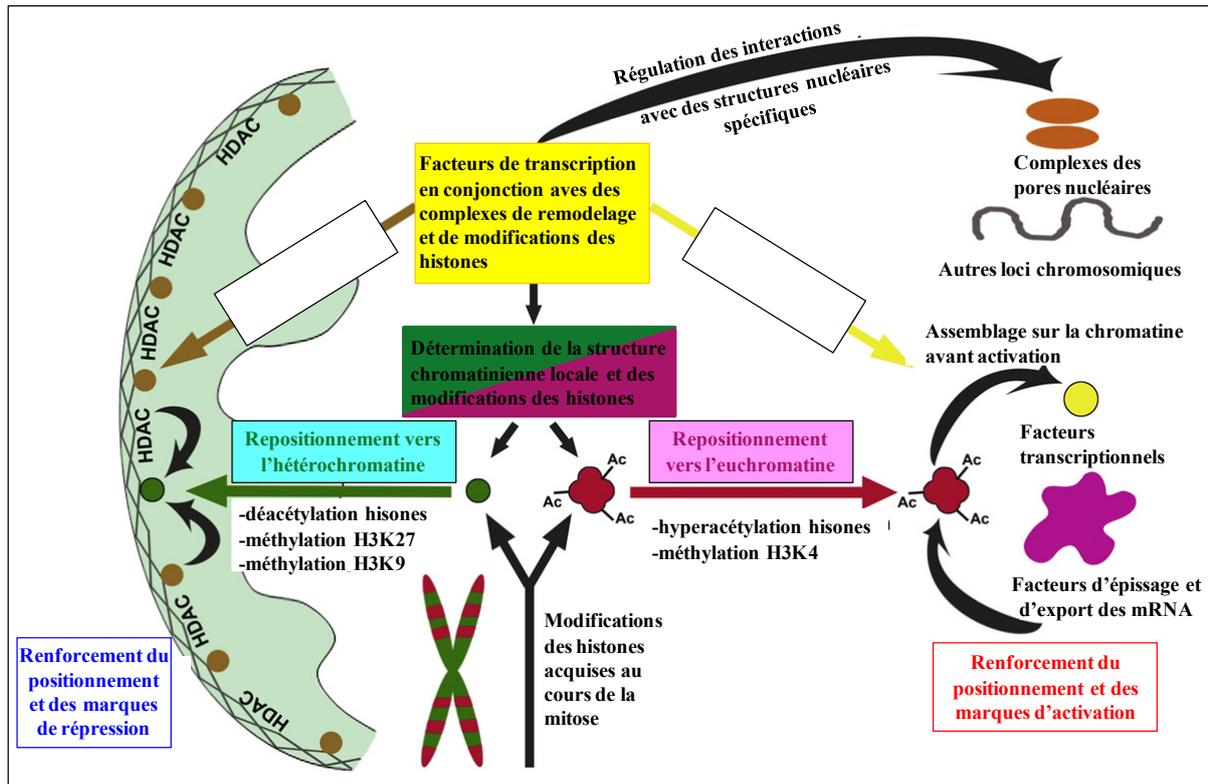


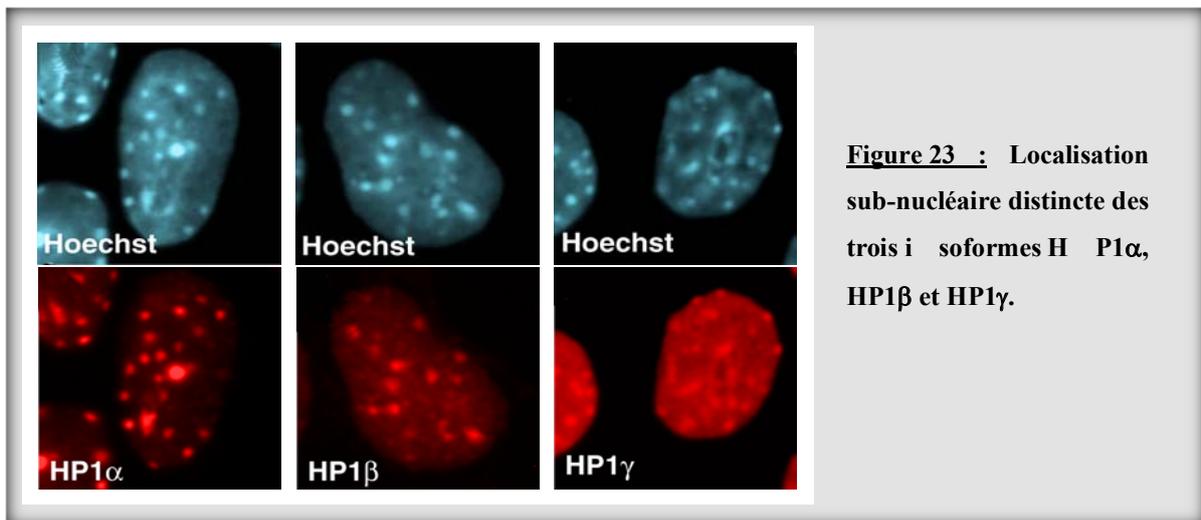
Figure 22 : Régulation du positionnement nucléaire et de l'activité transcriptionnelle des gènes.

Les facteurs de transcription séquence-spécifiques et les complexes de remodelage et de modifications des histones participent au repositionnement nucléaires des gènes (modifié de Fedorova et Zink, 2008).

IV. La famille des protéines HP1

1. Identification

Les protéines HP1 ont été identifiées initialement chez la drosophile comme des suppresseurs de PEV et de composants majeurs de l'hétérochromatine péricentromérique (James et Elgin, 1986; Eisenberg et al., 1990). Elles font partie d'une famille de petites protéines non-histone associées aux chromosomes, retrouvées de la levure *S. Pombe* (Swi6) aux mammifères, mais sont absentes chez la levure *S. cerevisiae* (pour revue, Lomberk et al., 2006). Chez la souris et l'homme, on retrouve trois isoformes très homologues des HP1 : HP1 α , HP1 β (MOD1, M31) et HP1 γ (MOD2, M32) (pour revues, Maison et Almouzni, 2004; Lomberk et al., 2006; Kwon et Workman, 2008). Ces isoformes des HP1 ont une localisation sub-nucléaire spécifique : HP1 α est principalement associée aux régions d'hétérochromatine péricentromérique alors que HP1 β et, plus particulièrement encore HP1 γ , peuvent s'associer également à l'euchromatine (Nielsen et al., 1999) (**figure 23**).



2. Organisation structurale

Les protéines HP1 présentent une organisation structurale commune, composée dans la région N-terminale d'un chromodomaine (CD) (« CHROMatin Organisation MODifier ») et dans la région C-terminale d'un motif similaire, le « Chromo Shadow Domain » (CSD); ces deux régions sont séparées par un domaine central « hinge » faiblement conservé (**figure 24**).

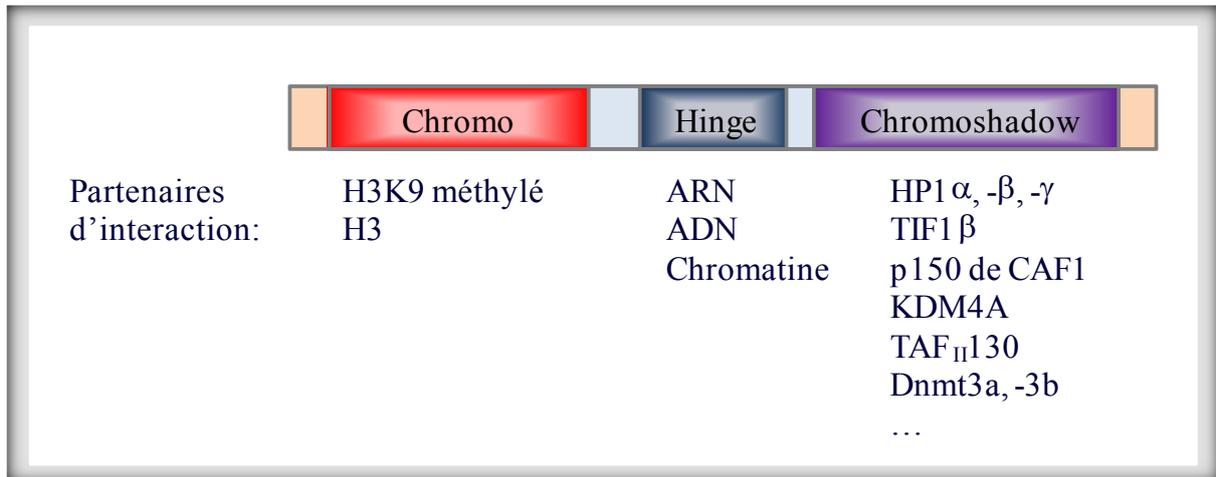


Figure 24 : Organisation structurale des protéines HP1 et quelques exemples de partenaires d'interaction. (d'après Maison et Almouzni, 2004).

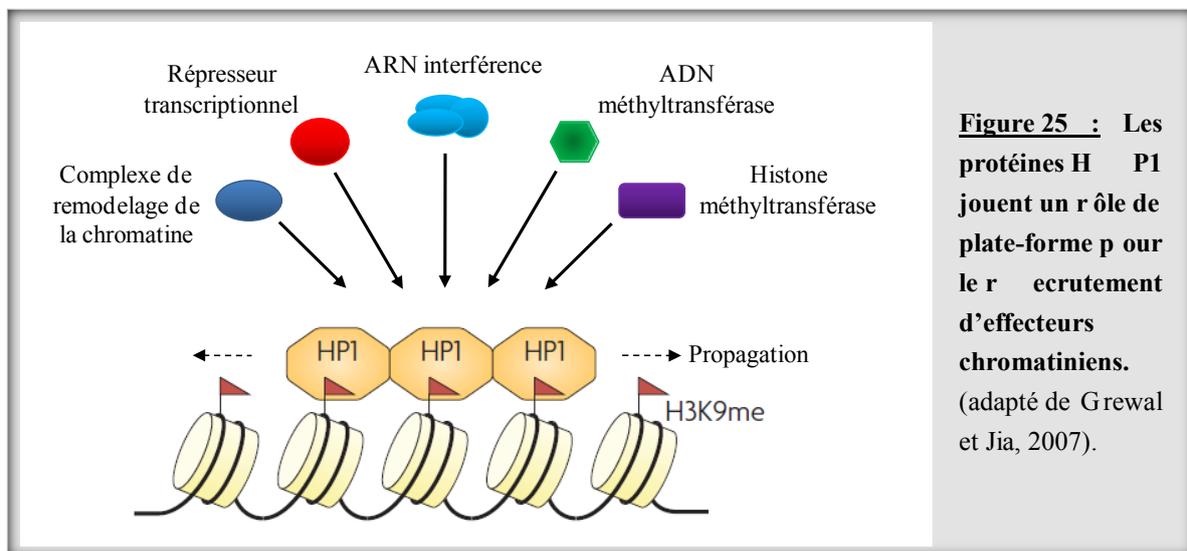
Le chromodomaine est un domaine retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans l'organisation de la structure de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes (Jones et al., 2000), telles que les protéines du groupe Polycomb qui répriment la transcription et l'histone méthyltransférase Suv39h1. Les protéines HP1 se fixent par l'intermédiaire de leur chromodomaine à la lysine 9 méthylée (préférentiellement di- ou tri-méthylée) de l'histone H3, modification caractéristique des régions d'hétérochromatine péricentrique (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Le chromodomaine peut également se lier au domaine globulaire de l'histone H3 (Nielsen et al., 2001a).

Le domaine central « hinge », peu conservé, permet l'interaction des protéines HP1 avec les acides nucléiques. Dans le cas de HP1 α par exemple, ce domaine a été démontré, *in vitro*, interagir avec des ARNs (Muchardt et al., 2002) et se lier à l'ADN et à la chromatine sans spécificité de séquence (Meehan et al., 2003). Ce domaine est aussi sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles, principalement des phosphorylations qui peuvent affecter la localisation, l'interaction et la fonction des protéines HP1 (Eisenberg et al., 1994; Koike et al., 2000; Zhao et al., 2001; Badugu et al., 2005).

Le « chromoshadow domain » est un motif d'interaction protéine-protéine impliqué dans l'homo- et l'hétéro-oligomérisation des protéines HP1 (Nielsen et al., 2001a) ainsi que dans l'interaction avec d'autres protéines associées à la chromatine. Différentes études ont permis d'identifier une séquence consensus capable de reconnaître et de se lier au CSD des protéines HP1 : le pentapeptide PxVxL (Smothers et Henikoff, 2000; Thiru et al., 2004). Cette

séquence est retrouvée dans un grand nombre de régulateurs transcriptionnels et d'effecteurs chromatinien interagissant avec les HP1, tels que les facteurs intermédiaires de transcription TIF1 α , TIF1 β et TIF1 δ (Nielsen et al., 1999), la sous unité p150 du facteur d'assemblage de la chromatine CAF1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) (Murzina et al., 1999), le facteur de la machinerie de transcription TAF_{II}130 (Vassallo et Tanese, 2002) ou encore la déméthylase KDM4A chez la drosophile (Lin et al., 2008). Les HP1 sont également capables d'interagir avec les DNA méthyltransférases Dnmt3a et Dnmt3b impliquées dans la méthylation des îlots CpG (Bachman et al., 2001).

De part leur capacité de multimérisation et d'interaction avec de nombreux régulateurs chromatinien, il a été proposé que les protéines HP1 associées à la lysine 9 méthylée de l'histone H3 jouent un rôle de plateforme pour le recrutement de protéines impliquées dans la formation et la propagation de l'hétérochromatine (Grewal et Jia, 2007) (**figure 25**).



3. Fonctions des protéines HP1

De part leurs capacités à interagir avec de nombreuses autres protéines non-histones, les protéines HP1 sont situées au centre de multiples fonctions cellulaires et processus biologiques (**tableau 9**). Ces partenaires sont impliqués aussi bien dans la régulation de la transcription, les modifications de la structure de la chromatine, la réplication et la réparation de l'ADN, l'organisation nucléaire et la fonction des chromosomes et des centromères (pour revues, Maison et Almouzni, 2004; Hiragami et Festenstein, 2005; Kwon et Workman, 2008) (**figure 26**).

a) Formation de l'hétérochromatine

Le rôle des protéines HP1 dans l'établissement et la propagation de l'hétérochromatine est le mieux caractérisé à ce jour. Les protéines HP1 sont capables d'interagir avec l'histone méthyltransférase Suv39h1 responsable de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Aagaard et al., 1999; Schotta et al., 2002; Jia et al., 2004). Cette modification est enrichie au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique et sert de point d'ancrage et de concentration locale des protéines HP1. Les protéines HP1 fixées au niveau de la lysine 9 de l'histone H3, vont recruter ensuite l'enzyme Suv39h1 au niveau de l'hétérochromatine, et l'activité histone méthyltransférase va générer à son tour de nouveaux sites de liaison pour les protéines HP1. Il semble que la structure compacte de type hétérochromatine puisse ainsi se propager à partir d'un site initial de méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, grâce à un boucle de renforcement impliquant les HP1 et Suv39h1. Les HP1 sont de plus capables d'interagir et de recruter d'autres facteurs participant à la formation de l'hétérochromatine tels que les ADN méthyltransférases Dnmt3a et Dnmt3b (Bachman et al., 2001; Fuks et al., 2003; Lehnertz et al., 2003) ou un composant ARN (Muchardt et al., 2002).

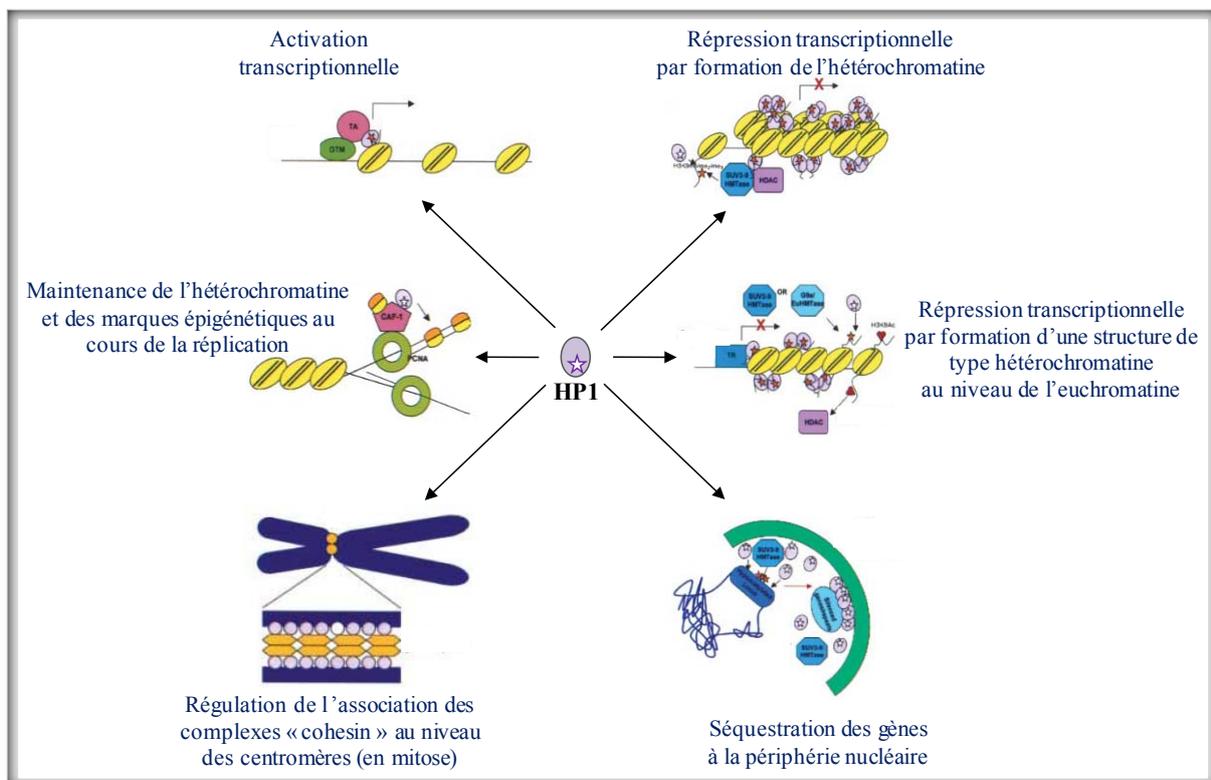


Figure 26 : Exemples de fonctions potentielles des protéines HP1. (d'après Hiragami et Festenstein, 2005).

b) Répression des gènes dans l'euchromatine

Les protéines HP1 sont également retrouvées au niveau de l'euchromatine où leur présence est souvent corrélée à une répression des gènes (Hwang et al., 2001; Fanti et al., 2003; Grewal et Moazed, 2003). Il a été montré par exemple qu'elles peuvent être recrutées spécifiquement au niveau du promoteur du gène codant pour la *cycline E* par l'intermédiaire du facteur Rb (*Retinoblastoma*) (Nielsen et al., 2001b). Les HP1 induisent alors la répression de ce gène en favorisant la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par l'histone méthyltransférase Suv39h1 (Nielsen et al., 2001b). De même, la présence de HP1 γ et de s-histones méthyltransférase G9a et EuHMTase spécifiques de la lysine 9 de l'histone H3 a aussi été observée au niveau des promoteurs des gènes réprimés par le facteur de transcription E2F (Ogawa et al., 2002). De façon similaire il a pu être mis en évidence un recrutement des protéines HP1 α et HP1 γ au niveau d'un système rapporteur inducible stablement intégré à l'euchromatine (Ayyanathan et al., 2003). Dans ce système, le corépresseur TIF1 β permet la formation d'une structure de type hétérochromatine au niveau du promoteur en recrutant le complexe NuRD-HDAC de déacétylation de s-histones (Schultze et al., 2001), l'histone méthyltransférase SETDB1 spécifique de la lysine 9 de l'histone H3 (Schultz et al., 2002) et les protéines HP1. Le recrutement de l'ensemble de ces facteurs est associé à une répression stable du gène rapporteur au-delà de 50 générations.

L'ensemble de ces études démontre que les HP1 sont capables d'établir une structure chromatinienne répressive de type hétérochromatine, une fois qu'elles sont ciblées au niveau de promoteurs spécifiques dans l'euchromatine. Les gènes réprimés par ce mécanisme pourraient ensuite être séquestrés à la périphérie du noyau grâce à des interactions entre les protéines HP1 et des composants de l'enveloppe nucléaire (voir Chapitre III. 2).

c) Les protéines HP1 et la fonction des centromères et télomères

L'hétérochromatine constitutive est une structure condensée de chromatine formée essentiellement de séquences répétitives d'ADN, que l'on retrouve souvent associée aux régions péricentromériques et télomériques à la périphérie du noyau. Ces régions d'hétérochromatine péricentromériques sont caractérisées par la présence de la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et des protéines HP1 chez la souris, ou de son homologue Swi6 chez *S. pombe*, qui jouent un rôle essentiel au bon fonctionnement des centromères. En effet, dans des souris déficientes pour l'histone méthyltransférase Suv39h1, la perte de la

triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 entraîne une délocalisation des protéines HP1 au niveau des régions d'hétérochromatine péricentromériques et est associée à une augmentation de l'instabilité des chromosomes (Peters et al., 2001; Maison et al., 2002). Chez *S. pombe*, Swi6 est également requise pour une cohésion efficace entre les deux chromatides sœurs au cours du cycle cellulaire (Bernard et al., 2001).

Les HP1 sont également essentielles pour la stabilité des télomères. Chez la drosophile, en absence des protéines HP1, on observe en effet une fusion des télomères et une configuration anormale des chromosomes durant la métaphase (Fanti et al., 1998).

Protéine	Espèce	Isoforme	Domaine
Composants de l'hétérochromatine/ Régulateurs de la transcription			
Histone H1	Drosophile	HP1	ND
Histone H3	Drosophile, Souris	HP1, HP1 α , - β , - γ	CD
H3K9me	S. pombe, Drosophile, Souris, Homme	Swi6, HP1, HP1 α , - β , - γ	CD
Histone H4	Drosophile, Souris	HP1, HP1 α	CSD
SUV39H1	Drosophile, Souris, Homme	HP1, HP1 α , - β , - γ	CSD
Polycomb	Homme	HP1 α , - γ	CSD
Dnmt3a	Souris	HP1 α ,	ND
Dnmt3b	Souris, Homme	HP1 α , - β	ND
TIF1 β	Souris, Homme	HP1 α , - β , - γ , hHP1 α , - γ	CSD
Rb	Homme	HP1 α , - γ	ND
MITR	Souris	HP1 α	Hinge
BRG1	Souris	HP1 α	CSD
ATRx	Souris	HP1 α , - β	CSD
TAF _{II} 130	Homme	HP1 α , - γ	CSD
PIM1	Homme	HP1 γ	CSD
ARN	Souris	HP1 α , - γ	Hinge
Réplication et réparation de l'ADN			
CAF-1 (p150)	Souris, Homme	HP1 α , - β , hHP1 α	CSD
Ku70	Homme	HP1 α , - γ	CSD
BRCA-1	Homme	HP1 α	ND
ORC1-6	Drosophile	HP1	CD, CSD
HOAP	Drosophile	HP1	ND
Organisation nucléaire			
Enveloppe nucléaire	Souris	HP1 α , - β , - γ	CD
Récepteur laminine B	Homme	HP1 α , - β , - γ	CSD
Laminine B	Souris	HP1 β	CD
LAP2 β	Souris	HP1 β	CD
Autres protéines associées aux chromosomes			
Psc3	S. Pombe	Swi6	CD
DDP1	Drosophile	HP1	ND
Arp4/dARP6	Drosophile	HP1	ND
INCENP	Homme	HP1 α , - γ	Hinge
Ki-67	Homme	HP1 α , - β , - γ	CSD
SP100B	Homme	HP1 α , - β , - γ	CSD

Tableau 9 : Exemples de partenaires d'interaction des protéines HP1. (d'après Hiragami et Festenstein, 2005; Kwon et Workman, 2008).

d) Les protéines HP1 dans la réplication et la réparation de l'ADN

Les protéines HP1 s'associent également à des protéines impliquées dans l'assemblage de la chromatine au cours de la réplication et la réparation de l'ADN. Par des expériences de co-immunoprécipitation, il a été démontré que les protéines HP1 interagissent avec la sous-unité p150 du facteur d'assemblage de la chromatine CAF1 (Murzina et al., 1999). Ce facteur CAF1 est recruté au niveau des foyers de réplication à travers une interaction directe avec la protéine PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Shibahara et Stillman, 1999; Moggs et al., 2000) et dépose les histones H3 et H4 au niveau de l'ADN nouvellement répliqué (Gaillard et al., 1996). La sous-unité p150 est impliquée dans la stabilisation d'un pool de protéines HP1 au niveau de l'hétérochromatine pendant la réplication (Quivy et al., 2004). Il a été montré que l'interaction entre p150/CAF1 et les protéines HP1 est essentielle pour la réplication de l'hétérochromatine péricentromérique et la progression de la phase S du cycle cellulaire chez la souris (Quivy et al., 2008). De plus, CAF1 est capable d'interagir à la fois avec HP1 α et avec l'histone méthyltransférase SETDB1, suggérant que le complexe CAF1-HP1 α -SETDB1 est capable d'initier la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 au niveau des foyers de réplication (Loyola et al., 2009). Ce complexe pourra alors servir de plateforme pour le recrutement de sH3 méthyltransférases SUV39h1/h2 et pour la propagation de la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique pendant la réplication de l'ADN (Loyola et al., 2009).

Les protéines HP1 jouent également un rôle au cours de la réparation de l'ADN (pour revue, Ball et Yokomori, 2009). Il a été montré par exemple que la déplétion de trois isotypes des protéines HP1 facilite la décompaction de la chromatine et l'accessibilité à des facteurs de réparation (Goodarzi et al., 2008). En réponse aux cassures d'ADN double brin, la protéine HP1 β est aussi rapidement phosphorylée au niveau de la thréonine 51; cela facilite ensuite la phosphorylation du variant d'histone H2A.X qui joue un rôle important dans la fixation et l'accumulation de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Ayoub et al., 2008).

e) Les protéines HP1 et l'activation de la transcription

Quelques études ont pu mettre ainsi en évidence un rôle de protéines HP1 dans l'activation de la transcription. Chez la dr osophile, il a été montré par exemple que les protéines HP1 sont nécessaires à la transcription de gènes euchromatiniens impliqués dans la

progression du cycle cellulaire (Cryderman et al., 2005; De Lucia et al., 2005) et à l'expression de certains gènes tels que les gènes *light* et *rolled* au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique (Clegg et al., 1998; Lu et al., 2000). Des études récentes ont montré que la protéine HP1a est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes et le contrôle de l'état de la chromatine, en recrutant la déméthylase KDM4A spécifique de la lysine 36 di- et triméthylés de l'histone H3 au niveau de régions enrichies en lysine 9 triméthylée de l'histone H3, au cours de l'élongation de la transcription (Lin et al., 2008). De même la protéine HP1c joue un rôle dans l'activation transcriptionnelle en étant associée à l'ARN polymérase II et à la lysine 4 triméthylée de l'histone H3 (Font-Burgada et al., 2008). Chez les mammifères, il a été démontré par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine, que la région transcrite de nombreux gènes est enrichie en protéine HP1 γ et en méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 dans les cellules érythroïdes (Vakoc et al., 2005). Des expériences réalisées sur le promoteur inductible LTR HIV1 ont mis en évidence qu'au cours de l'activation de la transcription, la protéine HP1 β peut être remplacée par HP1 γ au niveau de la région promotrice puis elle s'associe avec l'ARN polymérase II processive dans la région transcrite du gène (Mateescu et al., 2008).

f) Fonctions physiologiques des protéines HP1

Différentes études ont mis en évidence que les protéines HP1 exercent aussi des fonctions essentielles au cours du développement. Chez *C. elegans*, les deux homologues des protéines HP1, HPL-1 et HPL-2 sont en effet importantes, car HPL-2 est requise dans les cellules germinales pour le développement des gonades somatiques et l'induction normale de la vulve (Couteau et al., 2002; Schott et al., 2009) et HPL-1 semble exercer un rôle important au cours du développement post-embryonnaire. L'inactivation des deux protéines HPL-1 et HPL-2 est en effet létale à l'état de larves (Schott et al., 2006). De même chez la drosophile, des mutations dans le gène *Su(var)2-5* qui code pour HP1a provoquent un phénotype de létalité à l'état de larves (Eissenberg et Hartnett, 1993) et, des expériences d'inactivation des protéines HP1 par ARN interférence ont permis d'établir que cette létalité affecte principalement les drosophiles mâles et cause des défauts importants au niveau des chromosomes (Liu et al., 2005). Des études récentes chez la souris ont mis aussi en évidence l'importance fonctionnelle de HP1 β : l'inactivation du gène *Cbx1* qui code pour HP1 β chez la souris est en effet associée à des défauts de développement au niveau du cortex neuromusculaire et cérébral et à une létalité périnatale (Aucott et al., 2008).

4. Dynamique des interactions des protéines HP1

Pendant longtemps, l'hétérochromatine a été considérée comme une région inerte et condensée, dans laquelle les protéines HP1 bloquent l'accès à la machinerie de transcription et aux activateurs en étant associées de manière statique à la chromatine. Mais des expériences de FRAP (« *Fluorescence Recovery After Photobleaching* ») réalisées dans des cellules vivantes, ont montré qu'à l'inverse de cette vision statique, les différents isotypes des protéines HP1 sont en fait extrêmement mobiles et peuvent s'échanger rapidement aussi bien au niveau des régions d'hétérochromatine que des régions d'euchromatine (Cheutin et al., 2003, Festenstein et al., 2003).

Des études récentes utilisant la technique de FRET (« *Förster Resonance Energy Transfer* ») dans les cellules F9 de carcinome embryonnaire, ont mis également en évidence la dynamique de ses interactions entre les différents isotypes des protéines HP1 et le corépresseur TIF1 β au cours de la différenciation cellulaire (Cammass et al., 2007). Dans les cellules F9 non différenciées, TIF1 β interagit en effet directement avec les protéines HP1 β et HP1 γ au niveau de l'euchromatine, alors que dans les cellules différenciées, TIF1 β interagit préférentiellement avec HP1 β au niveau de l'hétérochromatine et avec HP1 γ au niveau de l'euchromatine. Il semble que l'interaction différentielle entre TIF1 β et HP1 β soit modulée par une phosphorylation/déphosphorylation de TIF1 β au niveau de la sérine 473 par la protéine kinase PKC δ (Chang et al., 2008). De même, un échange dynamique entre les protéines HP1 γ et HP1 α a été observé au niveau du promoteur *E2F1* qui est important pour la répression de gènes contrôlant la différenciation neuronale terminale (Panteleeva et al., 2007).

V. La famille des facteurs intermédiaires de transcription TIF1

La famille des facteurs intermédiaires de transcription TIF1 (*Transcriptional Intermediary Factor 1*) est conservée de la drosophile à l'homme et compte actuellement quatre membres identifiés chez les mammifères : TIF1 α (Le Douarin et al., 1995), TIF1 β (Friedman et al., 1996; Kim et al., 1996; Le Douarin et al., 1996; Moosmann et al., 1996), TIF1 γ (Venturini et al., 1999) et TIF1 δ (Khetchoumian et al., 2004), auxquels s'ajoutent trois orthologues : Bonus chez la drosophile (Beckstead et al., 2001), Ectodermine chez le Xénope (Dupont et al., 2005) et Moonshine chez le poisson zèbre (Ransom et al., 2004). Les données actuelles attribuent à cette famille des fonctions de régulateurs chromatinien (Le Douarin et al., 1996; Nielsen et al., 1999; Cammas et al., 2002; Cammas et al., 2004) qui sont impliqués dans le développement embryonnaire (TIF1 β , TIF1 γ et Bonus), la spermatogenèse (TIF1 β et TIF1 δ), l'hématopoïèse (moonshine) et l'oncogenèse (TIF1 α et TIF1 γ).

Ces protéines de la famille TIF1 participent au contrôle de l'activité transcriptionnelle de plusieurs familles de facteurs de transcription : les récepteurs nucléaires (TIF1 α), les facteurs de transcription à domaine « KRAB » (TIF1 β) ainsi que les protéines SMAD (TIF1 γ) (Le Douarin et al., 1996; Friedman et al., 1996; Dupont et al., 2005).

1. Les caractéristiques communes des protéines TIF1

a) La structure modulaire

Les protéines TIF1 ont une structure modulaire caractéristique que l'on peut diviser en trois régions principales : la région N-terminale qui comprend un motif RBCC (*Ring finger, B boxes, Coiled Coil*) ou « TRIM motif » (*Tripartite Motif*), la région centrale et la région C-terminale qui comprend un « PHD finger » (*Plant HomeoDomain*) et un bromodomaine (**figure 27**).

i. Le domaine « RBCC »

Le domaine RBCC ou « TRIM motif », situé en région N-terminale, est formé d'un motif en doigt de zinc de type Ring finger (*Really Interesting New Gene*) et de deux domaines structuraux en doigt de zinc appelés B-Boxes, associés à un domaine de dimérisation en hélice α de type « coiled coil » (**figure 27**). Le domaine RBCC est retrouvé

dans plus d'une centaine de protéines et sert de surface d'interaction protéine-protéine. Dans la protéine TIF1 β , il a été montré par exemple que ce domaine est nécessaire et suffisant pour l'homo-oligomérisation de TIF1 β et son interaction avec le domaine de répression KRAB (*KRüppel-Associated Box*) (Peng et al., 2000). Des expériences d'immunocytochimie ont montré qu'un grand nombre de protéines contenant le domaine TRIM ont un profil de localisations sub-cellulaires spécifiques, suggérant une implication de ce motif dans la distribution sub-cellulaire (Reymond et al., 2001). Par ailleurs, il a été démontré que le domaine RING confère une activité E3 ubiquitine-ligase à plusieurs membres de la famille de protéines à domaine RBCC, suggérant une implication du domaine RING dans le processus d'ubiquitination (pour revue Meroni et Diez-Roux, 2005). Il a été démontré par exemple que TIF1 γ est capable d'ubiquitinyler le facteur de transcription Smad4 (Dupont et al., 2005).

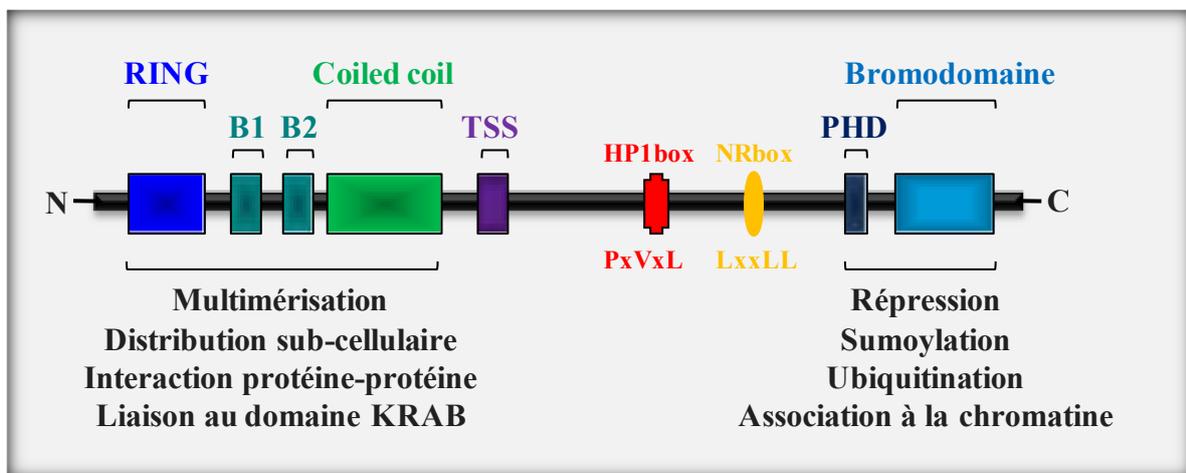


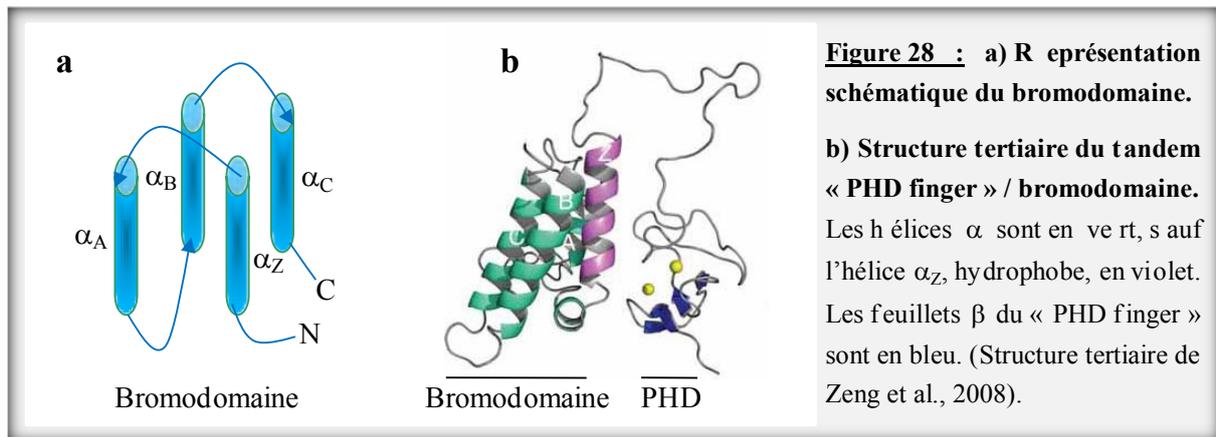
Figure 27 : Structure modulaire des protéines TIF1.

ii. Le « PHD finger » et le bromodomaine

Le « PHD finger » et le bromodomaine, situés en partie C-terminale (**figure27**), sont deux motifs souvent associés en tandem et spécifiques de protéines connues pour être des régulateurs chromatinien (Aasland et al., 1995; Zeng et Zhou, 2002). Les protéines du groupe Polycomb et Trithorax possèdent par exemple de multiples « PHD finger » (Aasland et al., 1995) qui sont impliqués dans le maintien des états réprimés ou actifs de la chromatine après les divisions cellulaires (pour revues, Ringrose et Paro, 2007; Schwartz et Pirrotta, 2008). Ce domaine, constitué d'environ 60 acides aminés, est caractérisé par sept cystéines et une histidine disposées selon le consensus C4HC3 et repliées en un motif de type doigt de

zinc grâce à la coordination de deux atomes de zinc (Aasland et al., 1995; Capili et al., 2001) (**figure 28**). Ce domaine permet parfois de lier des groupements phosphoinositides (Gozani et al., 2003). Il constitue aussi un motif d'interaction spécifique avec la lysine 4 triméthylée de l'histone H3 (Li et al., 2006; Peña et al., 2006; Shi et al., 2006) et dans le cas de TIF1 β , ce domaine confère une activité E3-ubiquitine ligase (Wang et al., 2005; Ivanov et al., 2007).

Le bromodomaine est constitué d'environ 110 acides aminés repliés en quatre hélices α amphipathiques (hélices α_Z , α_A , α_B , α_C) et est retrouvé dans de nombreuses histone acétyltransférases ainsi que dans de nombreux facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants (Jeanmougin et al., 1997; Mujtaba et al., 2007) (**figure 28**). Il est capable de reconnaître par exemple les lysines 16 et 19 acétylées de l'histone H4 (Dhalluin et al., 1999).



Il a été démontré récemment que dans le cas de TIF1 β , le « PHD finger » et le bromodomaine forment une entité fonctionnelle de répression et de sumoylation (Schultz et al., 2001; Ivanov et al., 2007; Zeng et al., 2008).

iii. La région centrale

Dans la région centrale, on retrouve juste en aval du motif « coiled-coil », une petite séquence de 25 acides aminés riche en tryptophane et en phénylalanine. Cette séquence n'est actuellement associée à aucune fonction, mais elle est très conservée entre les membres de la famille TIF1 et ne présente aucune homologie avec d'autres protéines. Elle semble donc propre aux protéines de la famille TIF1 et a été nommée par conséquent TSS pour *TIF1 Signature Sequence* (Venturini et al., 1999) (**figure 27**). La région centrale entre le TSS et le PHD/Bromodomaine est moins conservée entre les membres de la famille TIF1. Cette région comprend un motif de reconnaissance pour les récepteurs nucléaires (motif LxxLL appelé

aussi « NR box ») dans le cas de TIF1 α et de Bonus, et un motif de reconnaissance pour les protéines de l'hétérochromatine HP1 (motif PxVxL appelé aussi « HP1 box ») dans le cas de TIF1 α , TIF1 β et TIF1 δ (**figure 27**).

b) La capacité de répression intrinsèque

Des expériences de transfection transitoire ont démontré que toutes les protéines TIF1 répriment la transcription lorsqu'elles sont cibées artificiellement au niveau du promoteur d'un gène rapporteur grâce à une fusion avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD) du transactivateur de levure GAL4 (Le Douarin et al., 1996; Moosmann et al., 1996; Venturini et al., 1999; Beckstead et al., 2001; Khetchoumian et al., 2004). Cette fonction de répression s'exerce via la déacétylation des histones car un traitement à la trichostatine A, un inhibiteur des HDAC, empêche la répression exercée par les protéines TIF1 (Nielsen et al., 1999) (**figure 29**).

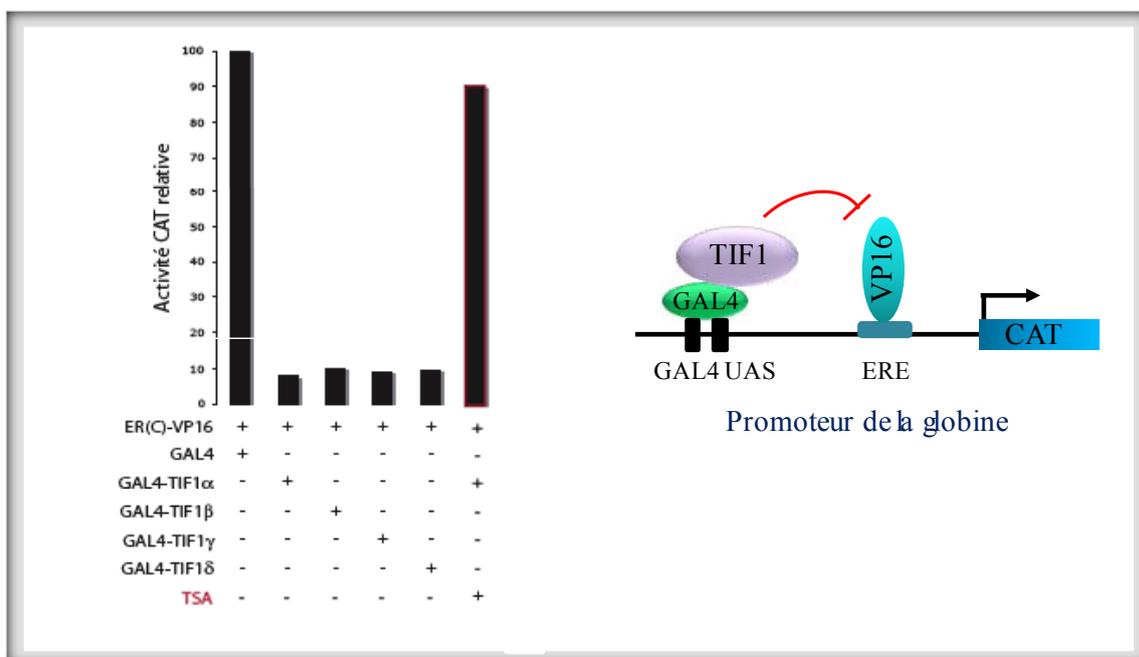


Figure 29 : Fonction de répression intrinsèque par les protéines TIF1.

TSA : Trichostatine A, inhibiteur des HDAC. UAS : Upstream Activating Sequence

c) Identité/similarité des protéines TIF1

Les protéines TIF1 présentent entre 30 et 50% d'identité de séquence peptidique et les membres les plus proches sont TIF1 α et TIF1 γ avec 54% d'identité (**tableau 10**). Malgré leur

structure modulaire et certaines fonctions communes, les protéines TIF1 ont des partenaires d'interaction différents et par conséquent aussi des fonctions spécifiques.

	TIF1 β	TIF1 γ	TIF1 δ
TIF1 α	32/54	54/69	35/56
TIF1 β		33/56	29/50
TIF1 γ			37/57

Tableau 10 : Pourcentage d'identité/similarité entre les protéines TIF1.

2. Les fonctions spécifiques des protéines TIF1

a) TIF1 α

i. Identification

TIF1 α , encore appelé TRIM24 est le membre fondateur de la famille TIF1. Il a été cloné par complémentation fonctionnelle dans la levure, sur la base de sa capacité à interagir avec le domaine AF-2 du récepteur nucléaire RXR γ (Le Douarin et al., 1995). Il a été démontré ensuite capable d'interagir avec la structure holo de tous les récepteurs nucléaires testés, tels que les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR : *Retinoic Acid Receptor* et RXR : *Retinoid X Receptor*), de la vitamine D3 (VDR : *Vitamin D Receptor*), des œstrogènes (ER : *Estrogen Receptor*), des progestatifs (PR : *Progesterone Receptor*) ainsi que les récepteurs thyroïdiens (TR : *Thyroid hormone Receptor*). Ces interactions ont été démontrées aussi bien *in vitro* (par GST pull-down) que dans la levure (par double hybride) ou dans les cellules de mammifères (colocalisation). L'interaction se fait par l'intermédiaire du motif LxxLL ou « NR box » de TIF1 α et requiert l'intégrité du domaine d'activation AF-2 des récepteurs nucléaires (Le Douarin et al., 1996) (**figure 27**). L'interaction entre TIF1 α et les récepteurs nucléaires ne se fait qu'en présence du ligand et est bloquée par des antagonistes (Le Douarin et al., 1995; vom Baur et al., 1996). Dans la famille TIF1, cette interaction avec les récepteurs nucléaires est spécifique de TIF1 α et de son orthologue Bonus chez la drosophile.

ii. Fonctions de TIF1 α

Au laboratoire, il a été démontré que TIF1 α exerce un rôle physiologique fondamental dans la suppression de la tumorigenèse hépatique (Ketchoumian et al., 2007). Les souris

invalidées pour TIF1 α développent en effet spontanément des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires (HCC : *HepatoCellular Carcinoma*). De façon importante, il a été démontré que la délétion d'un seul allèle de RAR α est suffisante pour supprimer le phénotype tumoral des souris invalidées pour TIF1 α . Ces résultats ont apporté des évidences génétiques que TIF1 α et RAR α exercent des fonctions opposées dans le développement du cancer du foie (Khetchoumian et al., 2007).

Des études plus récentes ont démontré aussi que les souris invalidées pour TIF1 α développent des calcifications artérielles qui sont corrélées à une hyperactivation de la signalisation induite par les récepteurs de la vitamine D (VDR) dans le rein (Ignat et al., 2008). TIF1 α semble ainsi être impliqué dans la régulation négative de multiples voies de signalisation dépendantes des récepteurs nucléaires.

b) TIF1 γ

TIF1 γ (aussi connu sous le nom de TRIM33) a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cellules HepG2 par hybridation avec un fragment d'ADNc de TIF1 α (Venturini et al., 1999). Il possède, comme les autres membres de la famille, une capacité de répression intrinsèque (**figure 29**) mais n'interagit ni avec les récepteurs nucléaires, ni avec les KRAB-ZFP (*KRüppel Associated Box-Zinc Finger Protein*) et les protéines HP1 (Venturini et al., 1999). Il joue par contre un rôle essentiel dans la voie de signalisation du TGF β , en interagissant au niveau de sa région centrale, avec les protéines Smad2 et Smad3 (Dupont et al., 2005; He et al., 2006). L'association de TIF1 γ avec les protéines Smad2/3 permet de stimuler la différenciation des cellules érythroïdes en réponse au TGF β (He et al., 2006). TIF1 γ est également un compétiteur de Smad4 pour la liaison des Smad2/3 qui possède une activité E3 ubiquitine ligase impliquée dans l'ubiquitination et la dégradation de Smad4 (Dupont et al., 2005). Le contrôle du niveau protéique de Smad4 par TIF1 γ permet de limiter l'action du TGF β dans les cellules épithéliales et est importante au cours du développement précoce des embryons de xénope (Dupont et al., 2005).

c) TIF1 δ

TIF1 δ a été découvert au laboratoire par une analyse bioinformatique de type BLAST (*Basic Local Alignment and Search Tool*) de banques de données (Khetchoumian et al., 2004). Il présente toutes les caractéristiques structurales des protéines TIF1 et possède une

activité de répression intrinsèque dépendante de la déacétylation des histones (**figure 29**). Il est capable d'interagir avec les protéines HP1 par l'intermédiaire de son motif « HP1 box » mais ne peut pas se lier aux récepteurs nucléaires ni au KRAB-ZFP. Le patron d'expression de TIF1 δ est très restreint car il semble exprimé uniquement dans les testicules, au niveau des spermatides en cours d'élongation (Khetchoumian et al., 2004). TIF1 δ pourrait ainsi jouer un rôle dans l'extinction des gènes au cours des phases post-meïotiques de la spermatogénèse.

d) Les orthologues Bonus et Moonshine

Bonus est l'unique orthologue de ses protéines TIF1 chez la drosophile. Ses caractéristiques structurales sont les mêmes que celles des autres TIF1, et il possède une activité de répression intrinsèque (Beckstead et al., 2001). Il interagit par l'intermédiaire de sa « NR box » avec β FTZ-F1 (*β Fushi TaraZu Factor 1*), l'orthologue du récepteur nucléaire LRH1 (*Liver Receptor Homolog 1*) chez la drosophile. Bonus est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de β FTZ-F1 et il exerce des fonctions importantes au cours du développement et de la métamorphose de la drosophile (développement de la tête, formation des ailes, des pattes et des yeux...) (Beckstead et al., 2001).

Moonshine est l'orthologue de TIF1 γ chez le poisson zèbre qui joue un rôle essentiel au cours de l'hématopoïèse (Ransom et al., 1996). Il a en effet été identifié par un crible génétique de mutants incapables d'accomplir l'hématopoïèse et, des mutations au niveau du gène *moonshine* provoquent de sévères défauts de différenciation de cellules érythroïdes et une aplasie sévère des globules rouges (Ransom et al., 1996).

3. TIF1 β

a) Identification

TIF1 β , encore appelé KAP-1 (*KRAB-ZFP Associated Protein 1*), KRIP-1 (*KRAB-A Interacting Protein 1*) ou Trim28, a été identifié par des cribles double-hybride en utilisant comme appât soit la protéine HP1 α (Le Douarin et al., 1996), soit le domaine KRAB A (*KRüppel-Associated Box A*) de facteurs de transcription Kid-1 (*Kidney Ischemia and Developmentary regulated gene 1*) (Kim et al., 1996) et KOX1 (Moosmann et al., 1996).

b) TIF1 β : le corépresseur universel des KRAB-ZFP

Le domaine « KRAB » est l'un des domaines régulateurs de la transcription les plus représentés chez les mammifères. Les facteurs de transcription à domaine « KRAB » ont en effet été découverts en 1991 (Bellefroid et al., 1991; Thiesen et al., 1991) et cette famille comprend actuellement 423 gènes identifiés dans le génome humain (Huntley et al., 2006). Ce domaine « KRAB » est apparu de façon tardive au cours de l'évolution car il est retrouvé uniquement dans le génome des vertébrés tétrapodes (grenouille, poulet, souris et homme) mais pas chez la levure, les plantes la drosophile et le poisson (Looman et al., 2002). Chez la souris, la conservation de ce domaine n'est pas très importante, car seulement 112 gènes orthologues ont été retrouvés conservés (Huntley et al., 2006). Cette famille de facteurs de transcription contient en position N-terminale un domaine de répression « KRAB » et en position C-terminale un domaine de liaison à l'ADN constitué de 4 à plus de 30 motifs en doigt de zinc de type C2H2 ou Krüppel (Bellefroid et al., 1991) (**figure 30**). Cette structure leur confère l'appellation de KRAB-ZFP (pour *K*Rüppel *A*ssociated *B*ox-*Z*inc *F*inger *P*rotein). Ce domaine est l'un des domaines de répression transcriptionnelle les plus efficaces, capable de propager la répression sur des distances de plus de 3 kb le long de la fibre chromatinienne (Deuschle et al., 1995). Il consiste en une région de 50 à 70 acides aminés qui peut être divisée en deux parties : le domaine « KRAB A » et le domaine « KRAB B ». Le domaine « KRAB A » est très conservé parmi les membres de la famille et est nécessaire et suffisant pour l'activité de répression transcriptionnelle (Abrink et al., 2001). Le domaine « KRAB B » est plus variable et parfois absent dans certaines sous-familles des protéines à domaine « KRAB ». Il n'a pas d'activité intrinsèque, mais il potentialise l'activité de répression du domaine « KRAB A » (Vissing et al., 1995). La découverte d'un troisième domaine, le domaine « KRAB C », a défini une nouvelle sous-famille de protéines à domaine « KRAB ». Ce domaine ne participe pas à l'activité de répression du domaine « KRAB A » mais favorise son interaction avec TIF1 β (Looman et al., 2003).

A ce jour, toutes les protéines à domaine « KRAB » testées interagissent spécifiquement avec TIF1 β (Friedman et al., 1996; Kim et al., 1996; Moosmann et al., 1996; Urrutia, 2003). De plus, il a été démontré que l'interaction entre TIF1 β et le domaine « KRAB » potentialise l'activité de répression des KRAB-ZFP (Abrink et al., 2001; Friedman et al., 1996). Sur la base de ces données, TIF1 β a été défini comme étant un corépresseur universel des facteurs de transcription à domaine « KRAB ».

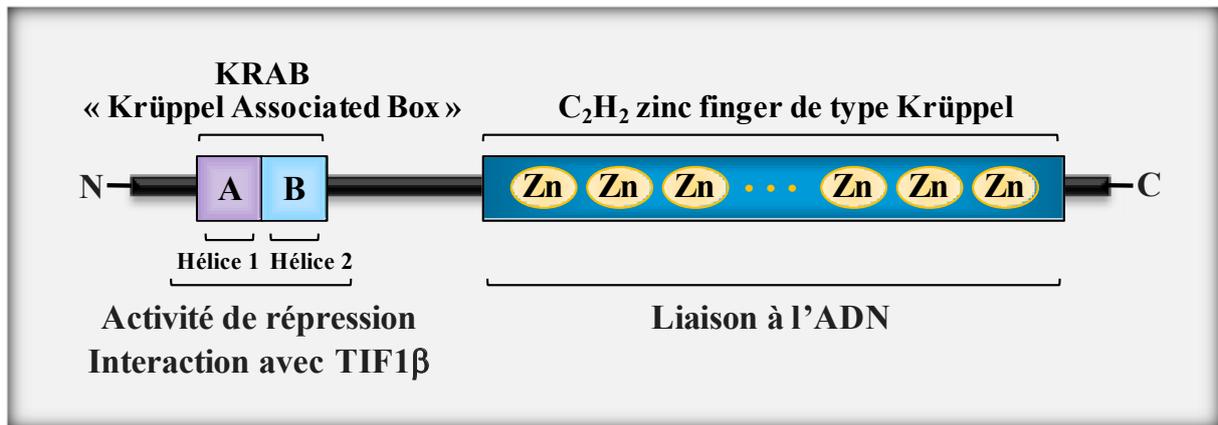


Figure 30 : Les KRAB-ZFP : des protéines à doigt de zinc et à domaine « KRAB ».

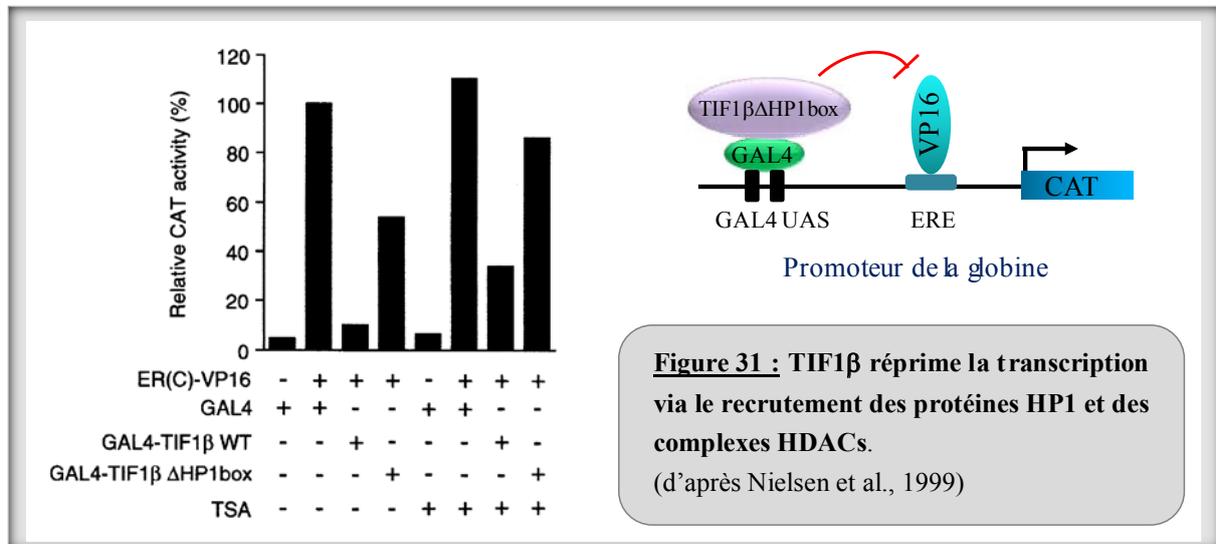
Des études récentes, utilisant les puces à ADN notamment, permettent peu à peu de mieux caractériser les gènes cibles des KRAB-ZFP (pour revue, Koczan et Thiesen, 2006). À l'heure actuelle, aucune relation directe n'a été démontrée entre les protéines à domaine « KRAB » et une pathologie humaine, mais la localisation chromosomique de certaines de ces protéines en fonction de scénarios candidats potentiellement responsables de pathologies développementales et néoplasiques précoces (Wiznerowicz et al., 2007). Certaines KRAB-ZFP interviennent aussi dans la suppression de voies de signalisation de suppresseurs de tumeurs p21 et p53 (Li et al., 2007b) et dans la voie de signalisation MAP kinases (Li et al., 2008). L'utilisation de la technique de CHIP on chip dans les cellules ES a mis aussi en évidence que les gènes cibles primaires de TIF1β seraient des gènes impliqués principalement dans le cycle cellulaire, la mort cellulaire et le cancer (Hu et al., 2009).

c) Rôle de TIF1β dans la répression transcriptionnelle

i. Interaction avec les protéines HP1

L'interaction entre TIF1β et les HP1 a été mise en évidence par des cribles double-hybrides qui ont permis la découverte de TIF1β (Le Douarin et al., 1996), puis elle a été confirmée par la suite *in vitro* et *in vivo* par co-immunoprécipitation dans des cellules de mammifères (Nielsen et al., 1999; Ryan et al., 1999). L'interaction de TIF1β avec les trois isotypes des protéines HP1 se fait via son motif HP1 box et est requise pour l'activité de répression de TIF1β (Nielsen et al., 1999; Ryan et al., 1999). La délétion du motif HP1 box

conduit en effet à une forte diminution de l'activité intrinsèque de TIF1 β au niveau d'un gène rapporteur (Nielsen et al., 1999) (**figure 31**). Cette perte d'interaction entre TIF1 β et les HP1 réduit aussi l'activité de répression du complexe TIF1 β /KRAB-ZFP (Ryan et al., 1999).



ii. Recrutement de complexes de remodelage et de modification des histones

Plusieurs études récentes ont démontré que d'autres complexes interagissent avec TIF1 β et participent à la répression induite par les KRAB-ZFP. Il a été mis en évidence par exemple que TIF1 β fait partie de deux complexes répresseurs de remodelage de la chromatine à activité histone déacétylase : le complexe NuRD/HDAC1, en interagissant avec la sous-unité Mi2 α (Schultz et al., 2001), et le complexe N-CoR1/HDAC3 qui comprend plusieurs facteurs de la famille du complexe SWI/SNF (Underhill et al., 2000). TIF1 β est également capable d'interagir avec l'histone méthyltransférase SETDB1 spécifique de la lysine 9 de l'histone H3 (Schultz et al., 2002), par l'intermédiaire de son domaine PHD finger/Bromodomaine. De plus, il a été démontré récemment que le « PHD finger » de TIF1 β est impliqué dans la sumoylation du bromodomaine adjacent, et que cette modification est importante pour le recrutement de SETDB1 et du complexe NuRD lors de la répression exercée par TIF1 β (Ivanov et al., 2007; Zeng et al., 2008).

L'ensemble de ces données confèrent à TIF1 β un rôle potentiel de « plate-forme » moléculaire pour le recrutement à l'ADN de molécules impliquées dans la formation de structures condensées, transcriptionnellement inactives de type hétérochromatine. Le modèle suivant a ainsi été proposé (**figure 32**) : les KRAB-ZFP reconnaissent leurs séquences cibles

et recrutent TIF1 β . Celui-ci va alors recruter à son tour les protéines HP1 et les complexes répresseurs dont les activités enzymatiques vont conduire à la déacétylation et la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3. Cela crée ainsi un nouveau site de liaison pour les protéines HP1 et un environnement favorable pour la propagation de la répression. L'interaction entre TIF1 β et les HP1 permet ainsi la formation d'une structure de type hétérochromatine au niveau du promoteur de s gènes cibles et/ou le recrutement de s gènes cibles au niveau des compartiments d'hétérochromatine constitutive (Schultz et al., 2001; Schultz et al., 2002; Cammas et al., 2002). Des études réalisées grâce à un système rapporteur intégré ont apporté des éléments en faveur de ce modèle et ont permis de démontrer que l'ensemble de ces événements permet une répression stable capable d'être maintenue pendant plusieurs générations (Ayyanathan et al., 2003; Sripathy et al., 2006).

Cependant, une étude récente réalisée dans les cellules Ntera2 humaines a montré que seulement 25% des sites de liaison de TIF1 β aux promoteurs des gènes cibles sont également enrichis en triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3, site caractéristique de liaison des protéines HP1 (O'Geen et al., 2007). Cela suggère que l'interaction de TIF1 β avec les protéines HP1 n'est pas toujours requise, et que TIF1 β pourrait exercer sa fonction répressive par différents mécanismes.

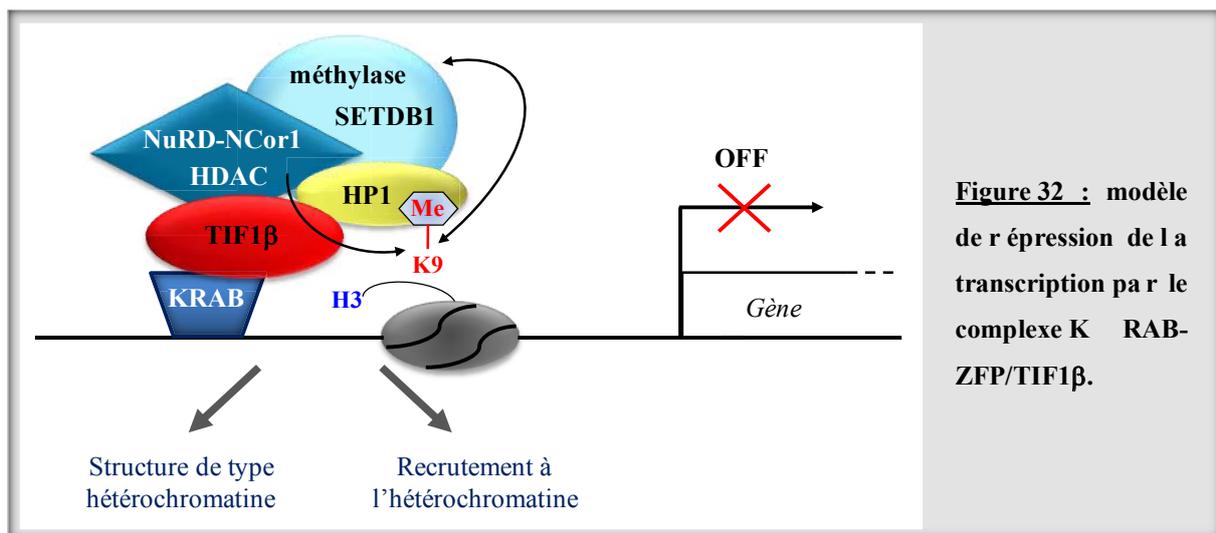


Figure 32 : modèle de répression de la transcription par le complexe KRAB-ZFP/TIF1 β .

iii. Rôle de TIF1 β au cours de l'apoptose et de la réparation de l'ADN

La découverte récente de nouveaux partenaires protéiques de TIF1 β suggère que TIF1 β peut également réprimer la transcription par un mécanisme qui ne dépend pas de son interaction avec les protéines HP1. TIF1 β , par l'intermédiaire de son motif « coiled coil », est

en effet capable d'interagir avec l'E3 ubiquitine ligase MDM2 (*Mouse Double Minute chromosome 2*) et participe à l'ubiquitination et à la dégradation du suppresseur de tumeur p53 (Wang et al., 2005). Il coopère avec MDM2 pour stimuler la formation d'un complexe p53-HDAC1 et favoriser ainsi la déacétylation puis l'ubiquitination et la dégradation de p53. L'interaction entre TIF1 β et MDM2 permet ainsi de réprimer p53 et de protéger les cellules des effets apoptotiques de p53 (Wang et al., 2005). Une autre étude a montré que p53 peut être réprimé par un mécanisme similaire, grâce à une interaction entre TIF1 β et la KRAB-ZFP Apak (*ATM and p53-associated KZNF protein*) (Tian et al., 2009). La protéine Apak réprime en effet des gènes pro-apoptotiques et régule négativement p53 en recrutant un complexe TIF1 β -HDAC1 favorable à la déacétylation de p53. La phosphorylation de Apak et de TIF1 β par la kinase ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) permet leur dissociation de p53 et l'induction de l'apoptose (Tian et al., 2009).

Plusieurs études ont démontré que TIF1 β joue aussi un rôle au cours de la réparation de l'ADN. En réponse à une cassure d'ADN double brin, TIF1 β est en effet recruté et phosphorylé par la protéine kinase ATM au niveau des dommages de l'ADN (White et al., 2006; Ziv et al., 2006). Après phosphorylation, TIF1 β diffuse rapidement dans le noyau et induit une relaxation globale de la chromatine. En perturbant la structure de la chromatine, TIF1 β semble ainsi faciliter la réparation des cassures double brins au niveau des régions condensées et généralement inaccessibles de l'hétérochromatine (Goodarzi et al., 2008). Il a été montré aussi que cette relaxation est essentielle pour l'activation de p53 par la kinase ATM en réponse au dommage de l'ADN (Shiloh, 2003; Ziv et al., 2006). De façon similaire, TIF1 β est également capable d'interagir avec le facteur de transcription E2F1 impliqué dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Wang et al., 2007). Le facteur E2F1 est activé lors des dommages de l'ADN par un mécanisme dépendant de la protéine kinase ATM. L'activité transcriptionnelle de ce facteur de transcription est réprimée par TIF1 β qui stimule la formation d'un complexe E2F1-HDAC1 et la déacétylation de E2F1 (Wang et al., 2007). L'ensemble de ces résultats suggère que TIF1 β est impliqué dans la réponse cellulaire face aux dommages de l'ADN et au stress cellulaire.

Par ailleurs, il a été démontré que TIF1 β est impliqué dans les voies de signalisation IFN/STAT1 et IL6/STAT3 en interagissant avec STAT1 et STAT3 (Kamitani et al., 2008; Tsuruma et al., 2008). Dans ces deux cas, TIF1 β coopère également avec des HDAC pour réprimer ces voies de signalisation. Ces résultats suggèrent que TIF1 β est un répresseur

général de plusieurs voies de transduction de signal des cytokines. De plus, STAT1 et STAT3 sont impliqués dans de nombreux processus biologiques; en particulier, STAT1 joue un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire et possède une activité de suppresseur de tumeur (Stephanou et Latchman, 2003). Cela suggère que TIF1 β pourrait être impliqué dans le développement de certains cancers.

iv. Rôle de TIF1 β dans la répression des rétrovirus

Il a été découvert récemment que TIF1 β intervient dans la répression épigénétique de la transcription des rétrovirus, au niveau des cellules souches embryonnaires (ESC) et de cellules de carcinome embryonnaire (EC) (Wolf et Goff, 2007; Wolf et al., 2008). TIF1 β reconnaît en effet une région bien précise, la région PBS (pour *Primer Binding Site*) dans le LTR (*Long Terminal Repeat*) des rétrovirus M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) et réprime leur transcription. La répression de ces éléments nécessite une interaction entre TIF1 β et les protéines HP1, et il est très vraisemblable que des histones méthyltransférases ainsi que le complexe NuRD interviennent aussi dans ce mécanisme de répression (Wolf et Goff, 2007; Wolf et al., 2008). Une KRAB-ZFP, la protéine ZFP809 a aussi été identifiée et réprime les séquences provirales en interagissant avec TIF1 β (Wolf et Goff, 2009). L'ensemble de ces découvertes démontre que TIF1 β est impliqué dans la répression des provirus et rétrovirus, en particulier les virus à LTR, et suggère que TIF1 β joue un rôle important dans les mécanismes de défense immunitaire des cellules souches contre les infections virales.

d) Rôle de TIF1 β dans l'activation transcriptionnelle

En plus de son rôle dans la répression transcriptionnelle, TIF1 β pourrait également être impliqué dans l'activation de la transcription. TIF1 β a en effet été identifié récemment par spectrométrie de masse au sein d'un complexe contenant le récepteur nucléaire orphelin NGFI-B (*Nerve Growth Factor IB*). Il interagit directement avec NGFI-B et agit comme un coactivateur en stimulant l'activation de la transcription des gènes cibles de NGFI-B (Rambaud et al., 2009).

e) Les modifications post-traductionnelles de TIF1 β

Plusieurs études ont montré que la région C-terminale de TIF1 β peut être modifiée par phosphorylation et sumoylation. Comme cela a déjà été décrit, la protéine kinase ATM peut phosphoryler TIF1 β sur la sérine 824 en réponse à des cassures double brin dans l'ADN. Cette phosphorylation de TIF1 β permet une décondensation globale de la chromatine qui facilite l'accès des protéines de réparation de l'ADN aux dommages (White et al., 2006; Ziv et al., 2006). D'autre part, la protéine kinase PKC δ peut aussi phosphoryler la sérine 473 de TIF1 β à proximité du motif « HP1 box ». Cette phosphorylation est impliquée dans l'association de TIF1 β avec la protéine HP1 β et permet l'expression de régulateurs importants du cycle cellulaire et de la prolifération (Chang et al., 2008).

Par ailleurs, des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier six sites potentiels de sumoylation dans la séquence de TIF1 β : les lysines 554, 575, 676, 750, 779 et 804. Cette modification est nécessaire à l'activité de répression et au recrutement des complexes de déacétylation des histones (Lee et al., 2007; Masclé et al., 2007). En particulier, la sumoylation des lysines 554, 779 et 804 stimule le pouvoir répressif de TIF1 β et permet le recrutement de SETDB1 et de la sous-unité CHD3 (Chromodomain Helicase DNA-binding protein 3) du complexe NuRD (Ivanov et al., 2007; Zeng et al., 2008). De plus, la phosphorylation de la sérine 824 par ATM semble avoir un effet antagoniste de la sumoylation du même résidu et permettre ainsi l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose, en réponse aux stress génotoxiques (Li et al., 2007c). Ces résultats suggèrent que les modifications post-traductionnelles de TIF1 β constituent un mécanisme important de régulation de son activité transcriptionnelle.

f) Les rôles physiologiques de TIF1 β

i. Le développement embryonnaire

Chez la souris, l'inactivation totale du gène codant pour TIF1 β conduit à une létalité très précoce au cours du développement embryonnaire. Les embryons *TIF1 β ^{-/-}* se développent normalement jusqu'au stade blastocyste puis s'implantent correctement dans la paroi utérine. Ils manifestent ensuite un retard de développement important à environ 5.5 jpc (jours post coïtum), stade auquel s'initie normalement la gastrulation, et sont complètement résorbés à 8.5 jpc. Les embryons mutants sont caractérisés par l'absence de formation du mésoderme,

caractéristique de la gastrulation (Cammass et al., 2000) (**figure 33**). Ces résultats indiquent que TIF1 β est essentiel au développement embryonnaire précoce, en particulier pour la régulation de gènes indispensables à l'initiation de la gastrulation.

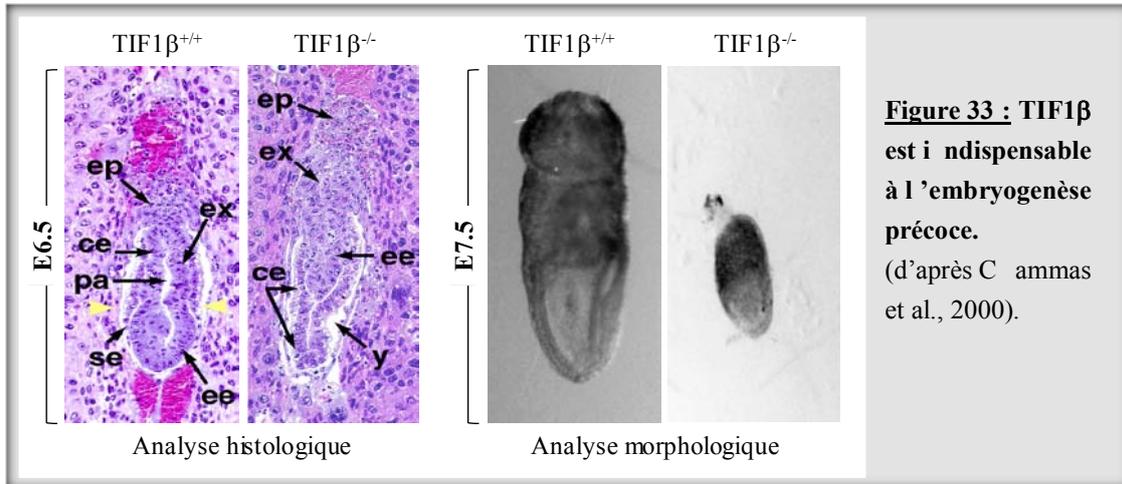


Figure 33 : TIF1 β est indispensable à l'embryogenèse précoce.
(d'après Cammass et al., 2000).

ii. La spermatogenèse

TIF1 β joue aussi un rôle essentiel au cours de la spermatogenèse où il est exprimé pendant une période bien définie correspondant à la maturation des spermatocytes pachytènes en spermatides allongées (Weber et al., 2002). Il est exprimé dans les spermatides rondes, les spermatides en cours d'élongation, les cellules de Sertoli et les spermatocytes; de façon intéressante, TIF1 β est associé préférentiellement aux structures hétérochromatiniennes de ces cellules. L'inactivation conditionnelle de TIF1 β dans la lignée germinale mâle n'affecte pas la différenciation des spermatocytes en spermatides ronds puis en spermatozoïdes mais les tubes séminifères *Tf11 β ^{-/-}* dégénèrent, avec une disparition totale des cellules germinales (Weber et al., 2002) (**figure 34**). TIF1 β exerce donc des fonctions indispensables à la spermatogenèse chez la souris.

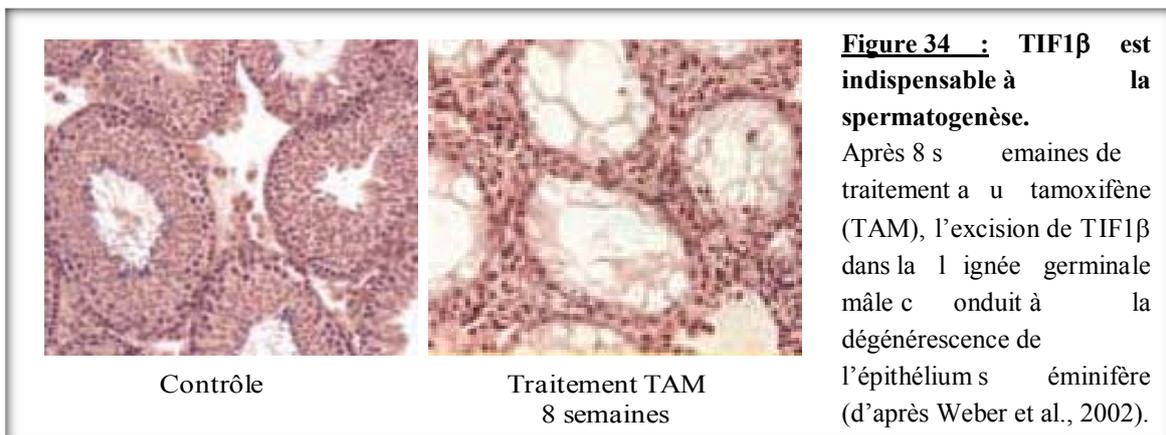


Figure 34 : TIF1 β est indispensable à la spermatogenèse.

Après 8 semaines de traitement au tamoxifène (TAM), l'excision de TIF1 β dans la lignée germinale mâle conduit à la dégénérescence de l'épithélium séminifère (d'après Weber et al., 2002).

iii. TIF1 β et la réponse comportementale

TIF1 β est aussi impliqué dans la réponse comportementale chez l'adulte en jouant un rôle important dans le cerveau et les neurones (Jakobsson et al., 2008). Il est en effet fortement exprimé dans l'hippocampe, le cer velet, les neurones et dans l'ensemble du cerveau. L'inactivation totale du gène codant pour TIF1 β dans les neurones des souris adultes provoque un phénotype d'hypersensibilité et de perte de mémoire spatiale et temporelle en réponse au stress (Jakobsson et al., 2008). TIF1 β et les KRAB-ZFP pourraient ainsi être impliqués dans le contrôle épigénétique de l'expression de gènes au niveau de l'hippocampe et conditionner la réponse comportementale aux stress ainsi que les capacités cognitives.

g) TIF1 β , un régulateur essentiel de la différenciation cellulaire

Afin de mieux comprendre au niveau moléculaire et cellulaire les fonctions physiologiques de TIF1 β et de son interaction avec les protéines HP1, des études dans un modèle de différenciation cellulaire *in vitro* ont été entreprises au laboratoire. Les cellules F9, dérivées de carcinome embryonnaire murin, ont été choisies car elles constituent un modèle bien établi du développement embryonnaire précoce et de la différenciation (Hogan, 1976; Strickland et Mahdavi, 1978; Strickland et al., 1980). Ces cellules F9 ressemblent fortement aux cellules pluripotentes de la masse cellulaire interne (ICM) de l'embryon précoce au stade blastocyste. Cependant, à la différence des cellules embryonnaires souches (ES), les cellules F9 ont un potentiel de différenciation assez limité. Elles sont capables de se différencier en cellules de type endoderme primitif (PrE), lorsqu'elles sont cultivées sous forme de monocouches en présence d'acide rétinolique (AR) ainsi qu'en cellules de type endoderme pariétal (PE) après traitement à l'AR + dibutyryl-AMPc (dbAMPc) (Strickland et Mahdavi, 1978). De plus, ces cellules peuvent également être induites à se différencier en cellules de type endoderme viscéral (VE) lorsqu'elles sont cultivées sous forme d'agrégats en présence d'AR.

Des études réalisées dans ce modèle cellulaire ont mis en évidence une distribution dynamique de TIF1 β au cours de la différenciation des cellules F9 en endoderme primitif. Dans les cellules non différenciées, TIF1 β est distribué de façon diffuse dans le nucléoplasme à l'exclusion du nucléole, puis se relocalise au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique au cours de la différenciation en cellules PrE. Cette relocalisation est

dépendante de l'interaction TIF1 β -HP1 car elle peut être abrogée par des mutations au niveau du motif « HP1 box » de TIF1 β (Cammass et al., 2002) (**figure 35**).

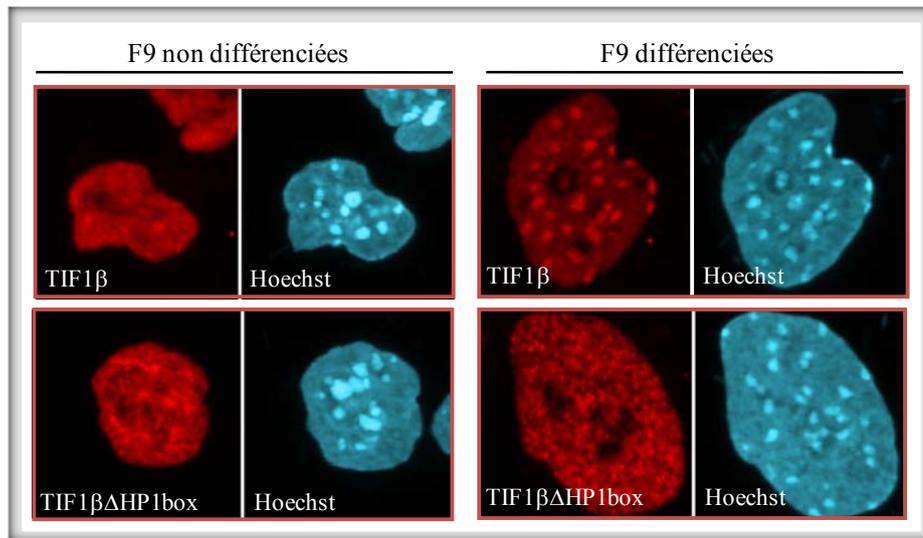


Figure 35 : La relocalisation de TIF1 β à l'hétérochromatine, au cours de la différenciation des cellules F9 en PrE, nécessite son interaction avec les protéines HP1. (d'après Cammass et al., 2002).

Ce modèle cellulaire a permis également d'établir que l'interaction de TIF1 β avec les protéines HP1 joue un rôle essentiel pour la différenciation terminale de ces cellules F9 en cellules PE. Pour cela, une lignée de cellules de carcinome embryonnaire murin (cellules F9 *TIF1 β ^{HP1box/-}*) exprimant une protéine TIF1 β mutée dans son motif HP1box (TIF1 β ^{HP1box}) à la place de la protéine TIF1 β sauvage, a été établie au laboratoire par recombinaison homologue (Cammass et al., 2004). Ces cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* sont viables bien qu'elles présentent un retard de croissance important par rapport aux cellules sauvages, et présentent des défauts de différenciation spécifiques. En effet, tandis que les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* sont capables de se différencier en cellules PrE (dépendante de l'AR), elles sont incapables de se différencier en cellules PE (dépendante de l'AR et du dbAMPc), à la différence des cellules F9 de type sauvage (**figure 36**). Grâce à un système d'expression ectopique de la protéine TIF1 β sauvage contrôlé au cours du temps, il a été établi que les complexes TIF1 β -HP1 exercent leurs effets pendant un intervalle de temps déterminé précédant le déclenchement de la différenciation en endoderme pariétal (entre 24h et 48h après le début du traitement à l'AR) (Cammass et al., 2004). L'ensemble de ces données permettent d'attribuer aux régulations exercées par les complexes TIF1 β -HP1 un rôle déterminant dans la progression des cellules F9 vers leur voie de différenciation terminale.

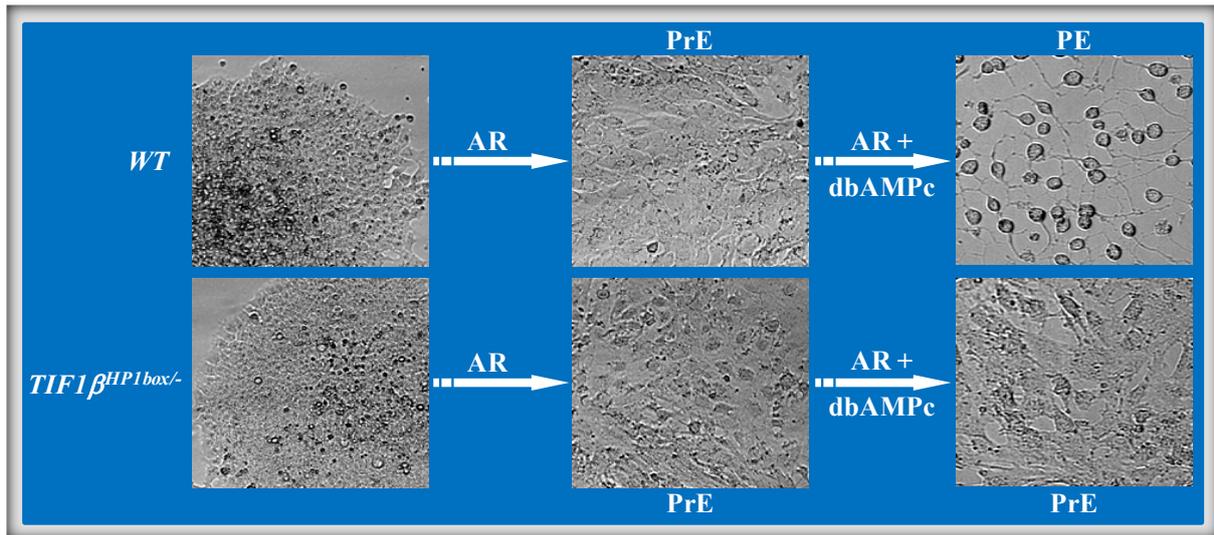


Figure 36 : L'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 est nécessaire pour la différenciation terminale des cellules F9 en endoderme pariétal (PE). AR : acide rétinoïque, PrE : endoderme primitif, PE : endoderme pariétal. (d'après Cammas et al., 2004).

Projet de thèse :

Mon travail de thèse a porté sur la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents aux fonctions des complexes TIF1 β -HP1 pour la physiologie cellulaire. Plus spécifiquement, il s'agissait d'identifier les gènes directement régulés par TIF1 β et de déterminer la contribution exacte que l'interaction entre TIF1 β et les HP1 exerce dans l'organisation de la structure de la chromatine des promoteurs de ces gènes cibles ainsi que dans leur localisation dans l'espace nucléaire.

L'objectif a aussi été de chercher à identifier les sites de fixations de TIF1 β à l'échelle du génome, afin de mieux définir l'implication réelle de TIF1 β dans la régulation épigénétique de la transcription. L'intérêt de cette étude est d'identifier et de mieux caractériser les régions du génome régulées par TIF1 β ainsi que de définir la nature des gènes préférentiellement régulés par TIF1 β au cours de la différenciation cellulaire. Pour cela, notre stratégie a consisté à réaliser une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage massif en haut débit (ChIP-Seq) au cours de la différenciation des cellules F9 en endoderme primitif (PrE). Nous continuerons ensuite à caractériser la structure de la chromatine, les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et la localisation sub-

nucléaire des gènes cibles de TIF1 β dans des cellules non différenciées ainsi qu'au cours de la différenciation. En prenant ainsi les gènes cibles de TIF1 β comme modèle, nous pourrions mieux caractériser les événements épigénétiques survenant lors de la différenciation cellulaire, la cinétique de modifications de ces événements ainsi que leur mécanisme de transmission.

Résultats

Partie I

Publication

**TIF1 β s'associe avec les protéines HP1 pour établir
et maintenir la répression du gène *MEST***

Raphaël Riclet, Mariam Chendeb, Jean-Luc Vonesch, Dirk Koczan, Hans-Juergen Thiesen, Régine Losson et Florence Cammas.

Molecular Biology of the Cell (2009)

Volume 20, pages 296-305

Les études réalisées au laboratoire ont permis de démontrer que l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 est importante pour la localisation sub-nucléaire dynamique de TIF1 β au cours de la différenciation (Cammass et al., 2002) ainsi que pour la progression des cellules F9 vers leur voie de différenciation terminale (Cammass et al., 2004). Si ces résultats permettent d'attribuer aux complexes TIF1 β -HP1 des fonctions essentielles pour la physiologie cellulaire, ils soulèvent néanmoins de nombreuses questions quant à la nature des gènes régulés par ces complexes et celle des mécanismes contrôlant leur expression. Pour chercher à répondre à ces questions, nous avons combiné une analyse transcriptomique comparative entre des cellules F9 *TIF1 β ^{+/-}* et des cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* (exprimant une protéine TIF1 β ^{HP1box} n'interagissant plus avec les protéines HP1) avec des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP). Cette étude nous a permis d'identifier le gène *MEST* (*Mesoderm Specific Transcript*) comme étant un gène cible direct de TIF1 β . Nous avons démontré que le promoteur du gène *MEST* adopte une structure de type hétérochromatine dans les cellules F9 *TIF1 β ^{+/-}*, caractérisée par une triméthylation de H3K9 et de H4K20, une hyperméthylation de l'ADN et un enrichissement en protéines HP1. Ce promoteur est par contre dépourvu de modifications associées à la formation d'hétérochromatine facultative (triméthylation de H3K27) et à l'expression des gènes (acétylation de H3K9). Cette structure de type hétérochromatine nécessite l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 puisqu'elle est complètement désorganisée dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}*. Dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}*, le promoteur *MEST* est en effet hypométhylé et caractérisé par une triméthylation de H3K27 associée à une réactivation de l'expression de ce gène. Des expériences de DNA-FISH ont démontré de plus que *MEST* adopte une localisation subnucléaire préférentielle à proximité de l'hétérochromatine grâce à l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1. Nous avons ensuite cherché à savoir si TIF1 β est également capable d'établir la structure de type hétérochromatine et la répression du gène *MEST*, en ré-exprimant flag-TIF1 β de façon ectopique dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}*. Il a ainsi pu être mis en évidence que flag-TIF1 β est capable de restaurer partiellement la répression de *MEST* et de rétablir la structure de type hétérochromatine ainsi que la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur de ce gène.

L'ensemble de ces données démontre ainsi que TIF1 β , grâce à son interaction avec les protéines HP1, est absolument essentiel à l'établissement et à la maintenance d'une structure de type hétérochromatine dans la région promotrice de ce gène cible, ainsi qu'à son

association préférentielle à l'hétérochromatine constitutive. Nos données suggèrent ainsi fortement que TIF1 β ne régule qu'un seul des deux allèles de *MEST*.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Disruption of the Interaction between Transcriptional Intermediary Factor 1 β and Heterochromatin Protein 1 Leads to a Switch from DNA Hyper- to Hypomethylation and H3K9 to H3K27 Trimethylation on the *MEST* Promoter Correlating with Gene Reactivation

Raphaël RICLET, Mariam CHENDEB, Jean-Luc VONESCH, Dirk KOCZAN, Hans-Juergen THIESEN, Régine LOSSON, and Florence CAMMAS

Molecular Biology of the Cell, 2009, vol. 20, pages 296–305

Copyright © 2009 by The American Society for Cell Biology

Pages 96-... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E08-05-0510>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Résultats

Partie II

Résultats complémentaires

**Identification de gènes cibles de TIF1 β au cours de la
différenciation cellulaire**

I. Projet :

Identification de gènes cibles de TIF1 β au cours de la différenciation cellulaire

Dans le but d'identifier d'autres gènes que *MEST* directement régulés par TIF1 β , susceptibles de jouer un rôle physiologique majeur au cours de la différenciation cellulaire, nous avons entrepris une étude à plus grande échelle en réalisant une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage massif en haut débit (ChIP-seq). Cette étude a pour objectif principal de progresser dans la compréhension du mécanisme de régulation transcriptionnelle de TIF1 β et dans la compréhension du rôle des complexes TIF1 β -HP1 dans l'organisation de la structure de la chromatine et la localisation sub-nucléaire des gènes cibles primaires de TIF1 β . De plus, la combinaison de cette analyse des sites de fixation de TIF1 β avec une analyse transcriptomique comparative entre des cellules F9 *TIF1 β ^{+/-}* et des cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* devrait nous permettre d'identifier des gènes cibles susceptibles d'être impliqués dans la différenciation terminale des cellules F9.

Avant d'effectuer cette recherche de gènes cibles de TIF1 β par le ChIP-seq, une première étude avait été effectuée par une autre méthode : le clonage et séquençage de l'ADN immunoprécipité par ChIP. Cette analyse ne nous a finalement pas permis d'identifier avec certitude des gènes cibles primaires de TIF1 β . Par cette méthode nous avons en effet identifié près d'une trentaine de gènes plus fortement exprimés dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* par rapport aux cellules *TIF1 β ^{+/-}*, donc présentant des caractéristiques de cibles primaires, mais ensuite la validation par des expériences de ChIP classiques ne fut pas concluante; les enrichissements observés en TIF1 β au niveau des séquences clonées étaient en effet du même ordre de grandeur dans les cellules *TIF1 β ^{+/-}* que dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}*. Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre la recherche avec cette technique mais de réaliser une étude plus globale dans les cellules F9 en utilisant la méthode de ChIP-seq. Cette analyse par ChIP-seq a été réalisée avec un anticorps anti-TIF1 β sur des cellules F9 sauvages et des cellules *TIF1 β ^{-/-}/rTA-f.TIF1 β* utilisées comme contrôle. Ces cellules *TIF1 β ^{-/-}/rTA-f.TIF1 β* ont été choisies comme contrôle car elles n'expriment pas de TIF1 β endogène et une très faible quantité d'un transgène flag-TIF1 β , l'inactivation de TIF1 β étant létale dans les cellules F9. L'analyse a été effectuée au cours de la différenciation de ces cellules en endoderme primitif

induite pendant 36h de traitement à l'acide rétinoïque (AR). Ce choix de traitement a été fait de façon à se placer dans la fenêtre de temps (entre 24 et 48h) pendant laquelle l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 est indispensable pour la progression de la différenciation cellulaire (Cammass et al., 2004). Seuls les résultats préliminaires obtenus dans la dernière partie de ma thèse par le ChIP-seq seront présentés dans cette partie.

II. Matériel et Méthodes

Le protocole de ChIP utilisé pour l'expérience de ChIP-seq est le même que celui déjà décrit dans la publication jointe à ce manuscrit (voir résultats partie I). Seules les modifications apportées à ce protocole seront donc mentionnées ainsi que quelques points de matériel et méthode qui seront un peu plus développés.

1. Milieux et conditions de culture des cellules F9

Les cellules F9 sauvages et les cellules *TIF1 β ^{-/-}/rTA-f.TIF1 β* ont été cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SFV) dans des boîtes de culture de 15 cm de diamètre. Les boîtes ont été placées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 7% de CO₂. La différenciation en cellules de type endoderme primitif a été obtenue en ensemençant les cellules à une concentration d'environ 5.10²/cm² dans le milieu DMEM, 10% SFV et en ajoutant au milieu, après 24h de culture, de l'acide tout-trans rétinoïque (AR, Sigma) à une concentration finale de 1 μ M pendant 36h.

2. ChIP-seq

- Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les expériences de ChIP ont été réalisées suivant le protocole Millipore avec quelques modifications, comme déjà décrit (voir publication). La sonication a été réalisée à l'aide d'un sonicateur Biorupteur (Diagenode Philadelphia, PA) par des pulses de 15 sec, séparés par des repos de 15 sec pendant 40 min, de façon à obtenir un maximum de fragments de chromatine de l'ordre de 200 pb. L'immunoprécipitation a été réalisée sur 10.10⁶ cellules avec 5 μ l

d'anticorps anti-TIF1 β polyclonal purifié (anticorps PF64), la nuit, à 4°C sous rotation. Les complexes ADN-protéines immunoprécipités ont été récupérés à l'aide de 60 μ l de billes de protéine A agarose à 250 mg/ml, pré-bloquées avec de la BSA ultra pure (SIGMA) et de l'ARNt de levure (0,4 μ g/ml) (SIGMA) à la place de l'ADN de sperme de saumon. Après extraction phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol, le culot d'ADN a été repris dans 20 μ l d'eau en vue d'être séquencé.

- Séquençage massif en haut débit

Le séquençage massif en haut débit de l'ADN immunoprécipité a été réalisé à l'aide d'un séquenceur Solexa (Illumina) dans le service séquençage de l'IGBMC. Les principales étapes réalisées dans ce service sont les suivantes : 1) la préparation d'une librairie de fragments d'ADN immunoprécipités, 2) le séquençage massif en haut débit et 3) le traitement des données générées par le séquenceur.

L'ADN immunoprécipité par ChIP est tout d'abord quantifié par une méthode fluorescente. Au minimum 10 ng sont nécessaires pour la préparation de la librairie. Le profil de fragmentation est également analysé sur un BioAnalyzer (Agilent); une fragmentation optimale par sonication est en effet requise car seuls les fragments d'environ 200 pb peuvent être séquencés. L'ADN immunoprécipité est ensuite traité à la T4 DNA polymérase de façon à obtenir des extrémités franches puis phosphorylé avec de la T4 polynucléotide kinase. Une adénine (A) est ajoutée ensuite en 3' des fragments phosphorylés par un traitement à la Klenow, puis des adaptateurs sont ajoutés aux fragments à l'aide d'une DNA ligase. La librairie est ensuite déposée sur gel d'agarose 2% et la bande correspondant aux fragments de 200 pb \pm 25 bp est sélectionnée et découpée au scalpel puis purifiée à l'aide d'un kit Qiagen. Cette librairie est ensuite amplifiée par PCR avec des amorces spécifiques des adaptateurs puis visualisée et validée sur un BioAnalyzer (Agilent), ce qui permet de contrôler la taille, la pureté et la concentration de l'échantillon.

Le séquençage est réalisé ensuite dans le séquenceur Genome Analyser II (Illumina). Pour cela, la librairie est hybridée sur une flowcell. Les molécules uniques sont ensuite amplifiées à la surface de la flowcell par des cycles de dénaturation et amplification, de façon à obtenir des « clusters » formés de millions de molécules. Ces clusters sont séquencés en haut débit par mesures et extractions des intensités de fluorescence. De courtes séquences de 36 bases ou « tags » sont ainsi séquencées et générées.

Un alignement des tags a ensuite été effectué contre le génome non masqué de *Mus musculus* (mm9) et un fichier BED a été généré contenant un total de 6.6 millions de tags uniques pour la librairie de la ChIP TIF1 β dans les cellules F9 sauvages (ChIP-seq_TIF1 β) et 4.4 millions de tags uniques pour la librairie de la ChIP TIF1 β contrôle dans les cellules TIF1 β ^{-/-}/rTA-f.TIF1 β (ChIP-seq_contrôle).

- La recherche de régions enrichies

Les fichiers BED contenant l'ensemble des tags avec leurs positions sur le génome (chromosome, début et fin de la séquence) ont tout d'abord été visualisés sur le serveur UCSC (*University of California at Santa Cruz*) (<http://genome.ucsc.edu>) afin d'observer la distribution des tags dans le génome de la souris ainsi que les régions enrichies par rapport au contrôle.

La recherche de régions enrichies en tags a ensuite été réalisée en utilisant le logiciel MACS (*Model-based Analysis of ChIP-Seq*) (Zhang et al., 2008) avec les paramètres suivants : gsize=1.87.10⁹ (taille du génome en pb), tsize=36 (taille des tags), bande width=100 (fenêtre de 100 pb), mfold=28 (enrichissement > 28 fois par rapport au bruit de fond local), p value=10⁻⁴ (comparaison par rapport au bruit de fond local). Les tags ont ainsi été recherchés sur les brins sens et anti-sens puis les régions enrichies en tags par rapport au bruit de fond ont été déterminées par MACS en utilisant une distribution de Poisson. De plus, il a été tenu compte du contrôle de l'expérience, en recherchant les régions enrichies en tags dans le ChIP-seq_TIF1 β par rapport au ChIP-seq_contrôle.

Les positions génomiques de chaque région enrichie en tags ont ensuite été annotées sur le génome de *Mus musculus* (mm9) par rapport au TSS du gène le plus proche en utilisant l'interface web GPAT (*Genomic Position Annotation Tool*) (http://bips.u-strasbg.fr/GPAT/Gpat_home.html) (Krebs et al., 2008).

3. Réactions d'amplification qPCR en temps réel

La validation de certaines séquences promotrices identifiées par ChIP-seq a été réalisée par des expériences de ChIP classique (voir protocole, partie I) sur des cellules F9 sauvages (ChIP_TIF1 β) et des cellules TIF1 β ^{-/-}/rTA-f.TIF1 β (ChIP_contrôle). Les réactions d'amplification ont été réalisées en triplicat dans un LightCyclerTM (Roche Diagnostics), dans un volume final de 10 μ L. Aux 5 μ L d'un mélange réactionnel « 2X QuantiTect SYBR Green

PCR Master Mix » (Qiagen) contenant du tampon PCR, des dNTP, du $MgCl_2$ 5 mM, l'agent intercalant SYBR Green I et l'enzyme HotStarTaq[®] ADN polymérase, il a été ajouté 1 μ L de chacune des amorces sens et antisens à une concentration 20 μ M et 3 μ L d'ADN obtenu par ChIP. 50 cycles d'amplification PCR ont ensuite été réalisés, composés chacun de 10 sec de dénaturation à 95°C, 20 sec d'hybridation des amorces à 58°C et de 20 sec d'élongation à 72°C. Pour chaque région amplifiée, l'enrichissement a été calculé en comparant les quantités relatives de produit PCR normalisé par rapport à l'input de la ChIP_TIF1 β et de la ChIP_contrôle. Cet enrichissement relatif a ensuite été comparé par rapport à celui obtenu pour le gène contrôle *ARBP* utilisé pour la normalisation. Les oligonucléotides amorces qui ont été utilisés sont présentés en **Annexe II**.

4. RT-PCR quantitative

Les ARN de cellules F9 *TIF1 β ^{+/-}* et de cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* non traitées et traitées pendant 36h à l'AR, ont été extraits avec du TRIzol® (Invitrogen, France). La rétrotranscription a été réalisée sur 1.5 μ g d'ARN selon le protocole défini par le fournisseur (Superscript II, Invitrogen). Les réactions d'amplification ont ensuite été réalisées sur 3 μ L d'échantillons rétrotranscrits dilués au 1/10 dans un LightCycler[™] (Roche Diagnostics), selon les mêmes conditions que pour les PCR quantitatives. Les oligonucléotides amorces qui ont été utilisés sont présentés en **Annexe II**.

5. Analyse du contenu en GC et recherche des îlots CpG

Les séquences ont tout d'abord été extraites au format FASTA en utilisant Genomatix. L'analyse de contenu en GC (% GC) et la recherche des îlots CpG (calcul du rapport $CpG_{\text{observé}}/CpG_{\text{attendu}}$) dans les séquences a ensuite été réalisée en utilisant l'interface web CpG Island Searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>) (Takai et Jones, 2003). Environ 300 régions promotrices et 300 régions distales ($> \pm 8$ kb du TSS) ont été analysées.

6. Analyse des séquences répétées

Les séquences répétées ont été identifiées et localisées dans le génome de *Mus musculus* en utilisant RepeatMasker. Un programme élaboré à l'IGBMC a été utilisé pour identifier et annoter les séquences répétées en comparant les positions génomiques de s

séquences du ChIP-seq à la banque de données des séquences répétées de RepeatMasker. La localisation des tags au niveau des séquences répétées a été vérifiée sur un échantillon de 500 séquences en utilisant RepeatMasker sur le serveur UCSC.

7. Analyse fonctionnelle

La classification des gènes cibles primaires de TIF1 β en différentes catégories fonctionnelles a été réalisée en utilisant le logiciel d'analyse Ingenuity (<http://ingenuity.com>). La liste de gènes classés en différentes catégories fonctionnelles est présentée dans le **Tableau R2 en Annexe I**.

III. Résultats et discussion

1. Identification des sites de fixation de TIF1 β à l'échelle du génome

Dans le but d'identifier des gènes cibles de TIF1 β susceptibles de jouer un rôle physiologique majeur au cours de la différenciation cellulaire, nous avons réalisé une expérience de ChIP avec un anticorps polyclonal anti-TIF1 β purifié (anticorps PF64), suivie d'un séquençage massif en haut débit (ChIP-seq_TIF1 β) dans les cellules F9 sauvages traitées pendant 36h avec 1 μ M d'acide rétinoïque (AR). De façon à avoir un contrôle du bruit de fond et de la liaison non spécifique de TIF1 β , une même expérience de ChIP-seq avec l'anticorps polyclonal anti-TIF1 β a été réalisée dans des cellules *TIF1 β ^{-/-}/rTA-f.TIF1 β* qui n'expriment pas de TIF1 β endogène et une très faible quantité d'un transgène flag-TIF1 β (ChIP-seq_contrôle). Après séquençage de fragments d'ADN de 36 pb (ou tags), les données obtenues pour les deux types cellulaires ont été alignées sur le génome de *Mus musculus* (mm9). Nous avons ainsi obtenu des bibliothèques de tags contenant plus de 6.6 millions de tags uniques pour les cellules F9 sauvages et 4.4 millions de tags uniques pour les cellules contrôles *TIF1 β ^{-/-}/rTA-f.TIF1 β* respectivement. L'observation de la distribution des tags dans le génome de *Mus musculus* sur le serveur UCSC nous a montré un nombre considérable de régions fortement enrichies en TIF1 β dans le ChIP-seq_TIF1 β par rapport à l'expérience contrôle (**figure R1a**). Nous avons réalisé ensuite une recherche de régions enrichies en tags

dans le génome en utilisant le logiciel MACS (*Model-based Analysis of ChIP-Seq*) (Zhang et al., 2008). Par cette analyse, nous avons mis en évidence 50798 régions enrichies dans le ChIP-seq_TIF1 β (régions contenant de 6 à 100 tags) par rapport au bruit de fond local (**figure R1b**). Une analyse similaire, effectuée en présence du ChIP-seq_contrôle, nous a permis ensuite d'éliminer plus de 36.2% de séquences et d'isoler 32401 régions enrichies en tags (régions contenant également de 6 à 100 tags) par rapport au contrôle (ChIP-seq_TIF1 β normalisé) (**figure R1b**). La recherche des régions enrichies dans le génome, avec le logiciel MACS, a donc mis en évidence plus de 32400 sites potentiels de fixation de TIF1 β dans les cellules F9.

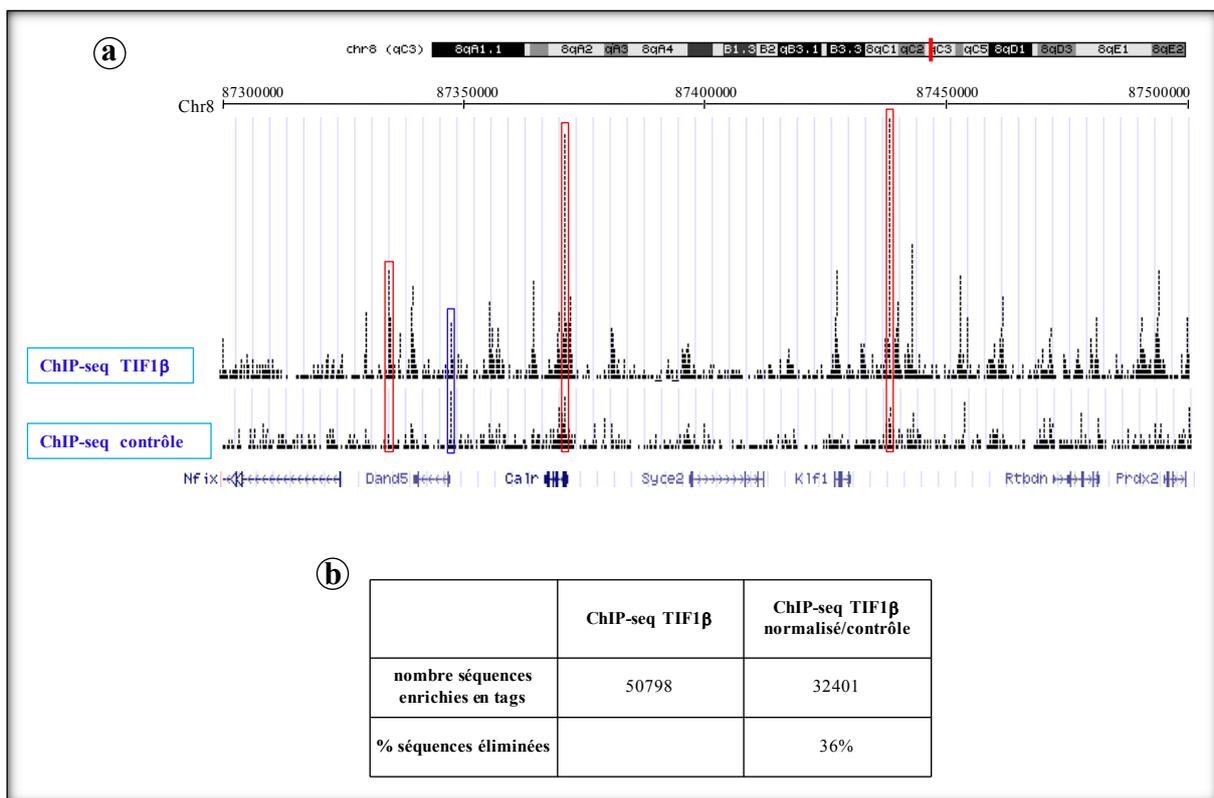


Figure R1 : Identification de sites de fixation de TIF1 β à l'échelle du génome au cours de la différenciation des cellules F9 (36h de traitement à l'AR). (a) La visualisation de données du ChIP-seq TIF1 β (haut) et du ChIP-seq contrôle (bas) sur le serveur UCSC montre les régions du génome enrichies en tags. Des régions du génome sont fortement enrichies en tags dans le ChIP-seq TIF1 β par rapport au ChIP-seq contrôle (rectangles rouges) alors que d'autres régions ne sont pas enrichies (rectangle bleu). (b) Tableau présentant le nombre de séquences enrichies en tags dans le ChIP-seq TIF1 β et le ChIP-seq TIF1 β normalisé par rapport au contrôle, ainsi que le pourcentage (36.2%) de séquences non enrichies en tags par rapport au contrôle, qui sont éliminées.

2. Détermination du nombre de tags permettant de définir un site de fixation de TIF1 β

Nous avons cherché ensuite à déterminer de façon plus précise le nombre minimum de tags permettant de définir un site réel de fixation de TIF1 β , en utilisant une approche à la fois statistique et expérimentale. Pour cela, les séquences isolées en absence ou en présence du ChIP-seq_contrôle, ont été séparées en différentes catégories en fonction du nombre de tags qu'elles contenaient. En comparant ensuite pour chaque catégorie le nombre de séquences obtenues en absence ou en présence du contrôle, nous avons pu mettre en évidence que la majorité de séquences qui ont été éliminées en présence du contrôle sont celles qui contiennent le moins de tags. En effet, seulement 52.6% des séquences contenant entre 6 et 9 tags ont été conservées alors que plus de 86% et 90.1% des séquences de la catégorie 20-25 et 26-100 tags ont été conservées respectivement (**figure R2a**). Le pourcentage de séquences conservées pour ces deux dernières catégories est même proche d'être statistiquement significatif par rapport au pourcentage total (63.8%) de séquences conservées (26-100 tags : χ^2 , $p=0.034$; 20-25 tags : χ^2 , $p=0.07$) (**figure R2a**). Ce résultat démontre que les séquences comportant peu de tags correspondent vraisemblablement à des sites de fixation non spécifiques de TIF1 β ou à des sites reconnus avec une faible affinité. Nous avons analysé ensuite dans le ChIP-seq_TIF1 β normalisé par rapport au contrôle le pourcentage de régions promotrices (défini à ± 8 kb du TSS du gène le plus proche) obtenues pour chaque catégorie. Nous avons pu mettre ainsi en évidence que le pourcentage de séquences promotrices par rapport à l'ensemble des séquences est plus faible pour les séquences comportant peu de tags (par exemple 15.8% pour la catégorie 6-9 tags) que pour les séquences comportant un nombre important de tags (40.2% pour la catégorie 20-25 tags et 39.6% pour la catégorie 26-100 tags) (**figure R2b**). Ce pourcentage de régions promotrices pour les catégories 20-25 tags et 26-100 tags est statistiquement significatif par rapport au pourcentage total (22.9%) de régions promotrices retrouvées dans les 32401 séquences (20-25 tags : χ^2 , $p=0.034$; 26-100 tags : χ^2 , $p=0.029$) (**figure R2b**). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les séquences comportant entre 20 et 100 tags sont fortement enrichies en régions régulatrices et promotrices de gènes reconnus spécifiquement par TIF1 β , alors que les autres séquences (comportant moins de tags) correspondent plutôt à des sites de fixation non spécifiques de TIF1 β ou à des sites reconnus avec une faible affinité.

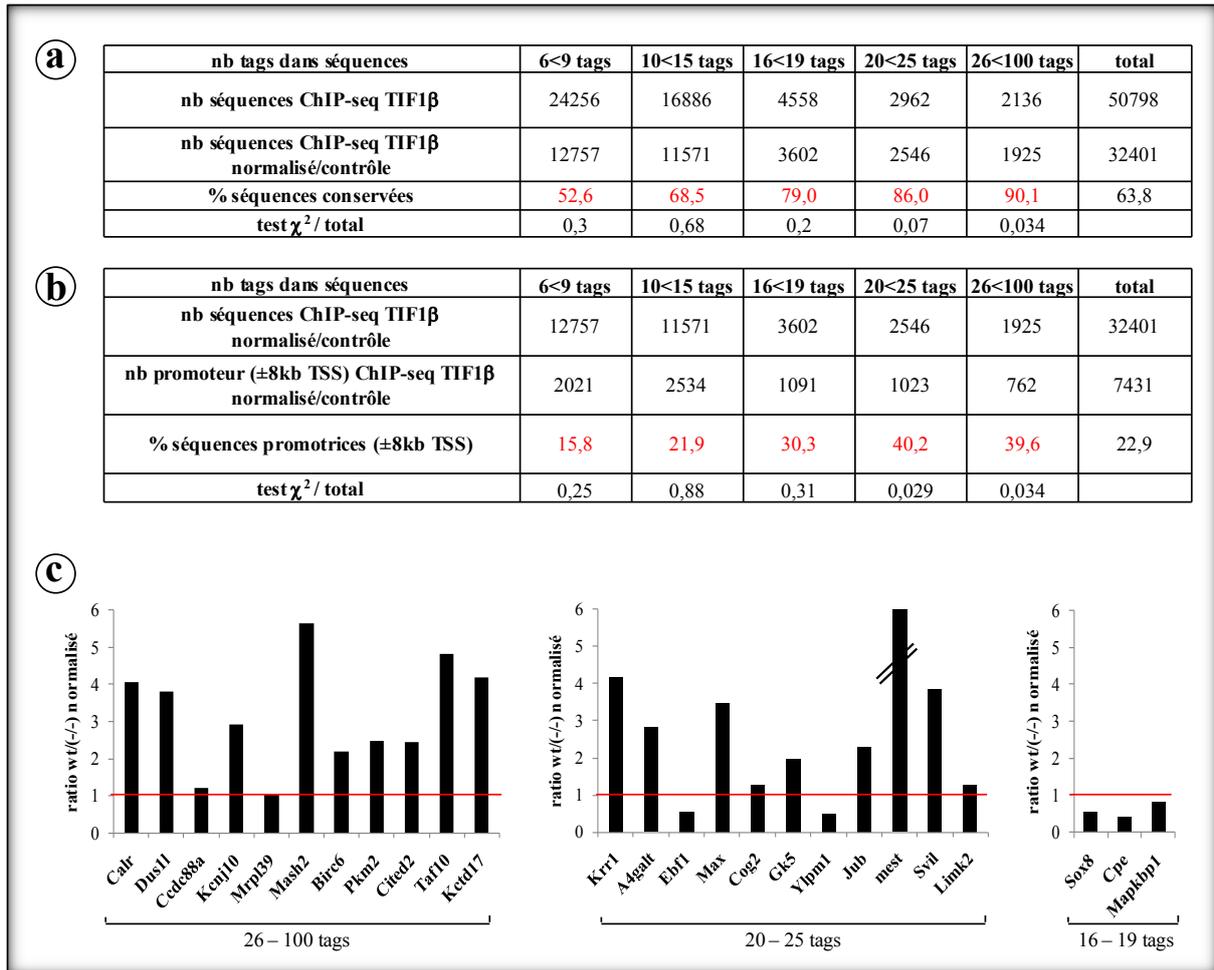


Figure R2 : Détermination du nombre minimum de tags permettant de définir expérimentalement un site de fixation de TIF1β. (a) Les séquences ont été classées en différentes catégories en fonction du nombre de tags qu'elles contiennent et le pourcentage de séquences conservées en présence du ChIP-seq contrôle a été calculé et comparé au pourcentage total de séquences conservées (63.8%) par le test statistique du χ^2 . (b) Dans le ChIP-seq TIF1β normalisé par rapport au contrôle, le pourcentage de séquences promotrices (± 8 kb du TSS) a été calculé pour chaque catégorie et comparé au pourcentage total de séquences promotrices (22.9%) par le test statistique du χ^2 . (c) La validation de certaines régions promotrices de gènes pour la catégorie 26-100 tags (gauche), 20-25 tags (milieu) et 16-19 tags (droite), a été réalisée par des expériences de ChIP anti-TIF1β classique sur des cellules F9 WT et des cellules *TIF1β*^{-/-}/*rTA-f.TIF1β* (-/-) traitées pendant 36h à l'AR. Les résultats sont présentés sous forme de ratio WT/(-/-) normalisé par rapport au gène contrôle *ARBP*.

Nous avons cherché ensuite à valider expérimentalement les séquences obtenues par le ChIP-seq en réalisant des expériences de ChIP classiques, suivies d'amplifications quantitatives en temps réel (qPCR), sur des cellules F9 sauvages (WT) et des cellules *TIF1β*^{-/-}/*rTA-f.TIF1β* traitées pendant 36h avec 1 μ M d'AR. Nous avons ainsi confirmé un

enrichissement plus important en TIF1 β dans les cellules WT par rapport aux cellules *TIF1 β ^{-/-}/rTA-f.TIF1 β* sur plus de 80% de régions promotrices analysées de la catégorie 26-100 tags et plus de 60% de régions promotrices de la catégorie 20-25 tags, alors qu'aucun enrichissement réel n'a été observé sur les quelques régions promotrices analysées de la catégorie 16-19 tags. Les séquences promotrices qui ont été testées pour cette validation sont représentées (**figure R2c**). Il semble ainsi que la limite de validation par CHIP classique pour laquelle on observe un enrichissement en TIF1 β au niveau des séquences promotrices se situe autour des 20 tags. Sur la base de l'ensemble de nos données statistiques et expérimentales, nous avons donc décidé de fixer la limite à un minimum de 20 tags pour définir un site de fixation de TIF1 β et de poursuivre notre analyse sur les 4471 séquences contenant entre 20 et 100 tags.

Nous avons alors poursuivi la validation des gènes comportant entre 20 et 100 tags en analysant leur niveau d'expression par RT-PCR quantitative sur des ARN préparés à partir de cellules *TIF1 β ^{+/-}* et de cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* cultivées en absence (NT) ou en présence d'acide rétinoïque pendant 36h (36h AR).

Les gènes qui ont été choisis pour cette deuxième validation sont des gènes pour lesquels nous avons pu mettre en évidence par CHIP un enrichissement plus important en TIF1 β dans les cellules WT par rapport aux cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}*. Cette étude a mis en évidence que plus de 85% des gènes analysés ont un niveau d'expression plus important (supérieur à 1,5 fois) dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* par rapport aux cellules *TIF1 β ^{+/-}* non traitées ou traitées pendant 36h à l'AR (**figure R3**). De façon intéressante, nous avons pu mettre en évidence différents profils d'expression entre les cellules *TIF1 β ^{+/-}* et les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* en fonction de l'état de différenciation cellulaire. Certains gènes sont en effet surexprimés dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* par rapport aux cellules *TIF1 β ^{+/-}*, plus particulièrement dans les cellules non différenciées (les gènes *Cited2*, *Krr*, et *A4galt*), et d'autres, plutôt au cours de la différenciation (par exemple *Taf10*). Pour les gènes de la première catégorie, il est donc vraisemblable que l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 joue un rôle important dans les cellules non différenciées alors que pour les gènes de la deuxième catégorie, cette interaction serait plus importante au cours de la différenciation. Pour d'autres gènes, cette interaction est importante aussi bien dans les cellules non différenciées que dans les cellules différenciées car ils sont surexprimés dans les cellules

TIF1β^{HP1box/-} quelque soit l'état de différenciation (les gènes *Kcnj10*, *Mash2*, *Gk5* et *Svil*) (figure R3).

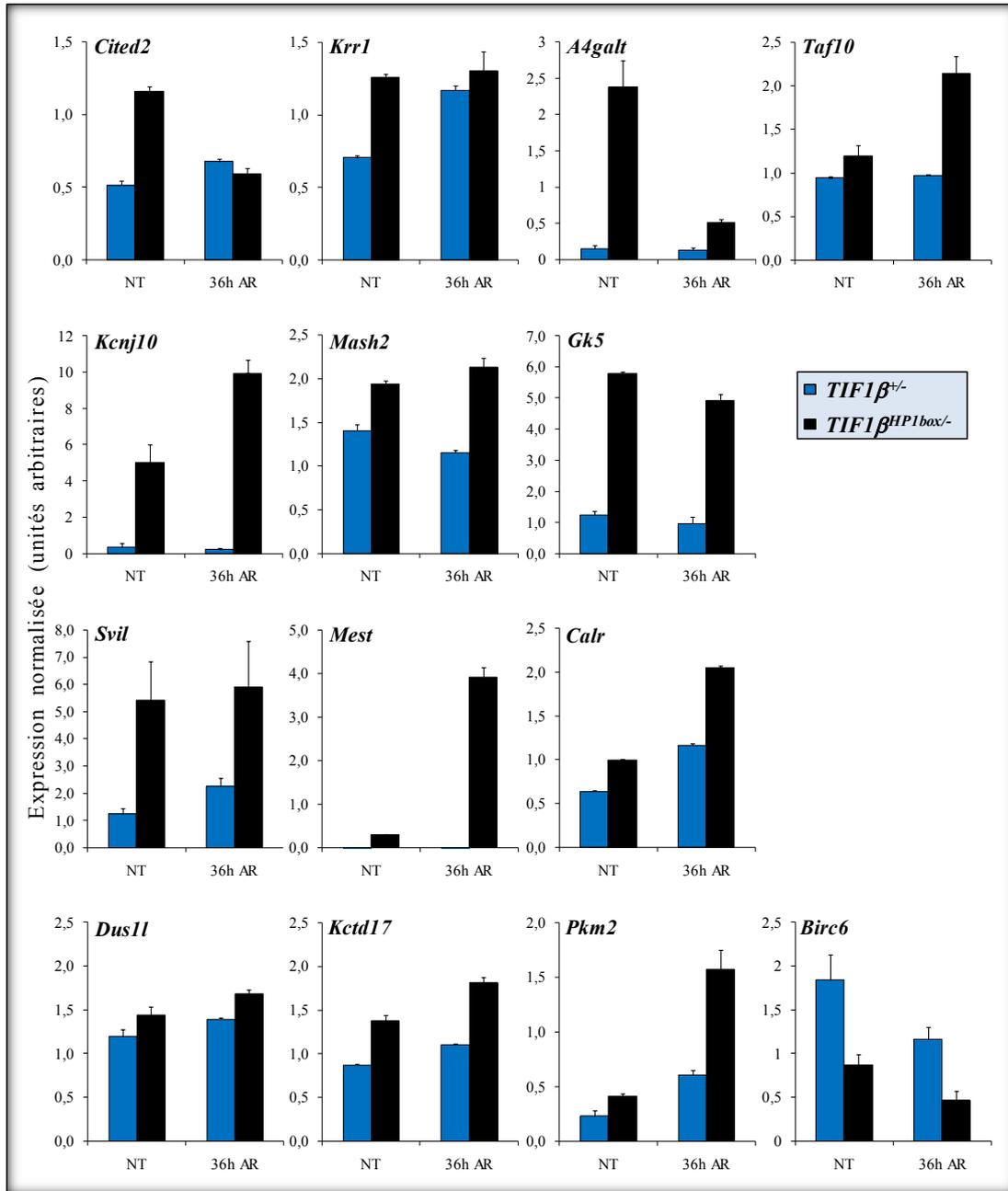


Figure R3 : Validation de l'expression des gènes cibles de TIF1β isolés par ChIP-seq.

L'expression des gènes a été analysée sur des cellules F9 *TIF1β^{+/-}* et des cellules *TIF1β^{HP1box/-}* non traitées (NT) et traitées pendant 36h à l'AR (36h AR), par RT-PCR quantitative. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène *HPRT* utilisé comme contrôle.

On retrouve aussi plusieurs gènes qui se comportent comme le gène *Mest*, c'est à dire surexprimés dans les cellules *TIF1β^{HP1box/-}* par rapport aux cellules *TIF1β^{+/-}* aussi bien en

présence qu'en absence d'AR, et qui sont induits de façon équivalente dans les deux types cellulaires au cours de la différenciation (les gènes *Calr*, *Dus11*, *kctd17* et *Pkm2*); ces gènes sont donc induits au cours de la différenciation en endoderme primitif à travers un mécanisme qui ne dépend pas de l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1. D'autre part, nous avons observé uniquement pour le gène *Birc6* un niveau d'expression plus faible, de l'ordre de 2 fois, dans les cellules mutantes *TIF1 β ^{HP1box/-}* par rapport aux cellules *TIF1 β ^{+/-}* (**figure R3**).

Ces résultats suggèrent fortement que TIF1 β régule l'expression d'un nombre très important de gènes de la catégorie 20-100 tags à travers des mécanismes qui dépendent ou non de l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1, selon l'état de différenciation cellulaire.

3. Localisation génomique des séquences cibles de TIF1 β

Dans le but de déterminer avec précision les régions du génome préférentiellement reconnues par TIF1 β , les 4471 séquences contenant entre 20 et 100 tags identifiées ont été annotées par rapport au TSS du gène le plus proche en utilisant l'interface web GPAT (*Genomic Position Annotation Tool*) (Krebs et al., 2008). Nous avons mis ainsi en évidence que 24.9% des sites de fixation de TIF1 β se situe à moins de 8kb en amont du TSS et 15.1% à moins de 8kb en aval du TSS (**figure R4a**). La majorité des autres sites de fixation se trouve dans des régions distales (46.8%) à proximité d'un gène connu (entre 8kb et 100kb en amont ou en aval du TSS) et seulement 13.2% des sites se situe dans une région très éloignée (> 100kb du TSS) d'un gène connu (**figure R4a**). De façon intéressante, on ne trouve pour la majorité des gènes, un seul site de fixation (76.8% des gènes) ou deux sites de fixation (15.8% des gènes) de TIF1 β , suggérant que la régulation des gènes par TIF1 β se fait principalement à un niveau d'une seule région du gène (**figure R4b**). Nous avons analysé ensuite le contenu en G+C de séquences promotrices ou distales. Pour cela, nous avons utilisé le programme développé par Takai et Jones sur l'interface web CpG Island Searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>) (Takai et Jones, 2003). Les îlots CpG ont été classés en deux catégories : 1) les îlots CpG riches, définis par les critères stringents de Takai et Jones (contenu en GC \geq 55%, CpG_{observé}/CpG_{attendu} \geq 0.65) (Takai et Jones, 2002) et 2) les îlots CpG pauvres, définis par les critères moins stringents de Gardiner-Garden et Frommer (contenu en GC > 50%, CpG_{observé}/CpG_{attendu} \geq 0.60) (Gardiner-Garden et Frommer, 1987). Cette analyse a mis en évidence que 72.3% de séquences promotrices sont enrichies en CpG, avec une forte proportion d'îlots riches (59.8%) et 24.3% des séquences distales sont enrichies en CpG,

avec une préférence pour les îlots pauvres (15.6%) (**figure R4c**). Ces résultats démontrent que les séquences promotrices et distales sont fortement enrichies en CpG par rapport à l'ensemble du génome (~ 1 à 2%) (Bird, 1986) et suggèrent qu'il s'agit bien de régions promotrices ou régulatrices de gènes régulés par les complexes TIF1 β /HP1.

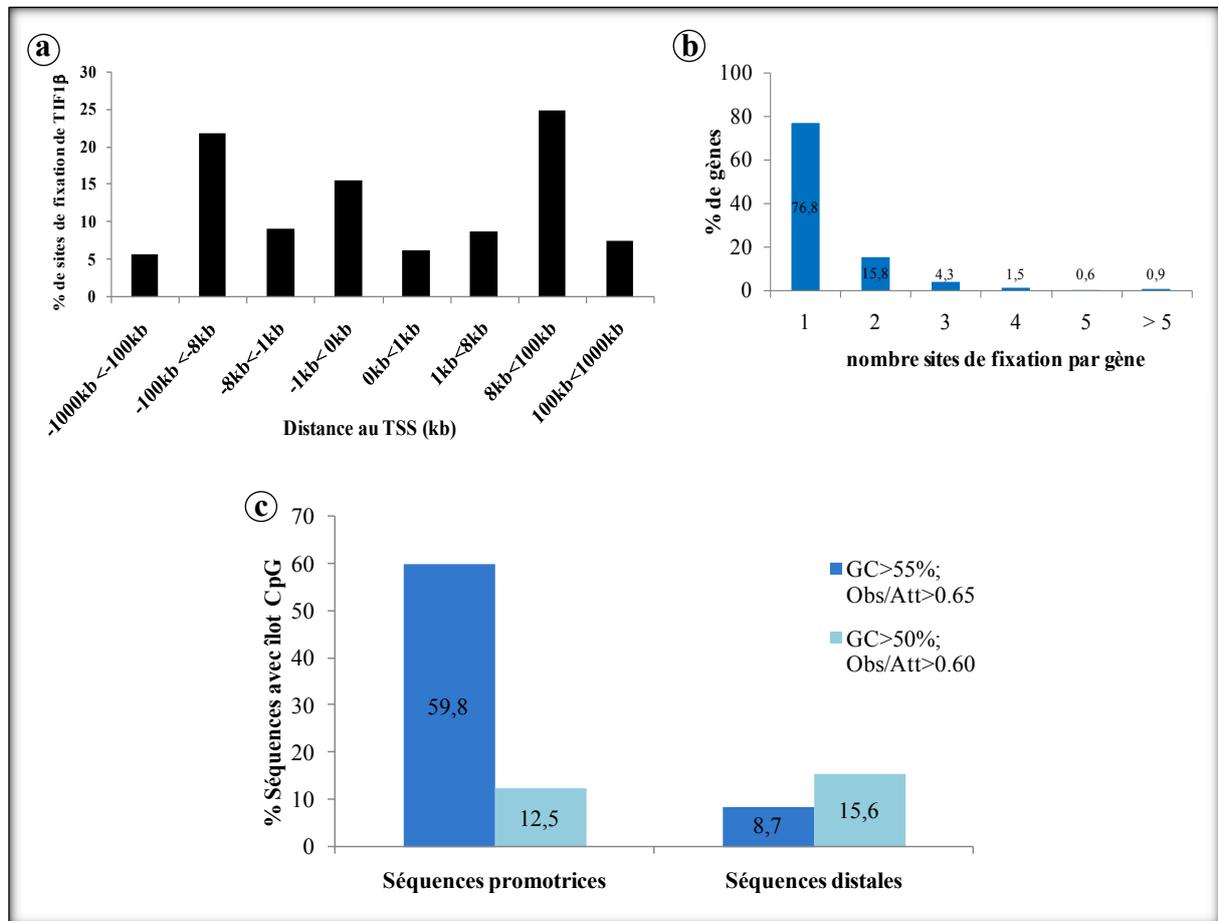


Figure R4 : Les séquences promotrices et les séquences distales sont enrichies en îlots CpG.

(a) Distribution des sites de fixation de TIF1 β dans le génome. Le pourcentage de sites de fixation est représenté pour différentes régions définies par rapport au TSS du gène le plus proche. Plus de 24.9% de sites de fixation se situent à moins de 8 kb en amont et 15.1% à moins de 8kb en aval du TSS et 46.8% des sites sont situés entre 8 kb et 100 kb en amont et en aval du TSS. (b) Nombre de sites de fixation de TIF1 β trouvés par gène. La majorité des gènes ne sont régulés que par un seul site (76.8%) ou de deux (15.8%) sites de liaison de TIF1 β . (c) Le pourcentage de séquences promotrices et distales contenant un îlot CpG riche ($GC > 55\%$, $CpG_{observé}/CpG_{attendu} \geq 0.65$) et un îlot CpG pauvre ($GC > 50\%$, $CpG_{observé}/CpG_{attendu} \geq 0.60$) a été déterminé en utilisant l'interface web CpG Island Searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>). Les séquences promotrices sont enrichies en îlots CpG riches (59.8%) et les séquences distales sont enrichies en îlots CpG pauvres (15.6%).

4. TIF1 β a une affinité pour les séquences répétées de type LTR et SINE

Afin de déterminer si des sites de fixation de TIF1 β se trouvent dans ou à proximité de régions répétées du génome, nous avons utilisé un programme élaboré à l'IGBMC pour comparer les positions génomiques des séquences isolées par le ChIP-seq à une banque de données des séquences répétées et annotées chez la souris. Cette étude a montré que près de 46.1% des séquences identifiées par le ChIP-seq, dont la taille moyenne est d'environ 450 pb, comporte des séquences répétées du génome. La majorité des séquences retrouvées sont des LTR (*Long Terminal Repeats*) (15.2%), de simples répétitions (9.0%) ainsi que de séquences de type SINE (*Short Interspersed Element*) (13.4%) et, dans 3.7% des séquences, on retrouve des répétitions de plusieurs classes différentes en même temps (**figure R5a**). Ce résultat démontre qu'une grande proportion des sites de fixation de TIF1 β se situe dans ou à proximité de régions répétées du génome.

Pour déterminer de façon encore plus précise la localisation de ces sites de fixation, nous avons analysé sur plus de 500 séquences contenant des répétitions la position exacte des tags par rapport aux répétitions, dans le serveur UCSC. De façon intéressante, les tags sont localisés presque exclusivement au niveau des LTR (52.9%) et des séquences de type SINE (35,4%), alors qu'ils sont quasiment absents au niveau des séquences de type LINE (*Long Interspersed Element*) (4.9%) et de faible complexité (2.4%) (**figure R5b**). Même si l'enrichissement en tags est variable au niveau de ces séquences répétées (avec des régions très fortement enrichies et d'autres plus faiblement), ces données démontrent que les régions répétées sur lesquelles les tags sont localisés correspondent principalement à des LTR et des SINE; cela suggère que TIF1 β pourrait se fixer au niveau de séquences régulatrices présentes dans ces régions.

De plus, la mise en évidence de ce recrutement préférentiel de TIF1 β au niveau des LTR est en accord avec la découverte récente que TIF1 β est capable de reconnaître une région bien précise, la région PBS (*Primer Binding Site*), située à proximité du LTR des rétrovirus M-MLV (*Moloney murin leukemia virus*) et de réprimer leur transcription (Wolf et Goff, 2007; Wolf et al., 2008). Il a été démontré aussi que cette répression des rétroéléments contenant un LTR nécessite une interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 et se fait par l'intermédiaire d'une KRAB-ZFP (Wolf et Goff, 2009). Il est donc vraisemblable que TIF1 β joue un rôle important dans la répression des rétroéléments en reconnaissant des séquences spécifiques au niveau des LTR et des séquences répétées de type SINE. Il reste encore à

déterminer si TIF1 β utilise le même type de mécanisme de répression au niveau des LTR et des séquences de type SINE et en particulier si une interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 est nécessaire pour leur recrutement mutuel au niveau de ces séquences et pour la répression exercée dans ces régions.

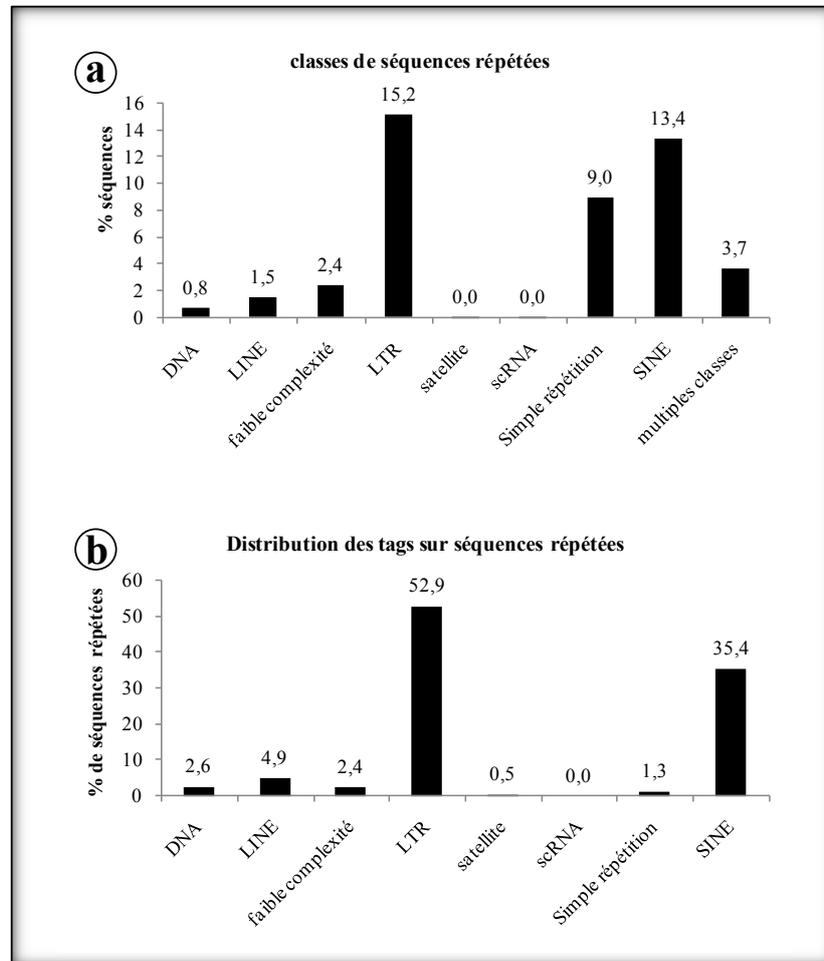


Figure R5 : TIF1 β a une affinité pour les séquences répétées de type LTR et SINE.

(a) Le pourcentage des différentes classes de répétitions présentes dans les séquences isolées par le ChIP-seq a été déterminé en comparant la position génomique des séquences à la banque de donnée des séquences répétées chez la souris, utilisée par RepeatMasker. Les séquences du ChIP-seq contiennent majoritairement des LTR (15.2%), des simples répétitions (9%) et des séquences de type SINE (13.4%). (b) La localisation précise des tags au niveau des séquences répétées a été déterminée en visualisant les séquences sur le serveur UCSC. Les tags (sites de fixation de TIF1 β) sont localisés presque exclusivement au niveau des LTR (52.9%) et de séquences de type SINE (35.4%).

5. Analyse fonctionnelle des gènes cibles de TIF1 β

De façon à mieux caractériser la nature et la fonction des gènes cibles de TIF1 β , nous avons réalisé une analyse bioinformatique parmi les quelques 1638 gènes identifiés et régulés au niveau de la région promotrice (définie à \pm 8 kb du TSS), en utilisant le logiciel d'analyse Ingenuity. Cette étude nous a permis de regrouper les gènes en différents « clusters » de fonctions cellulaires et de processus métaboliques et, du fait de la structure hiérarchique des catégories fonctionnelles, un même gène a pu être assigné à de multiples catégories et fonctions cellulaires (**figure R6a et Annexe I**). Cette analyse a mis en évidence que les cibles directes de TIF1 β sont majoritairement des gènes impliqués dans l'expression des gènes (*Foxc2*, *Klf5*, *Neurog2*, *Cited2*, *Calr*...), la mort cellulaire (*Ndufa13*, *Sfrp2*, *Unc5b*, *A4galt*,...), la croissance et la prolifération cellulaire (*Actg1*, *Kif13a*, *Rfc1*...) et le cancer (*Casp3*, *Bax*, *Ccdc88a*, *Stat1*,...) (**figure R6a et Annexe I**). Nous avons ensuite comparé les 1638 gènes cibles identifiés par le ChIP-seq aux 3073 gènes cibles primaires de TIF1 β identifiés récemment par la technique de ChIP-on-ChIP dans les cellules ES (Hu et al., 2009). Sur les 1638 gènes cibles, nous retrouvons une proportion significative de 449 (27.4%) gènes en commun avec ceux retrouvés dans les cellules ES (distribution hypergéométrique, $p = 8.6 \times 10^{-87}$) (**figure R6b**). Les gènes identifiés pour chaque catégorie fonctionnelle par le ChIP-seq ont ensuite également été comparés selon la distribution hypergéométrique aux gènes des différentes catégories fonctionnelles trouvées dans les cellules ES. Nous avons cherché pour chaque catégorie fonctionnelle si la proportion de gènes en commun est statistiquement significative, en calculant une p-valeur selon cette distribution hypergéométrique. Nous avons mis ainsi en évidence que les gènes cibles retrouvés majoritairement en commun avec ceux des cellules ES sont des gènes impliqués dans la mort cellulaire, l'expression des gènes la croissance et la prolifération cellulaire ainsi que le cycle cellulaire (**figure R6c**). L'ensemble de ces résultats démontre que TIF1 β est impliqué dans la régulation d'un nombre très important de gènes exerçant des fonctions essentielles pour la croissance et la survie cellulaire.

De plus, les catégories fonctionnelles de gènes cibles de TIF1 β qui ressortent le plus dans les cellules F9 sont celles qui ressortaient également dans les cellules ES (Hu et al., 2009), suggérant que TIF1 β est impliqué dans les mêmes fonctions et les mêmes voies de signalisation dans ces deux types cellulaires. Il semble aussi que l'on ait un effet de TIF1 β principalement sur les fonctions globales et générales de la cellule et beaucoup moins sur les

fonctions spécifiques, aussi bien dans les cellules F9 que les cellules ES. Le fait que TIF1 β soit impliqué dans la régulation d'un nombre aussi important de gènes exerçant des fonctions essentielles à la survie cellulaire pourrait donc expliquer le phénotype de létalité très précoce au cours du développement embryonnaire (à 6.5 jpc) qui caractérise les embryons mutants homozygotes *TIF1 β ^{-/-}* de souris (Cammass et al., 2000).

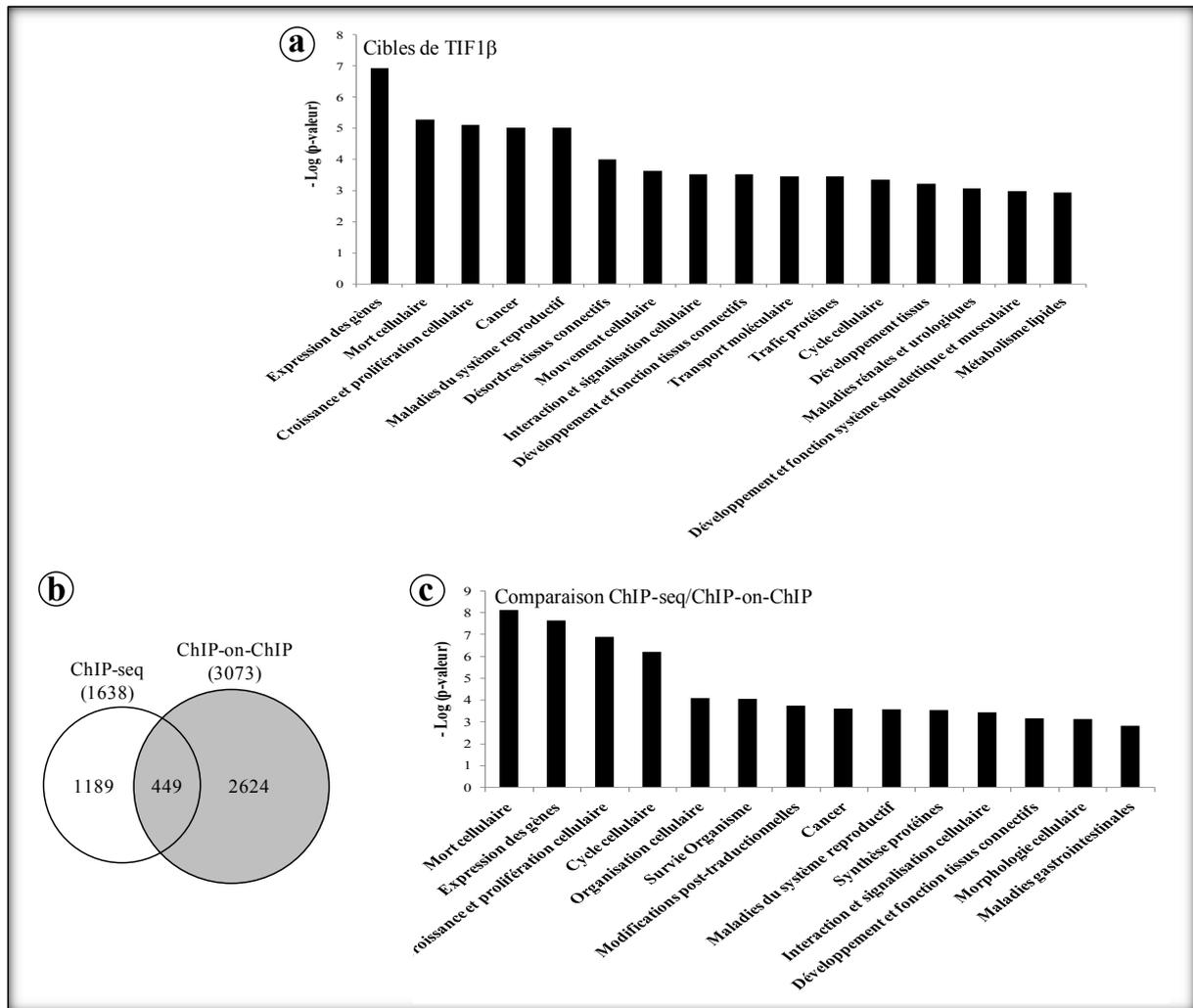


Figure R6 : Annotation fonctionnelle des gènes cibles de TIF1 β régulés au niveau de la région promotrice.

(a) Les catégories fonctionnelles pour les 1638 gènes cibles de TIF1 β identifiés par le ChIP-seq ont été déterminées en utilisant le logiciel d'analyse Ingenuity. Les cibles de TIF1 β sont majoritairement des gènes impliqués dans l'expression des gènes, la mort cellulaire, la croissance et la prolifération cellulaire et le cancer. Les catégories fonctionnelles qui ressortent le plus par l'analyse Ingenuity sont représentées par le -log (p-valeur) sur la figure. La liste complète des gènes trouvés pour toutes les catégories fonctionnelles est présentée en Annexe I (tableau). (b) Diagramme de Venn pour les gènes cibles communs de TIF1 β identifiés dans les cellules F9 par ChIP-seq (blanc) et les cellules ES par ChIP-on-ChIP (gris). Parmi les 1638 gènes cibles, 449 gènes (27.4%) sont retrouvés également dans les cellules ES (distribution hypergéométrique, $p = 8.6 \times 10^{-87}$).

(c) Comparaison des différentes catégories fonctionnelles de gènes identifiées par ChIP-seq et ChIP-on-ChIP. La proportion de gènes retrouvés en commun de façon majoritaire est déterminée par la distribution hypergéométrique (le $-\text{Log}(\text{p-valeur hypergéométrique})$ est représenté).

En conclusion, la recherche des gènes cibles de TIF1 β à l'échelle du génome par la méthode de ChIP-seq dans les cellules F9, a donc mis en évidence un nombre très important de gènes et de régions enrichies en TIF1 β . Cette étude fait apparaître que les complexes TIF1 β -HP1 pourraient être impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes, en reconnaissant des séquences régulatrices situées aussi bien dans des régions promotrices que dans des régions distales des gènes ainsi qu'au niveau de régions répétées du génome. L'analyse de l'expression des gènes suggère que ceux-ci peuvent être régulés par différents mécanismes dépendant ou non de l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 et/ou de l'état de différenciation des cellules. Dans la suite de l'étude, il sera donc particulièrement intéressant de mieux caractériser la structure de la chromatine, les modifications des histones, la méthylation de l'ADN et la localisation sub-nucléaire de certains gènes cibles; cela devrait nous apporter des informations essentielles sur les mécanismes de répression exercés par les complexes TIF1 β /HP1. De plus, la caractérisation plus fine de différentes voies de signalisation régulées par TIF1 β , à l'aide du logiciel d'analyse Ingenuity notamment, devrait nous permettre d'identifier des gènes exerçant des fonctions importantes pour les différentes étapes de différenciation et du développement.

Discussion
et
Perspectives

Discussion et Perspectives

De très nombreuses études réalisées ces dernières années ont mis en évidence que la structure de la chromatine est très dynamique et régulée de façon fine par une multitude de complexes protéiques. Il est apparu clairement que l'organisation chromatinienne et la compartimentation nucléaire ont un impact fondamental sur la régulation de l'expression des gènes (Mellor, 2006) : elles pourraient constituer un code épigénétique important pour permettre une expression bien coordonnée et régulée de certains gènes au cours de différentes étapes de différenciation cellulaire et du développement (Chambeyron et Bickmore, 2004; Fedorova et Zink, 2008). Pourtant, de nombreuses questions restent encore à élucider, concernant notamment la spécificité et le mode d'action de la grande diversité des complexes impliqués, pour pouvoir mieux comprendre comment les modifications de la chromatine sont traduites en une expression très contrôlée de gènes et déterminent la destinée cellulaire.

I. Rôle de l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 dans la répression des gènes par hétérochromatinisation

1. Etablissement et maintien de la structure de type hétérochromatine

Des données récentes ont mis en évidence que TIF1 β présente une distribution sub-nucléaire très dynamique et se concentre au niveau de l'hétérochromatine péri-centromérique au cours de la différenciation des cellules F9 en endoderme primitif par un mécanisme qui dépend de son interaction avec les protéines HP1 (Cammass et al., 2002). Il a été proposé un modèle selon lequel l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 pourrait être impliquée dans la formation d'une structure de type hétérochromatine au niveau du promoteur des gènes cibles et/ou leur recrutement au niveau des compartiments d'hétérochromatine constitutive (Schultz et al., 2001; Schultz et al., 2002; Cammass et al., 2002). Mais jusqu'à présent, les études qui ont pu servir d'apporter des éléments en faveur de ce modèle ont été réalisées uniquement grâce à un système rapporteur intégré.

Dans notre étude, nous avons pu identifier et caractériser pour la première fois un gène cible endogène de TIF1 β dans les cellules F9, le gène *MEST* (*Mesoderm specific transcript*), en combinant une analyse transcriptomique comparative entre des cellules F9 TIF1 $\beta^{+/-}$ et des

cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* avec des expériences de ChIP. Nous avons démontré que l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 est nécessaire pour leur recrutement mutuel et/ou leur stabilisation au niveau du promoteur de ce gène, ainsi que pour l'établissement et le maintien d'une structure de type hétérochromatine au niveau de la région promotrice, ce qui facilite ensuite le recrutement de *MEST* dans les régions d'hétérochromatine péricentromérique. De façon intéressante, nous avons montré que la structure de type hétérochromatine est caractérisée par une hyperméthylation de l'ADN et par la triméthylation de H4K20 et de H3K9 qui s'étend jusqu'à environ 4kb en amont du TSS de *MEST*, alors que la localisation des protéines HP1 est restreinte à la région proximale du promoteur de *MEST*. Il semble qu'une interaction entre les protéines HP1 et TIF1 β soit nécessaire pour le recrutement des protéines HP1 au niveau de H3K9 triméthylée comme cela a déjà aussi été démontré entre les protéines HP1 et l'histone méthyltransférase Suv39h1 (Stewart et al., 2005). Il apparaît de plus que le rôle des protéines HP1 dans la répression de la transcription par les protéines KRAB-ZFP résulte directement de leur fixation à un ou seulement quelques nucléosomes. Une observation similaire avait été faite pour le facteur de transcription Rb, qui lui aussi entraîne le recrutement des protéines HP1 dans la région proximale de ses gènes cibles (Nielsen et al., 2001b). Nos données suggèrent de même que la triméthylation de H3K9, seule, n'est pas suffisante pour la fixation des protéines HP1.

Contrairement aux études qui ont été réalisées dans un système rapporteur intégré, nous n'avons pas mis en évidence de spécificité de recrutement de l'un des isotypes des protéines HP1 au niveau du promoteur *MEST*. Les analyses de FRET réalisées précédemment au laboratoire ont démontré pourtant que TIF1 β interagit de façon directe avec HP1 β et HP1 γ et, de façon indirecte, avec HP1 α dans l'euchromatine de cellules F9 non différenciées (Cammass et al., 2007). Il est donc tout à fait possible de détecter les trois isotypes de protéines HP1 sur le promoteur *MEST* par des expériences de ChIP mais il reste encore à déterminer si ceux-ci sont présents de façon simultanée sur le même promoteur ou si chacun des isotypes des protéines HP1 sont présents sur un promoteur particulier.

Nous avons démontré aussi que la perte d'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 entraîne une désorganisation complète de la structure de type hétérochromatine et une réactivation rapide de l'expression du gène *MEST*. La répression de ce gène nécessite donc un recrutement permanent de TIF1 β et des protéines HP1 au niveau du promoteur; cette observation est en opposition avec les données obtenues dans un système rapporteur qui ont montrés qu'un recrutement transitoire de TIF1 β suffisait pour réprimer le transgène sur

plusieurs générations (Sripathy et al., 2006). Nous ne pouvons pas encore conclure si cette différence est une caractéristique spécifique du promoteur *MEST* ou si elle est également valable pour tous les gènes cibles endogènes de TIF1 β . Mais ces données démontrent que les protéines HP1 peuvent être rapidement déplacées au cours de la réactivation des gènes. Une étude très récente a montré de façon similaire que TIF1 β est impliqué dans la transition de la forme latente à la forme lytique de la répllication de s particules virales KSHV (*Kaposi's sarcoma-associated herpes virus*) et que sa délocalisation du promoteur des particules virales est associée également à une dissociation rapide de s protéines HP1 et à la perte de la triméthylation de H3K9 (Chang et al., 2009).

D'autre part, lors de la réactivation du gène *MEST*, nous avons observé que les marques typiques de l'hétérochromatine (triméthylation de H3K9 et H4K20) sont remplacées par une hypométhylation de l'ADN et une triméthylation de H3K27. Cette observation est assez surprenante car la triméthylation de H3K27 est une modification généralement associée à des régions d'hétérochromatine facultative et est reconnue par les complexes répresseurs Polycomb PRC1 (Bracken et al., 2006). Mais cette modification a cependant déjà été associée à de l'activation transcriptionnelle et elle était souvent corrélée à une absence de méthylation de l'ADN (Peters et al., 2003; Mathieu et al., 2005; Papp et Müller, 2006). Une étude récente, réalisée à l'échelle du génome dans le maïs par la technique de ChIP-seq, a mis aussi en évidence qu'à la différence des marques épigénétiques d'activation qui peuvent se retrouver associées ensemble, les deux marques de répression que sont la triméthylation de H3K27 et la méthylation de l'ADN ont plutôt tendance à s'exclure mutuellement (Wang et al., 2009). Cela a également été observé chez *Arabidopsis* où l'on ne trouve moins de 10% de régions caractérisées à la fois par de la triméthylation de H3K27 et de la méthylation de l'ADN (Zhang et al., 2007). Ces données suggèrent que la triméthylation de H3K27 peut être associée aussi bien à de l'activation qu'à de la répression et pourrait constituer un marque de remplacement lorsque la méthylation de l'ADN est absente. L'ensemble de ces études ainsi que la nôtre, démontrent que la structure de la chromatine est extrêmement complexe et finement régulée par une multitude de modifications épigénétiques.

De façon intéressante, nos données suggèrent fortement que les deux allèles de *MEST* sont réprimés par des mécanismes distincts. *MEST* est un gène soumis à l'empreinte parentale et nous avons en effet mis en évidence que les deux allèles sont complètement méthylés dans les cellules F9 TIF1 $\beta^{+/-}$ alors qu'il y a uniquement 50% de fragments de *MEST* séquencés qui sont méthylés dans les cellules TIF1 $\beta^{HP1box/-}$; cela suggère qu'il n'y a qu'un seul des deux

allèles qui est déméthylé lors de la perte d'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1. De plus, la triméthylation de H3K27 qui remplace la triméthylation de H3K9 et de H4K20 lors de cette perte d'interaction se retrouve exclusivement associée à l'allèle déméthylé de *MEST*. Les deux allèles de ce gène sont donc réprimés par un mécanisme qui implique la méthylation de l'ADN, mais il n'y en a qu'un seul qui est réprimé par la formation d'une structure de type hétérochromatine dépendante de l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1. Ce résultat démontre que la séquence d'ADN n'est pas suffisante pour déterminer la "destinée d'un gène à l'hétérochromatine" et souligne l'importance de ses modifications épigénétiques dans ce mécanisme de répression. Il restera cependant à déterminer quelles sont les marques et/ou la structure de la chromatine qui sont requises pour cibler TIF1 β spécifiquement sur l'un des deux allèles de *MEST* et pour la relocalisation de ce gène à l'hétérochromatine.

2. Recrutement au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique

Plusieurs études réalisées ces dernières années ont mis en évidence que des relocalisations de certains gènes dans des régions nucléaires bien définies ont un impact majeur dans le contrôle de l'expression de ces gènes au cours de étapes de différenciation cellulaire et du développement (pour revue, Fedorova et Zink, 2008).

Les études réalisées au laboratoire ont permis de montrer que la période pendant laquelle l'interaction entre les protéines HP1 et TIF1 β est essentielle pour la progression de la différenciation des cellules F9 coïncide avec le début de la relocalisation de TIF1 β de l'eux vers l'hétérochromatine (Cammass et al., 2002; Cammass et al., 2004). Il a ainsi été proposé que la relocalisation de TIF1 β exerce un rôle fonctionnel important au cours de la différenciation cellulaire et que l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 est impliquée dans le recrutement des gènes cibles de l'eux vers l'hétérochromatine pour induire leur répression. Au cours de notre étude sur le gène *MEST*, nous avons démontré que l'un des deux allèles de ce gène est associé de façon préférentielle aux régions d'hétérochromatine péricentromérique dans les cellules F9 non différenciées; cette relocalisation se fait par un mécanisme qui dépend directement de l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 et est en accord avec le fait que *MEST* n'est pratiquement pas exprimé dans les cellules F9 sauvages. La localisation sub-nucléaire de *MEST* a également été étudiée dans des cellules F9 différenciées pendant 36h de traitement à l'AR mais nous n'avons pas observé d'augmentation de recrutement au cours de la différenciation (résultats non publiés). Ce

résultat est donc un peu en contradiction avec l'hypothèse que TIF1 β se concentre au niveau des régions d'hétérochromatine péricentromérique au cours de la différenciation des cellules F9 et neuroderme primitif pour séquestrer ses gènes cibles. Il semble ainsi que la relocalisation des gènes cibles ne soit pas un critère absolu pour leur répression, car l'allèle régulé par TIF1 β n'est pas systématiquement à l'hétérochromatine; cette relocalisation pourrait donc constituer un niveau de régulation transcriptionnel supplémentaire. D'autre part, les analyses de FRET avaient montré que les complexes TIF1 β /HP1 β et TIF1 β /HP1 γ sont préférentiellement associés aux régions euchromatiniennes des cellules non différenciées bien qu'ils ne sont pas complètement exclus de l'hétérochromatine (Cammass et al., 2007). Il est donc vraisemblable qu'il n'y a ait qu'un sous-ensemble des complexes TIF1 β /HP1 qui soit impliqué dans le recrutement du gène *MEST* à l'hétérochromatine. Ces complexes pourraient être caractérisés et régulés par des modifications post-traductionnelles spécifiques au niveau des protéines HP1, comme suggéré par le « sous-code HP1 » proposé par Lomberk (Lomberk et al., 2006).

Pour mieux définir l'importance de la relocalisation de TIF1 β au niveau de l'hétérochromatine dans le mécanisme de répression transcriptionnel, il sera intéressant de poursuivre l'étude de la localisation sub-nucléaire de d'autres gènes cibles de TIF1 β par DNA-FISH dans des cellules F9 non différenciées ainsi qu'au cours de la différenciation cellulaire.

3. Quels sont les partenaires d'interaction de TIF1 β impliqués dans la répression des gènes cibles ?

Notre analyse effectuée jusqu'à présent sur le gène *MEST* a permis de montrer que l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 est nécessaire à l'établissement et au maintien d'une structure de type hétérochromatine, caractérisée par une triméthylation de H3K9 et de H4K20 ainsi que par une hyperméthylation de l'ADN. Pour le moment, la caractérisation de la structure de la chromatine de ce gène n'a pas été poursuivie, car nous avons préféré trouver d'autres gènes cibles afin de pouvoir effectuer par la suite une étude comparative. Mais il est très vraisemblable que d'autres complexes protéiques et d'autres modifications épigénétiques ainsi que des variants d'histones interviennent également dans ce mécanisme de répression; toute cette caractérisation de la structure de la chromatine des gènes cibles de TIF1 β devra être réalisée dans la suite du projet. Les études réalisées grâce à un système rapporteur intégré

ont montré en effet que TIF1 β permet la formation d'une structure de type hétérochromatine au niveau du promoteur en recrutant le complexe NuRD-HDAC1 de déacétylation des histones (Schultz et al., 2001), l'histone méthyltransférase SETDB1 spécifique de la lysine 9 de l'histone H3 (Schultz et al., 2002) et les protéines HP1. TIF1 β a également été démontré interagir avec le complexe de remodelage de la chromatine à activité histone déacétylase N-CoR1/HDAC3 (Underhill et al., 2000).

Pour déterminer si ces complexes interviennent également dans la formation de la structure de type hétérochromatine des gènes cibles endogènes de TIF1 β , nous envisageons de réaliser dans un premier temps des ChIP classiques avec des anticorps dirigés contre différentes sous-unités de ces complexes. Nous pourrions réaliser dans un second temps des doubles ChIP (Re-ChIP) avec une première ChIP anti-TIF1 β suivie d'une seconde ChIP avec un anticorps dirigé contre l'une de ses sous-unités de ses complexes précédemment cités; cette analyse nous permettra de déterminer si TIF1 β interagit directement avec ces complexes au niveau du promoteur des gènes cibles.

Il a été démontré aussi que les protéines HP1 sont capables d'interagir avec l'histone méthyltransférase Suv39h1 responsable de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Aagaard et al., 1999; Schotta et al., 2002; Jia et al., 2004) et de recruter d'autres facteurs participant à la formation de l'hétérochromatine tels que les ADN méthyltransférases Dnmt3a et Dnmt3b (Bachman et al., 2001; Fuks et al., 2003; Lehnertz et al., 2003). De même, une étude récente a montré que la localisation de TIF1 β au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique est dépendante de la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 catalysée par les histones méthyltransférases Suv39h1/h2 (Briers et al., 2009). Il est donc vraisemblable que les histones méthyltransférases Suv39h1/h2 et les ADN méthyltransférases Dnmt3a et Dnmt3b participent à la répression de certains gènes cibles; leur recrutement au niveau des régions promotrices des gènes sera donc aussi analysé par des expériences de ChIP classiques et de Re-ChIP.

Dans le cas particulier du gène *MEST*, nous avons mis en évidence que la perte d'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 entraîne une rapide réactivation de l'expression de ce gène. Celle-ci s'accompagne d'un enrichissement en triméthylation de H3K27 au niveau de la région promotrice. Il sera donc particulièrement intéressant d'observer par des expériences de ChIP classiques si l'histone méthyltransférase spécifique de la lysine 9 de l'histone H3 (probablement SETDB1), présente sur le promoteur *MEST* dans les cellules TIF1 β ^{+/-}, est remplacée dans les cellules TIF1 β ^{HP1box^{-/-}} par une histone méthyltransférase

impliquée dans la triméthylation de lysine 27 de l'histone H3, telle que EZH1 ou EZH2 du groupe Polycomb PRC2 (Shen et al., 2008).

D'autre part, des découvertes récentes tendent à démontrer que l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 n'est pas toujours requise, et que TIF1 β pourrait exercer sa fonction répressive par différents mécanismes en interagissant aussi avec d'autres complexes. Des éléments ont été apportés en faveur de cette hypothèse par l'analyse qui a été faite dans les cellules Ntera2 humaines; cette étude a montré que seulement 25% des sites de liaison de TIF1 β aux promoteurs des gènes cibles sont également enrichis en triméthylation de H3K9, site de reconnaissance pour les protéines HP1. De plus 61% des sites de liaison sont caractérisés par une absence de triméthylation de H3K9 et de H3K27 bien que ces gènes soient le plus souvent dans un état réprimé (O'Geen et al., 2007). D'autres études ont montré ensuite que TIF1 β peut interagir avec différentes protéines telles que la protéine MDM2 (Wang et al., 2005), le facteur de transcription E2F1 (Wang et al., 2007), la KRAB-ZFP Apak (Tian et al., 2009) ou encore avec STAT1 et STAT3 (Kamitani et al., 2008; Tsuruma et al., 2008) et coopère, dans tous ces cas, avec des HDAC pour réprimer la transcription en favorisant la déacétylation des histones.

Il semble ainsi que certains gènes cibles de TIF1 β soient régulés par un mécanisme indépendant des protéines HP1. Dans le cadre d'une recherche globale de différents mécanismes de répression exercés par TIF1 β (voir II.4.), il serait donc aussi important d'identifier tous les partenaires protéiques et les complexes associés à TIF1 β , par une approche utilisant la spectrométrie de masse par exemple.

II. Quelle est l'implication de TIF1 β dans la régulation de l'expression des gènes à l'échelle de génome ?

1. Les gènes cibles de TIF1 β sont régulés par différents mécanismes

Dans le but d'identifier des gènes directement régulés par TIF1 β , susceptibles de jouer un rôle physiologique majeur au cours de la différenciation cellulaire et d'élucider peu à peu les voies de signalisation contrôlées par ce corépresseur transcriptionnel, nous avons réalisé une expérience de ChIP-seq sur des cellules F9 sauvages traitées pendant 36h à l'AR.

Cette analyse par ChIP-seq a mis en évidence un nombre considérable de régions du génome murin enrichies en TIF1 β dans les cellules F9; la majorité des sites de fixation se

trouvent dans des régions promotrices (40%) ou de régions distales (46.8%), à proximité d'un gène connu. De façon intéressante, ces régions sont souvent fortement enrichies en îlots CpG par rapport à l'ensemble du génome (~ 1 à 2 %) (Bird, 1986) et, pour la majorité des gènes, on retrouve un seul site principal de fixation de TIF1 β . Ces données suggèrent fortement que les complexes TIF1 β /HP1 régulent l'expression de gènes en reconnaissant des régions régulatrices bien précises du génome, souvent caractérisées par la présence d'un îlot CpG.

Notre analyse a mis également en évidence que les gènes cibles de TIF1 β sont très souvent ($\geq 85\%$ des gènes analysés) plus fortement exprimés dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* par rapport aux cellules *TIF1 β ^{+/-}*, suggérant que la répression de ces gènes nécessite l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 dans les cellules F9. Pourtant, l'analyse des différents profils d'expression met en évidence que ces gènes pourraient être régulés par des mécanismes distincts en fonction de l'état de différenciation des cellules. Pour certains gènes, l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 semble nécessaire uniquement dans les cellules non différenciées alors que pour d'autres, cette interaction est importante uniquement au cours de la différenciation. Les gènes dérégulés uniquement au cours de la différenciation en endoderme primitif seront particulièrement intéressants à caractériser dans la suite de l'analyse car ils pourraient être impliqués dans le contrôle de la progression de la différenciation en endoderme pariétal.

On retrouve aussi de nombreux gènes qui sont surexprimés dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}*, quelque soit l'état de différenciation. Ils sont donc toujours réprimés par un mécanisme qui nécessite une interaction entre TIF1 β et les protéines HP1. D'autres gènes se comportent comme le gène *MEST* : ils sont surexprimés dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* par rapport aux cellules *TIF1 β ^{+/-}*, aussi bien en présence qu'en absence d'AR, et sont induits de façon équivalente dans les deux types cellulaires en présence d'AR. Ces gènes sont donc maintenus réprimés dans les cellules non différenciées par un mécanisme qui dépend de l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 mais leur induction au cours de la différenciation en endoderme primitif est indépendante de cette interaction. Il est à noter aussi que pour le moment, nous n'avons pas encore trouvé de gènes présentant une différence d'expression aussi importante entre les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* et les cellules *TIF1 β ^{+/-}* que celle qui a été observée pour *MEST*. Ce gène *MEST* demande donc vraisemblablement d'être très fortement réprimé par les complexes TIF1 β -HP1 et c'est sans doute pour cela que l'on

observe par des expériences de ChIP classiques dans les cellules WT un enrichissement aussi important en TIF1 β au niveau de la région promotrice.

L'analyse de l'expression de s g ènes ré gulés pa r T IF1 β suggère f ortement qu e l e mécanisme impliqué dans la répression de ces gènes ne nécessite pas toujours la présence des protéines HP1. Pour l e m oment, la v alidation du recrutement d e TIF1 β au ni veau du promoteur des gènes isolés par le ChIP-seq n'a été réalisée par des ChIP classiques qu' au cours de la différenciation sur des cellules F9 WT. Il sera donc aussi important d'analyser le recrutement de TIF1 β et des protéines HP1 dans des cellules non différenciées. De plus, la validation du r ecrutement a été faite en com parant l 'enrichissement obs ervé en TIF1 β au niveau des régions promotrices des gènes dans les cellules WT par rapport à celui observé dans de s cel lules *TIF1 β ^{-/-}/rTA-f.TIF1 β* (qui n'e xpriment qu'un e t très fa ible qu antité d'un transgène flag-TIF1 β). Il sera donc aussi important d'étudier le recrutement de TIF1 β dans des cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}*; la comparaison des enrichissements en TIF1 β dans les cellules WT et les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* devrait e n e ffet nous pe rmettre de di stinguer ce qui dépend de l'interaction avec les protéines HP1.

D'autre part, pour progresser dans la compréhension de ces mécanismes de répression, il est important d'arriver à identifier le ou les site (s) consensus de fixation des KRAB-ZFP. Les études réalisées jusqu'à présent suggèrent que les différentes KRAB-ZFP reconnaissent des sites consensus de fixation distincts, car plusieurs consensus d'une taille de 5 à 27 pb ont été identifiés (Zheng et al., 2000; Gebelein et Urrutia, 2001; Peng et al., 2002; Jing et al., 2004; Hu et al., 2009). P our le moment, nous a vons e ssayé de trouver un s ite consensus à partir d'un nombre assez limité de nos séquences isolées par ChIP-seq en utilisant différents programmes disponibles sur le web (Weeder, MEME, MDscan). Cette étude ne nous a pas permis d'identifier avec précision un seul site de fixation. Il est donc très vraisemblable que les KRAB-ZFP et les complexes de répression TIF1 β /HP1 reconnaissent plusieurs consensus différents et une recherche plus poussée par bioinformatique sur un nombre plus important de séquences sera donc nécessaire pour pouvoir identifier le ou les site (s) consensus. Une fois que ces s ites s eront identifiés, il d eviendra i ntéressant d' arriver à r épondre à pl usieurs questions da ns la s uite du proj et : (1) C omment les interactions entre TIF1 β , les protéines HP1 et les KRAB-ZFP sont-elles régulées ? (2) Comment les KRAB-ZFP reconnaissent-elles les séquences cibles sur l'ADN ? Nécessitent-elles la formation au préalable d'un complexe ternaire dans le nucléoplasme avec TIF1 β et les protéines HP1, comme cela semble déjà être

le cas pour les complexes TIF1 β /HP1 ? (3) Les mécanismes de répression dépendant de l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1, et ceux indépendants de cette interaction, peuvent-ils se faire par l'intermédiaire d'une même KRAB-ZFP et au niveau du même site consensus ?

2. TIF1 β joue-il un rôle au niveau des LTR et des séquences répétées de type SINE ?

Notre analyse des sites de liaison de TIF1 β à l'échelle du génome a mis en évidence qu'une grande proportion des séquences isolées par le ChIP-seq sont caractérisées par la présence de séquences répétées. De façon intéressante, les séquences isolées sont enrichies en LTR (*Long Terminal Repeats*) (15.2%) et en répétitions de type SINE (*Short INterspersed Element*) (13.4%) alors qu'elles sont presque dépourvues de répétitions de type LINE (*Long INterspersed Element*) (1.5%), suggérant très fortement que des sites de fixation de TIF1 β se trouvent dans ces régions. Cette observation est d'un intérêt particulier, car les découvertes récentes tendent à montrer que ces séquences ont pu être utilisées au cours de l'évolution pour servir de moyens de régulation au niveau de gènes codant pour des protéines et de gènes codant pour des ARN. Les LTR contiennent en effet souvent des séquences régulatrices qui peuvent servir de promoteurs alternatifs pour des gènes se trouvant à proximité (pour revue, Cohen et al, 2009); ils peuvent être utilisés ainsi pour augmenter l'expression d'un gène ou permettre une expression dans un tissu spécifique. Plusieurs études réalisées chez l'homme ont montré par exemple que les gènes *Cyp19a1*, *Il2rb* et *Nos3* peuvent être exprimés spécifiquement dans le placenta grâce à un LTR (Cohen et al., 2009). Ils peuvent aussi servir de promoteur pour des ARN non codant; cela a été observé par exemple pour des transcrits anti-sens tels que *UCA1* (Conley et al., 2008; Wang et al., 2008). Des études réalisées sur l'ensemble du génome ont permis aussi d'identifier des sites de fixation pour des facteurs de transcription tels que pour p53, CTCF et ESR1 au niveau des LTR (Bourque et al., 2008; Feschotte, 2008; Cohen et al., 2009); cela renforce l'idée que ces éléments transposables peuvent jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes.

De plus ces séquences répétées sont souvent des constituants majeurs de l'hétérochromatine et TIF1 β est connu pour être impliqué dans la formation d'une structure de type hétérochromatine au niveau du promoteur des gènes cibles et/ou dans le recrutement de ces gènes cibles au niveau des compartiments d'hétérochromatine constitutive (Cammass et al., 2002; Schultz et al., 2002; Ayyanathan et al., 2003; Sripathy et al., 2006). Quelques études

récentes ont d'ailleurs déjà permis de montrer que TIF1 β est capable de reconnaître une région bien précise, la région PBS (*Primer Binding Site*), au niveau du LTR des rétrovirus M-MLV (*Moloney murin leukemia virus*) et de réprimer leur transcription (Wolf et Goff, 2007; Wolf et al., 2008) par l'intermédiaire d'une KRAB-ZFP et des protéines HP1 (Wolf et Goff, 2009). Il est donc vraisemblable que TIF1 β joue un rôle important dans la répression de rétroéléments en reconnaissant des séquences régulatrices au niveau des LTR.

En ce qui concerne les répétitions de type SINE, des découvertes récentes suggèrent que celles-ci peuvent être impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes en étant reconnues par des facteurs de transcription. Il a été démontré par exemple que la reconnaissance de ces séquences par le complexe de transcription TFIIC permet d'activer la transcription en limitant la propagation des marques épigénétiques répressives (triméthylation de H3K9 et de H3K27) dans les régions promotrices de gènes au niveau des îlots CpG (Noma et al., 2006; Tomilin, 2008) (**figure 37**). Et il a été suggéré que ce complexe peut être déplacé au niveau des promoteurs de gènes spécifiques de certains tissus par des complexes répresseurs pour réprimer ces gènes. Chez les eucaryotes, les répétitions de type SINE pourraient ainsi servir à activer ou réprimer un gène par un mécanisme très simple et participer de cette manière à la régulation de la différenciation cellulaire au cours du développement. Il est donc tout à fait possible que TIF1 β reconnaisse ces répétitions de type SINE et participe à l'établissement et à la propagation des marques épigénétiques répressives au niveau des îlots CpG dans les promoteurs de gènes (**figure 37**).

Il pourra être intéressant de déterminer si TIF1 β utilise le même type de mécanisme de répression au niveau des LTR et de séquences de type SINE et en particulier si une interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 est nécessaire pour leur recrutement mutuel au niveau de ces séquences et pour la répression exercée dans ces régions.

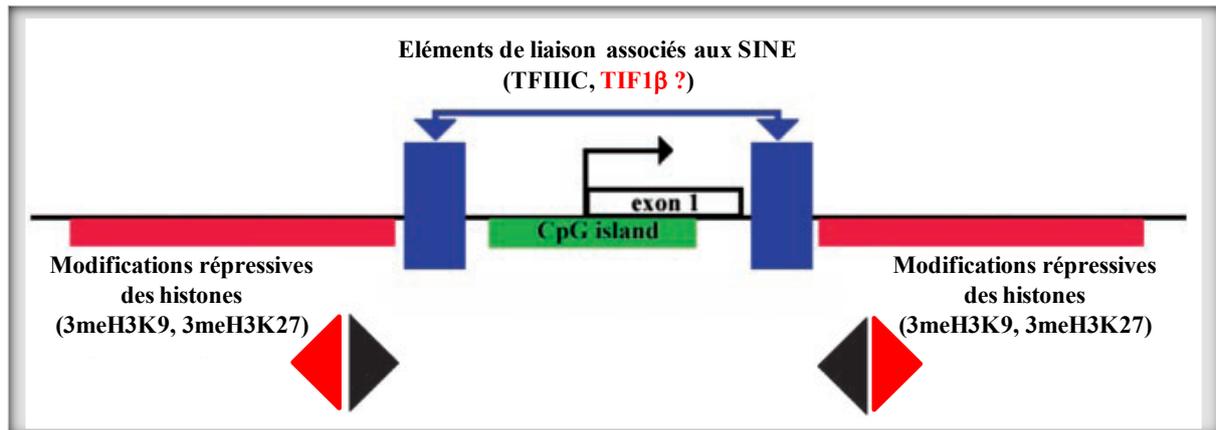


Figure 37 : Schéma illustrant la fixation possible du complexe TFIIC et de TIF1 β au niveau de sites de liaison associés aux SINE. Dans ce modèle, TFIIC pourrait limiter la propagation de marques épigénétiques répressives alors que TIF1 β réprimerait les gènes en favorisant la propagation de ces marques de répression. 3meH3K9/K27 : triméthylation de la lysine 9/27 de l'histone H3 (modifié de Tomilin, 2008).

3. TIF1 β est un régulateur majeur de la physiologie cellulaire

La recherche des gènes cibles que nous avons réalisé a permis d'identifier plus de 4000 régions du génome enrichies en TIF1 β dans les cellules F9 dont plus de 1600 gènes directement régulés au niveau de la région promotrice. Une étude récente réalisée par la technique de ChIP-on-ChIP dans les cellules ES avait permis également d'identifier plus de 3000 gènes directement régulés par TIF1 β au niveau de la région promotrice, suggérant ainsi fortement que TIF1 β est un régulateur majeur de l'expression des gènes (Hu et al., 2009). Une analyse bioinformatique à l'aide du logiciel Ingenuity a mis en évidence que les gènes cibles de TIF1 β dans les cellules F9 sont majoritairement des gènes impliqués dans l'expression des gènes, la mort cellulaire, la croissance et la prolifération cellulaire et le cancer. Ces catégories fonctionnelles de gènes étaient également celles qui ressortaient le plus dans les cellules ES. Si dans l'ensemble, nous ne retrouvons environ qu'un tiers de gènes en commun avec les gènes cibles identifiés dans les cellules ES, il apparaît néanmoins clairement que TIF1 β est un régulateur majeur de la physiologie cellulaire en régulant l'expression d'un nombre très important de gènes essentiels à la croissance et à la survie cellulaire. Il est possible que certaines voies régulées par TIF1 β ne soient pas les mêmes dans les cellules F9 et les cellules ES, ce qui pourrait expliquer en partie le fait que nous ne retrouvons pas les mêmes gènes. Plusieurs voies de signalisation pourraient ainsi être dérégulées, ce qui peut expliquer le fait que TIF1 β régule un nombre important de gènes impliqués dans l'expression de gènes.

D'autre part, il y a aussi certains gènes identifiés dans les cellules ES que nous retrouvons également par le ChIP-seq mais que nous n'avons pas pris en compte pour le moment dans notre analyse car ils ressortent avec moins de 20 tags et sont donc vraisemblablement reconnus par TIF1 β avec une plus faible affinité.

Les deux études réalisées dans les cellules F9 et les cellules ES mettent donc en évidence que TIF1 β exerce un rôle majeur sur les fonctions globales de la cellule, plutôt que sur des fonctions spécifiques. Ces données permettent ainsi de mieux comprendre pourquoi TIF1 β est indispensable au cours du développement embryonnaire précoce et que les embryons TIF1 $\beta^{-/-}$ meurent dès le stade 6.5 (Cammass et al., 2000). De même, des études réalisées au laboratoire suggèrent que TIF1 β exerce des fonctions essentielles dans les cellules ES et les cellules F9. En effet, l'inactivation de TIF1 β dans les cellules ES entraîne une mort cellulaire massive et une différenciation spontanée; d'autres données suggèrent que dans les cellules F9 une infime quantité de TIF1 β est nécessaire pour maintenir ces cellules en vie (résultats non publiés). Ces résultats permettent aussi de confirmer que toutes les fonctions exercées par TIF1 β ne nécessitent pas une interaction avec les protéines HP1 car, à la différence des KO cellulaires, les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* sont viables même si elles présentent des défauts de différenciation terminale en endoderme pariétal et viscéral (Cammass et al., 2004). Il est possible que l'identification des gènes régulés par les complexes TIF1 β -HP1, qui exercent des fonctions essentielles pour cette différenciation terminale des cellules F9, soit assez difficile du fait que TIF1 β régule un nombre aussi considérable de gènes. Pour identifier ces gènes, il sera donc important de poursuivre l'analyse des gènes cibles de TIF1 β identifiés par le ChIP-seq et de coupler ces données à des analyses transcriptomiques au cours de la différenciation. La poursuite de l'analyse fonctionnelle des gènes cibles de TIF1 β avec le programme Ingenuity permettra sans doute aussi d'identifier des voies de signalisation importantes pour les différentes étapes de la différenciation cellulaire et du développement.

D'autre part, notre étude, ainsi que celle réalisée dans les cellules ES a mis en évidence que les gènes cibles de TIF1 β sont fortement enrichis en gènes impliqués dans le cancer. Cela suggère que certaines voies de signalisation, régulées par TIF1 β , pourraient être actives dans certains cancers même si, à l'heure actuelle, TIF1 β n'a été trouvé associé à aucune forme de cancer chez l'homme. Il a déjà été démontré que TIF1 β est impliqué dans plusieurs voies de signalisation, en particulier dans les voies IFN/STAT1 et IL6/STAT3 (Kamitani et al., 2008; Tsuruma et al., 2008). Parmi les gènes cibles de TIF1 β que nous avons isolés par le ChIP-seq,

nous avons par exemple aussi retrouvé le gène *STAT1*. Ce gène est un gène impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire et possède une activité de suppresseur de tumeur (Stephanou et Latchman, 2003), renforçant l'hypothèse d'une fonction possible de TIF1 β dans le développement de certains cancers.

4. Par quels mécanismes, les gènes cibles de TIF1 β sont-ils régulés ?

Le développement des techniques récentes de ChIP-on-ChIP et de ChIP-seq a apporté des avancées considérables dans la compréhension des mécanismes de régulation transcriptionnelle à très grande échelle. Il est pourtant toujours à prendre en considération que ces techniques donnent parfois une certaine variabilité; c'est pour quoi la combinaison de plusieurs méthodes et de plusieurs approches est souvent nécessaire pour arriver à obtenir une réponse claire à une question.

L'étude qui a été réalisée jusqu'à présent a mis en évidence que de très nombreux gènes sont régulés par TIF1 β . Mais par quels mécanismes sont-ils réellement régulés ? Pour arriver à comprendre ces mécanismes, plusieurs techniques ainsi que d'autres analyses à grande échelle devront sans doute être envisagées. Il sera en effet très intéressant dans la suite du projet de chercher tout d'abord à identifier les régions du génome enrichies pour chacun des isoformes des protéines HP1 ainsi que pour certaines marques épigénétiques répressives (triméthylation de H3K9, H3K27 et H4K20) et certaines marques associées à l'activation (acétylation de H3K9 et triméthylation de H3K4). Cette étude pourrait être réalisée par plusieurs ChIP-seq aussi bien dans des cellules F9 non différenciées que dans des cellules différenciées. Cela devrait nous permettre d'identifier les gènes cibles réprimés par un mécanisme d'hétérochromatinisation dépendant de l'interaction avec les protéines HP1, en comparant pour chaque étude les régions enrichies dans le génome. Il pourrait en suite être intéressant d'étudier la localisation génomique des histones méthyltransférases SETDB1 spécifique de H3K9 et EZH2 spécifique de H3K27 ainsi que des ADN méthyltransférases Dnmt3a et Dnmt3b, de façon à déterminer à quel moment ces protéines interviennent ainsi que leur impact réel dans l'établissement de marques épigénétiques répressives. Enfin, l'étude de la localisation à l'échelle du génome des histones déacétylases HDAC1 et HDAC3 pourrait également fournir des données essentielles pour distinguer les gènes réprimés par un mécanisme dépendant de l'interaction avec les protéines HP1 de ceux qui n'en dépendent pas. D'autre part, des études similaires par ChIP-seq peuvent aussi être envisagées pour certains

variants d'histones, notamment le variant H3.3 associé à des régions transcriptionnellement actives (Ahmad et Henikoff, 2002) et le variant H2AZ qui a été montré plutôt impliqué dans la formation de structures condensées de type hétérochromatine grâce à son interaction avec la protéine HP1 α (Fan et al., 2004). Il serait en effet intéressant de savoir si certains variants d'histones interviennent dans le mécanisme de répression exercé par TIF1 β en remplaçant une histone majeure au cours de la différenciation.

Parallèlement à toute cette caractérisation de la structure chromatinienne de ses gènes cibles de TIF1 β , nous poursuivrons aussi l'étude de la localisation sub-nucléaire de certains de ces gènes par DNA-FISH dans des cellules non différenciées ainsi qu'au cours de la différenciation. Nous pourrions également utiliser la technique d'immuno-FISH de façon à pouvoir analyser la position relative du gène cible par rapport à la localisation nucléaire de TIF1 β et au compartiment hétérochromatinien. Cela devrait nous permettre de progresser dans la compréhension du rôle fonctionnel de la relocalisation de TIF1 β et de déterminer si la localisation sub-nucléaire des gènes cibles de TIF1 β constitue un mode de régulation de leur expression génique. A partir des données de l'ensemble de la caractérisation des gènes cibles de TIF1 β , il sera sans doute possible de déterminer si la répression de ces gènes nécessite toujours une relocalisation niveau de l'hétérochromatine, ainsi que les partenaires protéiques de TIF1 β impliqués dans cette relocalisation.

Parallèlement, il sera aussi important de chercher à identifier les complexes associés à TIF1 β aussi bien dans les cellules non différenciées que dans les cellules différenciées en endoderme primitif. Cette étude pourra être réalisée par spectrométrie de masse et devrait permettre d'identifier de nouveaux partenaires de TIF1 β en fonction de l'état de différenciation des cellules. Cela apportera des données essentielles pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la répression transcriptionnelle et dans la relocalisation nucléaire, grâce à la détermination de la composition des complexes présents au niveau des compartiments eucromatiniens et hétérochromatiniens. Il sera de plus possible par cette technique de trouver de nouveaux partenaires de TIF1 β qui participent à la répression des gènes à travers un mécanisme indépendant de l'interaction avec les protéines HP1 et d'identifier des modifications post-traductionnelles de TIF1 β importantes pour la régulation de ses fonctions ainsi que pour son interaction avec d'autres partenaires.

D'autre part, du fait de la capacité limitée de différenciation des cellules F9, il est très vraisemblable que toutes les fonctions de l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1 ne

puissent pas être étudiées dans ce système cellulaire. En effet, l'interaction TIF1 β -HP1 est nécessaire pour la différenciation terminale des cellules F9 en endoderme pariétal mais il est possible que cette interaction soit également indispensable pour le contrôle de d'autres voies de différenciation. Pour identifier d'autres fonctions possibles de cette interaction, il pourra donc être envisager de commencer aussi de nouvelles études dans un autre système cellulaire. Les cellules ES pourraient constituer un bon modèle car elles permettent d'étudier toutes les voies de différenciation qui ont lieu au cours du développement embryonnaire. Il serait ainsi d'un grand intérêt d'établir une lignée de cellules ES exprimant une protéine TIF1 β mutée au niveau du motif HP1box pour déterminer si l'interaction TIF1 β -HP1 est requise dans d'autres voies de différenciation.

L'ensemble de cette étude de vrait nous fournir de s données essentielles pour la compréhension des mécanismes de répression transcriptionnelle de TIF1 β et nous permettre de mieux caractériser les événements épigénétiques survenant au cours de la différenciation cellulaire, la cinétique de modifications de ces événements ainsi que leur mécanisme de transmission.

Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis de démontrer que l'interaction entre le corépresseur TIF1 β et les protéines HP1 est essentielle à l'établissement et au maintien d'une structure condensée de type hétérochromatine au niveau du promoteur du gène cible *MEST in vivo*. La recherche des gènes cibles à l'échelle du génome a mis en évidence que TIF1 β est un régulateur majeur de la physiologie cellulaire en régulant l'expression d'un nombre très important de gènes importants pour la croissance et la survie cellulaire.

Ces recherches ont permis d'apporter un éclairage nouveau sur le rôle de TIF1 β et plus généralement de la dynamique de la chromatine dans la régulation de l'expression des gènes ainsi que sur les mécanismes de répression exercés par les complexes TIF1 β /HP1. La caractérisation de la structure chromatinienne ainsi que l'étude de la localisation sub-nucléaire des gènes cibles et de s programmes biologiques régulés par TIF1 β devrait fournir de s informations essentielles sur les mécanismes de régulation épigénétique qui interviennent au cours de la différenciation cellulaire et de s étapes du développement précoce chez les mammifères.

Annexes

Annexe I

Tableau R1 : Classement des différentes catégories fonctionnelles de gènes avec le programme Ingenuity en fonction de la p-valeur.

Catégories	P-value	- Log (p-valeur)
Expression des gènes	1.15E-07	6.94
Mort cellulaire	5.18E-06	5.29
Croissance et prolifération cellulaire	7.66E-06	5.12
Cancer	9.54E-06	5.02
Maladies du système reproductif	9.54E-06	5.02
Désordres tissus connectifs	1.01E-04	4.00
Mouvement cellulaire	2.30E-04	3.64
Interaction et signalisation cellulaire	2.96E-04	3.53
Développement et fonction tissus connectifs	2.96E-04	3.53
Transport moléculaire	3.56E-04	3.45
Trafic protéines	3.56E-04	3.45
Cycle cellulaire	4.52E-04	3.34
Développement tissus	6.12E-04	3.21
Maladies rénales et urologiques	8.79E-04	3.06
Développement et fonction système squelettique et musculaire	1.03E-03	2.99
Métabolisme lipides	1.17E-03	2.93
Petites molécules biochimiques	1.17E-03	2.93
Maladies gastrointestinales	1.53E-03	2.82
Réplication recombinaison et réparation ADN	1.72E-03	2.76
Maladies cardiovasculaires	1.92E-03	2.72
Morphologie cellulaire	1.92E-03	2.72
Réponse cellulaire aux médicaments	1.92E-03	2.72
Développement et fonction système digestif	1.92E-03	2.72
Développement et fonction système hématologique	1.92E-03	2.72
Hématopoïèse	1.92E-03	2.72
Maladies neurologiques	1.92E-03	2.72
Développement organes	1.92E-03	2.72
Morphologie organes	1.92E-03	2.72
Anormalités et blessures organismes	1.92E-03	2.72
Morphologie tissus	1.92E-03	2.72
Maladie respiratoire	2.02E-03	2.69
Organisation cellulaire	2.07E-03	2.68
Développement cellulaire	2.08E-03	2.68
Maladies dermatologiques	2.15E-03	2.67
Développement et fonction système cardiovasculaire	2.19E-03	2.66
Désordres génétiques	2.19E-03	2.66
Modifications post-traductionnelles	2.89E-03	2.54
Repliement protéines	2.89E-03	2.54
Métabolisme Carbohydrates	3.68E-03	2.43
Désordres système endocrine	3.68E-03	2.43
Compromis cellulaire	4.51E-03	2.35
Métabolisme acides nucléiques	4.51E-03	2.35
Production energie	5.19E-03	2.28
Développement embryonnaire	5.61E-03	2.25
Fonction et maintenance cellulaire	6.32E-03	2.20
Développement et fonction cheveux et peau	6.39E-03	2.19
Développement et fonction système hépatique	6.39E-03	2.19
Mécanisme Infection	6.39E-03	2.19
Maladies métaboliques	6.39E-03	2.19
Développement et fonctions du système nerveux	6.39E-03	2.19
Survie Organisme	6.39E-03	2.19
Morphologie tumeur	6.39E-03	2.19
Maladie Système hépatique	7.15E-03	2.15
Maladies infectieuses	8.19E-03	2.09
Signalisation cellulaire	8.32E-03	2.08
Réponse inflammatoire	8.49E-03	2.07
Maladies immunologiques	1.15E-02	1.94
Désordres musculaires et squelettiques	1.19E-02	1.92
Développement et fonction système reproductif	1.20E-02	1.92
Trafic cellules immunitaires	1.22E-02	1.91
Présentation Antigen	1.82E-02	1.74
Métabolisme drogues	1.82E-02	1.74
Maladies hématologiques	1.82E-02	1.74
Développement et fonction système visuel	1.82E-02	1.74
Métabolisme vitamines	1.82E-02	1.74
Développement organisme	2.12E-02	1.67
Réponse immunitaire médiée par cellules	2.43E-02	1.61
Synthèse protéines	2.63E-02	1.58
Maladie inflammatoire	2.72E-02	1.57
Maladies ophtalmologiques	3.41E-02	1.47
Désordre développemental	3.44E-02	1.46

Annexe I**Tableau R2 : Liste des gènes pour chaque catégorie fonctionnelle**

Catégories fonctionnelles	Gènes
Expression des gènes	Rnf2, Maged1, Ctcf, Jmjd3, Tcf15, Axin1, Kras, Polrmt, Pkn2, Gatad2a, Jarid2, Klf1, Kat2a, Ranbp3, Reep5, Brf2, Cdh1, Pric285, Myst3, Btg2, Sumo2, Ctdsp2, Xrcc5, Rnf10, Nme1, Ddit3, Prdx1, Trh, Rbbp7, Neurod4, Tgm2, Baz2a, Actr3, Sos1, Rybp, Tlr3, Casp8, Znf398, Ucp2, Zfp57, Mrpl12, Trib3, Eno1, Maz, Med4, Tcf712, Pou5f1, Gstp1, Polr2d, Trim24, Mllt6, Sfrs6, Abcg1, Meis1, Ecd, Brf1, Ppm1d, Gdf6, Tcf25, Pim1, Bckdha, Matr3, Chd2, Als2cr8, Rasa1, Map3k7ip1, Pelp1, Ddx54, Fstl3, Meox1, Irf9, Thra, Tp53bp2, Ncoa3, Aes, Gmeb2, Xrcc6, Neurog3, ETV5, Pebp1, Zfp87, Jarid1b, Arid1a, Frat1, Cobra1, Tert, Foxl1, Ccna2, Stub1, Ldb1, Arid3a, Stat1, Atf1, Axud1, Nfatc4, Sertad1, Itgb3, Sertad3, Klf5, Rcor2, Tead3, Ing1, Kctd11, Il11, Bmp4, Sox12, Gtf2e2, Ddx20, Cby1, Cbfb, Txn, Ccnt2, Tead2, Dnmt1, Fgr, Ywhaz, Itga5, Tfp4, Gtf2f1, Med12, Pih12, Max, Cited2, Patz1, Inhbe, Neurog2, Ehm2, Senp1, Hxim2, Nr3c2, Smurf2, Mafa, Helb, Notch1, Foxk1, Alk, Map2k6, Fn1, Zfp36, Wwtr1, Psm9, Trip4, Prkcz, Puma, Id1, Klf9, Sec61a1, Jun, Myst1, Hus1, Rarb, Nacc1, Pura, Cited2, Itgb1, Plagl1, Adrm1, Znf174, Ppp1r8, Tial1, Fus, Znf148, Onecut3, Sox6, Atf7ip, Igf2bp2, Apbb2, Pax6, Dv3, Hoxb4, Supt3h (Includes Eg:8464), Ash2l, Foxc2, Dyrk1a, Birc2, Orc2l, Iif2, Pfn1, Gtf3c6, Men1, Supt5h, Ncoa5, Amph, Ablim2, Klf2, Mcm5, Spp1, Sap30, Inhbb, Pkn1, Mnt, Ctdp1, Znf274, Npas4, Agrn, Hes7, Ptms, Crebl2, Blnk, Med23, Pa2g4, Mkl1, Ing4, Zmiz1, Tgif1, Nfx1, Gtf2b, Nfkb1a, Map3k7, Alas1, Smad4, Nr2f6, Erf, Arid5b, Calr, Ppard, Hdac1, Pknox2, Bcl3, Ndufa13, Mllt1, Parp1, Ebf1, Lpar1, Zbtb7b, Cxorf15
Mort cellulaire	St6gall, Maged1, Ctcf, Axin1, Rrm2b, Kras, Ptger1, Por, Pkn2, Gnpnat1, Gatad2a, Gdf5, Cyba, Fbln1, Traf4, Kat2a, Cdk5rap3, Shisa5, Fbl, Tnfrsf9, Ddit4, Slc2a1, Rfc1, Capn10, Asah1, Cdh1, Top2b, Btg2, Itpr3, Psmb1, Zyx, Ptpa, Abcel, Xrcc5, Prdx2, Nme1, Ddit3, Ptpn9, Gfra3, Prdx1, Il17rd, Dapk2, Gdf15, Galnt2, Tac4, Tgm2, Yes1, Cd47, Cldn4, Hsp90ab1, Abcb7, Hoxa5, Rybp, Ube2k, Tlr3, Casp8, Ndufaf1, Ucp2, Il15, Trib3, Sneg, Sh3bp5, Ldlr, Eno1, Xaf1, Psap, Arhgdia, Slc5a5, Cth, Pou5f1, Akap1, Gstp1, Meis1, Abcg1, Brf1, Pvr, Ppm1d, Pim1, Dag1, Rasa1, Pelp1, Tjp2, G2e3, Wee1, Dido1, Fem1b, Aurkaip1, Irf9, Ppp1r11, Thra, Tp53bp2, Ncoa3, Pfkml, Npcl, Aes, Nol3, Serinc3, Xrcc6, Mtmr7, Mdk, Actn4, Hspb1, Rbbp4, Pmepa1, Pebp1, S100a6, Frat1, Tert, Ext1, Rnasel, Phka2, Hdgf, Ccna2, Rhot1, Stub1, Cables2, Opa1, Nampt, Stat1, Sncl, Gzmc, Hla-Dma, Lama5, Atf1, Flt1, Nfatc4, Fgf6, Itgb3, Tenc1, Capns1, Klf5, Ing1, Wfs1, Pafah1b3, Il11, Bmp4, Tyro3, Ddx20, Nck1, Lrpap1, Mia, Cd2ap, A4galt, Smg1, Cbfb, Txn, Dusp12, Dnmt1, Itgb5, Fgr, Timp2, Peg3, Ptpg, Moap1, Ralb, Snai1, Itga5, Tfp4, Ckap2, Timp4, Max, Plcg2, Senp1, Dvl2, Lrig1, Notch1, Mtlf, Alk, Map2k6, Mmefn1, Zfp36, Ptpn13, Dusp6, Tpd52l1, Slc1a3, Atns, Prkcz, Timm50, Trpm2, Eif4ebp1, Puma, Id1, Jun, Mtle, Adk, Rarb, Lamp1, Hla-B, Nacc1, Pura, Fkbp5, Cited2, Plat, Itgb1, Endog, Plagl1, Adrm1, Ppif, Ppp1r8, Tial1, Fus, Prkeg, Znfl48, Sox6, Crk, Tnfrsf13, Stry2, Cd244, Ripk3, Apbb2, Bnip3l, Pax6, Hoxb4, Cldn3, Birc2, Sema7a, Orc2l, Slc31a1, Ccni, Cln8, Unc5b, Taf10, Men1, Pbk, Prkaa1, Adnp, Thap1, C1qbp, Klf2, Sh3kbp1, Dsp, Ddx41, S100a10, Cdc25a, Dnase2, Spp1, Casp3, Birc6, Paxip1, Arrb2, Mnt, Stradb, Cxcr7, Znf274, Use1, Mbtps1, Nuak1, Eif5a, Agrn, Vdac1, Cx3cl1, Bcc4, Pvr12, Blnk, Sfrp2, Pa2g4, Ahoa1, Clu, Mkl1, Ins13, Ing4, Bcar1, Cdc88a, Nfkb1a, Ppp3cb, Ticam1, Map3k7, Dusp10, Cit, Rabggtb, Hsd11b2, Smad4, Mmp11, Pk3ip1, Calr, Ppard, Hdac1, Bcl3, Bax, Ndufa13, Parp1, Emp1, Ebf1, Lpar1, Bik

Catégories fonctionnelles	Gènes
Croissance et prolifération cellulaire	<p>Eif1ay, Rnf2, St6gall, Maged1, Znf385a, Ctf, Tcn2, Prkab1, Axin1, Kras, Fbxo4, Ptger1, Por, Gnpnat1, Gdf5, Kif13a, Fbln1, Jarid2, Klf1, Pdia5, Amacr, Tnfrsf9, Rfc1, Ptpn3, Brf2, Cdh1, Fscn1, Btg2, Fads2, Zyx, Sumo2, Ptpa, Xrcc5, Prdx2, Nme1, Ddit3, Trh, Gfra3, Prdx1, Gdf15, Rbbp7, Etfhd, Mtch1, Tac4, Sept9, Neurod4, Tgm2, Sfa3, Cd47, Cldn4, Abcb7, Hoxa5, Sos1, Ly6e, Tlr3, Casp8, Irx3, Dph1, Pkm2, Ucp2, Il15, Map7, Rps19, Sncg, Slc29a1, Arf1, Eno1, Maz, Psap, Cth, Tcf7l2, Pou5f1, Gstp1, Noc3l, Mllt6, Diras1, Abcg1, Meis1, Brf1, Ppm1d, Pvr, Arx, Anxa11, Pim1, Rasa1, Top3b, Pelp1, Tjp2, Fstl3, Wee1, Thra, Nco3, Tp53bp2, Fgf17, Cdc42bpb, Serinc3, Gipc1, Xrcc6, Lima1, Slc7a7, Actn4, Mdk, Pmepa1, Rbbp4, Pebp1, Sumo3, Kcnn4, S100a6, Mycl1, Tert, Rps6ka3, Ifitm3, Wdr6, Igfbp1, Sema4c, Hdgf, Cna2, Diaph1, Stub1, Nampt, Arid3a, M6prbp1, Stat1, Mmp19, Lama5, St3gal2, Psrcl, Rfx1, Npy1r, Flt1, Upp1, Pla2g1b, Nfatc4, Cnot8, Sertad1, Actg1, Itgb3, Fgf6, Pdap1, Sertad3, Tenc1, Capns1, Abtb1, Nt5e, Hla-E, Klf5, Ing1, Kctd11, Il11, Ftl, Bmp4, Tyro3, Nck1, Ddx20, Polm, Gss, Lrpap1, Lifr, Mia, Itga9, Cfb, Txn, Slc12a4, Frs2, Itgb5, Dnmt1, Them4, Timp2, Ptpg, Calm3, Angptl6, Snail, Ralb, Itga5, Bmyc, Timp4, Asgr1, Max, Patz1, Plcg2, Senp1, Nr3c2, Ebna1bp2, Cdc14a, Mest, Lrig1, Dus2l, Foxo1, Notch1, Mtlf, Alk, Map2k6, Vpreb1, Fn1, Ptpn13, Cdt1, Eusp6, Wwtr1, Slc1a3, Prkc, Eif4ebp1, Ptma, Usp3, Uchl1, Klf9, Id1, Sec61a1, Jun, Mtl1e, Rarb, Lefty1, Pura, Fkbp5, Cited2, Oxtr, Plat, Itgb1, Plagl1, Ppp1r8, Dpagt1, Tial1, Fus, Znf148, Dgkz, F11r, Trpm7, Sox6, Crk, Spry2, Tnfrsf13, Cd244, Apbb2, Pax6, Hoxb4, Foxc2, Trim25, Neurl, Ilf2, Pfn1, Ccn1, Unc5b, Atf5g2, Men1, Pbk, Styx, Pcyt1b, Ifi30, C1qbp, Klf2, Dsp, Ralgs, Calm1, Cdc25a, Mcm5, Col4a1, Spp1, Casp3, Cltc, Birc6, Paxip1, Bcar3, Agrap, Pkn1, Inhbb, Arrb2, Tob2, Mnt, Cxcr7, B3gnt3, Znf274, Atp6v0d1, Eif5a, Ak2, Vdac1, Ythdf2, Cx3cl1, Abcc4, Jmjd1b, Blnk, Rab1a, Pa2g4, Apo1, Mmp15, Clu, Cacb3, Ing4, Ins1, Bcar1, Tgfr1, Zmiz1, Gtf2b, Cdc88a, Nfkb, Ticam1, Map3k7, Dusp10, Hsd11b2, Smad4, Ltbp4, Mmp11, Erf, Pik3ip1, Calr, Arid5b, Ppard, Hdac1, Fto, Bcl3, Bax, Ndufa13, Mllt1, Parp1, Cdkn2aip, Emp1, Lpar1, Mash2, Ubc</p>
Cancer	<p>St6gall, Hnrnp1, Nes, Ctf, Axin1, Por, Gorasp2, Traf4, Sh3gl1, Ccne2, Ywhag, Slc2a1, Ddit4, Nduf7, Pds1, Top2b, Itpr3, Kcnk6, Ddit3, Rragb, Prdx1, Dapk2, Sept9, Cldn4, Pncr1, Ly6e, Pkm2, Ndufa1, Ucp2, Rps19, Serpinb6, Arf1, Tik1, Eno1, Pou5f1, Gstp1, C13orf15, Diras1, Ppm1d, Anxa11, Tubal1, Wee1, Aurkaip1, Mtmr7, Ets2, Hspb1, Pebp1, Mycl1, Rnd1, Ext1, Phka2, Stub1, Stat1, Lasp1, Atf1, Flt1, Nfatc4, Itgb3, Klf5, Ing1, Rap2b, Aspsr1, Bmp4, Tyro3, Nck1, Gss, Lrpap1, Rad23a, Mia, Cfb, Dnmt1, Fgr, Tesk1, Peg3, Ptpg, Moap1, Itga5, Ckap2, C6orf211, Phf12, Cacng3, Plcg2, Mest, Notch1, Sigr1, Ptpn13, Ppp1r3c, Slc1a3, Atn1, Prkc, Eif4ebp1, Klf9, Jun, Mtl1e, Ssr2, Letm2, Cog2, Fkbp5, Pura, Oxtr, Mylpf, Tmed2, Stac2, Prkc, Nudt5, Ripk3, Hoxb4, Neurl, Ilf2, Pfn1, Unc5b, Men1, Pbk, Pcyt1b, Prkaa1, C1qbp, S100a10, Golp3, Mcm5, Col4a1, Slc25a1, Casp3, Pole2, Cltc, Alad, Cd97, Cntnap2, Inhbb, Ctdp1, Stmn3, Armet, Nuak1, Sptan1, Crebl2, Blnk, Zfat, Sfrp2, Pa2g4, Slc46a1, Mmp15, Mkl1, Mll3, Spsb1, Nfkb, Dusp10, Smad4, Pik3ip1, Mthfd11, Emilin1, Calr, Ppard, Cotl1, Tubal1, Plekha7, Bax, Pfkf, Mllt1, Parp1, Emp1, Mgc13057, Uqcr1, Arhgap8, Dpysl2, Maged1, Ankrd35, Gbra5, Rrm2b, Gbas, Kras, Pch2, Ptger1, Pkn2, Cyba, Fbln1, Kat2a, Amacr, Tnfrsf9, Rpl27, Brf2, Cdh1, Slc46a3, Fscn1, Btg2, Zyx, Rnf160, Ptpa, Xrcc5, Abcc1, Prdx2, Nme1, Zfyve26, Ptpn9, Gdf15, Hsd17b11, Znf827, Gpsn2, Tgm2, Gins2, Cd47, Yes1, Hsp90ab1, Cdh3, Abcb7, Hoxa5, Sos1, Tlr3, Casp8, Il15, Cdh6, Pdlim2, Slc2a1, Sncg, Mnd1, Znf791, Ldlr, Tmem106c, Xaf1, Psap, Arhgdia, Slc5a5, Med4, Tcf7l2, Akap1, Rpl22, Trim24, Meis1, Pvr, Gpr4, Pim1, Snhg3-Rcc1, Bckdha, C17orf81, Slc39a4, Dag1, Rasa1, Map3k7ip1, Kifc1, Brwd2, Pelp1, Fstl3, Tmc5, Thra, Ppp1r11, Tssk6, Nco3, Tp53bp2, Pfkf, Apoc1, Npc1, Nol3, Gipc1, Xrcc6, Ndufa6, Neurog3, Gck, Rusc2, Mdk, Ptpn21, Rbbp4, Pmepa1, Abi2, S100a6, Arid1a, Slc1a4, Spire2, Sox1, Ppib, Tert, Rps6ka3, Foxo1, Rnasel, Igfbp1, Vps4a, Cna2, Diaph1, Cables2, Arid3a, Nampt, M6prbp1, Mmp19, Lama5, Npy1r, Upp1, Actg1, Tenc1, Capns1, H3f3a, Hla-E, Abtb1, Wfs1, Kctd11, Ftl, Myl6, Tm9sf2, Lifr, Polr3a, Itga9, A4galt, Smg1, Txn, Dusp12, Crim1, Itgb5, Timp2, Tubb2a, Ralb, Snail, Tfap4, Timp4, Colec12, Max, Nr3c2, Helb, Dvl2, Lrig1, Dus2l, Mtlf, Alk, Map2k6, Mme, Fn1, Wwtr1, Dusp6, Cttna3, Tpd52l1, Lefty2, Ptma, Idh1, Id1, Ppap2b, Rarb, Adk, Lefty1, Rho, Hla-B, Lamp1, Plat, Itgb1, Plagl1, Adrm1, Ppp1r8, Mlflip, Fus, Znf148, F11r, Crk, Spry2, Tnfrsf13, Bnip3, Foxc2, Ash2l, Cldn3, Birc2, Cblc, Aurkb, Supt5h, Rock2, Pold3, Ifi30, Adnp, Stard3nl, Clcn3, Eif2c1, Klf2, Ralgs, Agbl5, Cdc25a, Spp1, Pafah2, Nup155, Bcar3, Rac3, Arrb2, Mnt, Arhgap18, Tube1, Cxcr7, Ak2, Vdac1, Abcc4, Cx3cl1, Aoc3, Apo1, Clu, Ing4, Clec3b, Bcar1, Adsl, Cdc88a, Ppp3cb, Map3k7, Rabggtb, Hsd11b2, Alass1, Ltbp4, Mmp11, Nr2f6, Erf, Alpl, Vangl1, Hdac1, Bcl3, Ndufb4, Ndufa13, Lpar1, Bik, Cald1</p>

Catégories fonctionnelles	Gènes
Maladies du système reproductif	Ctcf, Nes, Axin1, Gbas, Kras, Ptger1, Por, Pkn2, Gorasp2, Cyba, Fbln1, Kat2a, Tnfrsf9, Ddit4, Ndufs7, Brf2, Cdh1, Pds1, Fscn1, Top2b, Btg2, Zyx, Kcnk6, Rnf160, Ptptra, Xrcc5, Abcl1, Nme1, Ddit3, Rragb, Dapk2, Gdf15, Gpsn2, Sept9, Yes1, Cd47, Hsp90ab1, Cldn4, Cdh3, Pnrc1, Hoxa5, Casp8, Il15, Rps19, Pdlim2, Slc2a1, Sncg, Serpinb6, Mnd1, Znf791, Arf1, Ldlr, Tmem106c, Xaf1, Arhgdia, Slc5a5, Med4, Pou5f1, C13orf15, Gpr4, Slc39a4, Tubal1c, Rasa1, Map3k7ip1, Pelp1, Fstl3, Wee1, Tmc5, Nco3, Gipc1, Xrcc6, Ndufa6, Neurog3, Gck, Rusc2, Rbbp4, Etv5, Pebp1, Abi2, Rnd1, Sox1, Ppib, Tert, Rps6ka3, Rnasel, Igf2bp1, Vps4a, Ccna2, Diaph1, Stat1, Stat1, Lasp1, Npy1r, Flt1, Nfatc4, Itgb3, H3f3a, Abtb1, Ing1, Rap2b, Myl6, Tm9sf2, Lrpap1, Rad23a, Lifr, Polr3a, Itga9, A4galt, Smg1, Txn, Crim1, Dnmt1, Itgb5, Peg3, Timp2, Ptpg, Moap1, Tubb2a, Snail, Ralb, Itga5, Tfp4, C6orf211, Phf12, Timp4, Max, Helb, Lrig1, Mest, Notch1, Mtlf, Map2k6, Mme, Fn1, Ptpn13, Wwtr1, Lefty2, Prkcz, Eif4ebp1, Idh1, Id1, Jun, Mtl1e, Rarb, Lefly1, Hla-B, Ccg2, Letm2, Fkbp5, Pura, Oxtr, Itgb1, Tmed2, Stac2, Znf148, Bnip3l, Foxc2, Cldn3, Ash2l, Birc2, Pfn1, Aurkb, Pbk, Supt5h, Pcyt1b, Ifi30, Prkaa1, Stard3nl, C1qbp, Klf2, Agbl5, Golph3, Cdc25a, Slc25a1, Spp1, Col4a1, Nup155, Casp3, Pole2, Cd97, Bcar3, Rac3, Arrb2, Ctdp1, Cxcr7, Stmn3, Tube1, Sptan1, Ak2, Abcc4, Sfrp2, Slc46a1, Clu, Ing4, Clec3b, Bcar1, Spsb1, Nfkb1a, Ppp3cb, Map3k7, Rabggtb, Smad4, Mmp11, Calr, Ppard, Hdac1, Tuba4a, Bax, Ndufa13, Parp1, Mgcl3057, Lpar1, Bik, Uqcrc1, Arhgap8
Désordres tissus connectifs	Ftl, Gstpl, Axin1, Rrm2b, Unc5b, Kras, Nck1, Men1, Gnpnat1, A4galt, Pim1, Txn, Klf2, Peg3, Spp1, Casp3, Birc6, Sah1, Npc1, Arrb2, Cdh1, Scnn1g, Stradb, Xrcc6, Uel1, Senp1, Nr3c2, Notch1, Abcc4, Mtlf, Fn1, Ddit3, Tert, Clu, Galnt2, Mkl1, Rnasel, Prkcz, Eif4ebp1, Tgm2, C14orf2, Id1, Jun, Cldn4, Mtl1e, Stat1, Cables2, Ube2k, Opa1, Arid3a, Casp8, Pura (Includes Eg:5813), Stat1, Itgb1, Flt1, Il15, Bax, Nfatc4, Fus, Parp1, Prkcg, Capns1, Eno1, Bik, Bnip3l, Cldn3, Birc2
Mouvement cellulaire	Dpysl2, St6gal1, Bmp4, Nes, Lrpap1, Ptger1, Lifr, Gdf5, A4galt, Itga9, Fbln1, Cdk5r2, Txn, Itgb5, Timp2, Slc2a1, Mtss1, Ralb, Snail, Itga5, Timp4, Cdh1, Neurog2, Fscn1, Top2b, Zyx, Lrig1, Ptptra, Mme, Flnb, Nme1, Fn1, Gfra3, Wwtr1, Gdf15, Slc1a3, Sept9, Prkcz, Neurod4, Tgm2, Id1, Cd47, Jun, Cldn4, Cdh3, Sos1, Casp8, Plat, Itgb1, Il15, Pdlim2, Sncg, Prkcg, Fl1r, Ldlr, Spry2, Tnfrsf13, Pax6, Abpb2, Cldn3, Unc5b, Pbk, Pvr, Arx, Gpr4, Klf2, Map3k7ip1, S100a10, Spp1, Col4a1, Casp3, Cd97, Bcar3, Rac3, Nco3, Arrb2, Gipc1, Nuak1, Plcb3, Mdk, Cx3cl1, Etv5, Pebp1, Aoc3, S100a6, Sfrp2, Sox1, Mmp15, Clu, Ing4, Bcar1, Igf2bp1, Sema4c, Ccdc88a, Diaph1, Smad4, Lasp1, Mmp19, Calr, Lama5, Atf1, Mrc2, Vangl1, Flt1, Pla2g1b, Bax, Itgb3, Ebf1, Capns1, Lpar1, Nt5e, Il11, Arhgap8
Interaction et signalisation cellulaire	St6gal1, Bmp4, Kras, Nck1, Lrpap1, Pvr, Pkn2, Rock2, Gnpnat1, Itga9, Adnp, Dag1, Rasa1, Tesk1, Dsp, Itgb5, Fgr, Svil, Timp2, S100a10, Spp1, Casp3, Itga5, Cdc42bpb, Cdh1, Gp5, Trim63, Plcg2, Zyx, Agrn, Vdac1, Ptptra, Cx3cl1, Rbbp4, Pvr2, Alk, Fn1, Arid1a, Rnd1, Trh, Ppib, Gdf15, Cttna3, Bcar1, Cd47, Cdh3, Smad4, Sxt18, Tlr3, Casp8, Oxtr, Emilin1, Itgb1, Lama5, Calr, Mrc2, Vangl1, Pdlim2, Bax, Vdac3, Itgb3, Spry2, Cald1
Développement et fonction tissus connectifs	Noc3l, Ctcf, Axin1, Mllt6, Tyro3, Kras, Men1, Lrpap1, Pvr, Rock2, Gnpnat1, Itga9, Cby1, Fbln1, Adnp, Cbfb, Klf2, Itgb5, Ralgs, Timp2, Pelp1, Spp1, Cltc, Itga5, Ckap2, Cdh1, Mnt, Cxcr7, Btg2, Lima1, Zyx, Ebna1bp2, Mdk, Vdac1, Notch1, Mtlf, Alk, S100a6, Rnd1, Fn1, Sfrp2, Ddit3, Wwtr1, Tert, Rps6ka3, Bcar1, Tgif1, Idh1, Hdgf, Ptma, Jun, Nfkb1a, Mtl1e, Cdh3, Sos1, Pura, Itgb1, Calr, Arid5b, Mrc2, Npy1r, Ppard, Hdac1, Trib3, Bax, Itgb3, Parp1, Ebf1, Sox6, Lpar1, Nt5e, Spry2, Klf5, Hoxb4, Foxc2, Tcf7l2, Il11
Transport moléculaire	Aspser1, Ergic3, Tcn2, Kpna6, Abcg1, Arf4, Snapin, Kpna4, Slc2a1, Capn10, Lman1, Slc2a4, Npc1, Erp29, Stradb, Kcnj10, Uel1, Gck, Nr3c2, Eif5a, Vdac1, Mtlf, Ap3b2, Rab4a, Rab1a, Apoal, Ppp1r3c, Cubn, Tert, Slc1a3, Prkcz, Ptma, Ipo9, Yes1, Cd47, Mtl1e, Ppp1r10, Adk, Stx18, Cog2, Gosr1, Itgb1, Calr, Hla-Dma, Ucp2, Ap4m1, Ykt6, Klhl2, Strada, Nutf2, Prkcg, Ppp1r3b, Arf1, Lin7b, Ldlr, Sox6, Tlk1, Eno1, Aplg1
Trafic protéines	Ergic3, Aspser1, Fn1, Rab4a, Rab1a, Kpna6, Trh, Abcg1, Prkcz, Rock2, Diaph1, Ipo9, Ppp1r10, Arf4, Stx18, Gosr1, Cog2, Snapin, Hla-Dma, Kpna4, Calr, Ap4m1, Ykt6, Strada, Klhl2, Lman1, Nutf2, Lin7b, Arf1, Erp29, Tlk1, Stradb, Uel1, Arhgdia, Eif5a, Aplg1, Ap3b2
Cycle cellulaire	Rnf2, Maged1, Ctcf, Bmp4, Rrm2b, Kras, Cd2ap, Gorasp2, Jarid2, Klf1, Txn, Vcpip1, Anapc11, Kat2a, Frs2, Dnmt1, Cdk5rap3, Timp2, Amacr, Ccne2, Cclm3, Ywhag, Snail, Itga5, Anln, Ckap2, Ptovl, Cdh1, Max, Top2b, Ehmt2, Btg2, Cdc14a, Lrig1, Ptptra, Notch1, Xrcc5, Map2k6, Fn1, Ddit3, Cdt1, Gdf15, Rbbp7, Tpd52l1, Asns, Sept9, Prkcz, Id1, Klf9, Jun, Mtl1e, Hus1, Rarb, Rhou, Mcph1, Pura, Cited2, Itgb1, Plagl1, Strada, Il15, Tial1, Dgkz, Spry2, Apbb2, Pax6, Psap, Hoxb4, Trim25, Esx1, Tcf7l2, Orc2l, Ccni, Mllt6, C13orf15, Taf10, Aurkb, Men1, Ppm1d, Pvr, Saem11, Rock2, Pim1, C1qbp, Nedd4l, Kifc1, Calm1, Cdc25a, Spp1, Casp3, Wee1, Paxip1, Irf9, Txnl4b, Tp53bp2, Nco3, Ercc6l, Tob2, Mnt, Znf274, Xrcc6, Baz1b, Mdk, Rbbp4, Blnk, Jarid1b, Arid1a, Phc2, Pa2g4, Tert, Rps6ka3, Clu, Ing4, Wdr6, Vps4a, Tgif1, Ccna2, Nfkb1a, Cit, Smad4, Nampt, Arid3a, Stat1, Calr, Psrcl, Ppard, Flt1, Klhl2, Hdac1, Bcl3, Bax, Fkbp6, Parp1, Itgb3, C10orf46, Hmg20b, Abtb1, Bik, Ing1, Mash2, Il11

Catégories fonctionnelles	Gènes
Développement tissus	Rnd1, Fn1, Ppib, Lrpap1, Neurod4, Pkn2, Rock2, Cdk47, Gnpnat1, Itga9, Adnp, Dag1, Casp8, Irx3, Fgr, Itgb5, Timp2, Itgb1, Spp1, Fto, Meox1, Itga5, Bax, Ipp, Itgb3, Cdh1, Gp5, Plcg2, Pax6, Zyx, Cx3cl1, Notch1, Tcf7l2, Il11
Maladies rénales et urologiques	Ccni, Unc5b, Rrm2b, Kras, Pkn2, Por, Cd2ap, Gpr4, Prkaa1, Tuba1c, Timp2, Spp1, Casp3, Pole2, Moap1, Tubb2a, Tpp53bp2, Cdh1, Timp4, Tube1, Xrcc6, Top2b, Btg2, Acn2, Actn4, Vdac1, Mtlf, Hspb1, Map2k6, Ddit3, Il17rd, Frlt1, Clu, Trpm2, Nfkb1a, Cldn4, Mtl1e, Hsp90ab1, Ticam1, Stub1, Rarb, Nampt, Casp8, Plat, Itgb1, Ppard, Flt1, Hdac1, Tuba4a, Trib3, Bax, Emp1, Bnip3l, Arhgdia, Birc2a
Développement et fonction système squelettique et musculaire	Itgb1, Id1, Spp1, Fn1, Bmp4, Itga9, Itga5, Cx3cl1, Itgb3
Métabolisme lipides	Apoa1, Tert, Abcg1, Gpsn2, Asah1, Elovl6, Sepp1, Npc1, Ldlr, Pcyt2, Psap, Casp8, Etnk2, Prdx2
Petites molécules biochimiques	Aspser1, Tcn2, Abcg1, Pcyt2, Slc39a4, Txn, Adprhl2, Etnk2, Slc2a1, Capn10, Dcxr, Slc2a4, Asah1, Elovl6, Npc1, Gck, Vdac1, Mtlf, Hs3st5, Prdx2, Aoc3, Apoal, Prdx1, Ppp1r3c, Cubn, Tert, Slc1a3, Ext1, Gpsn2, Foxl1, Prkcz, Pma, Tgm2, Yes1, Cdk47, Mtl1e, Adk, Casp8, Itgb1, Calr, Ucp2, Bax, Prkcg, Ppp1r3b, Sepp1, Nudt5, Ldlr, Sox6, Nt5e, Eno1, Psap, Ndst2
Maladies gastrointestinales	Dpysl2, Hnrmp1, St6gal1, Flt1, Ankrd35, Axin1, Rrm2b, Kras, Gss, Por, Itga9, Txn, Itgb5, Timp2, Peg3, Tnfrsf9, Ywhag, Moap1, Tubb2a, Itga5, Ckap2, Cdh1, Colec12, Top2b, Fscn1, Itpr3, Mest, Mtlf, Xrcc5, Map2k6, Mme, Fn1, Ddit3, Dusp6, Cttna3, Gdf15, Hsd17b11, Tpd5211, Pma, Tgm2, Gins2, Yes1, Jun, Mtl1e, Hsp90ab1, Cldn4, Cdh3, Ppap2b, Hoxa5, Casp8, Plat, Pkm2, Itgb1, Il15, Rps19, Mifl1p, Cdh6, Fus, Nudt5, Tlk1, Arhgdia, Cldn3, Akap1, Ilf2, Neurl, Gstp1, Pfn1, Meis1, Men1, Pbk, Pold3, Gpr4, Anxa11, C17orf81, Tuba1c, Kifc1, S100a10, Cdc25a, Mcm5, Spp1, Pafah2, Col4a1, Casp3, Fstl3, Pole2, Weel, Cntnap2, Tpp53bp2, Apoc1, Arhgap18, Tube1, Cxcr7, Nuak1, Ptpn21, Rbbp4, Pmepa1, Aoc3, Sfrp2, Spire2, Pa2g4, Tert, Clu, Ing4, Mll3, Foxl1, Adsl, Ccna2, Diaph1, Map3k7, Smad4, Hsd11b2, Alas1, Mmp11, Ltbp4, M6prbp1, Stat1, Mthfd11, Lama5, Ppard, Vangl1, Flt1, Hdac1, Tuba4a, Bax, Actg1, Parp1, Itgb3, Emp1, Lpar1, Hla-E, Bik, Cald1, Wfs1
Réplication recombinaison et réparation ADN	Orc2l, Gstp1, Rrm2b, Men1, Pbk, Polm, Pold3, Smg1, Klf1, Kat2a, Dnmt1, Cdc25a, Mcm5, Ccne2, Dnase2, Casp3, Pole2, Paxip1, Rfc1, Asah1, Cdh1, Serinc3, Top2b, Xrcc6, Baz1b, Helb, Xrcc5, Rbbp4, Hspb1, Ptms, Nme1, Fn1, Ddit3, Cdt1, Ppib, Prdx1, Tert, Rbbp7, Clu, Tpd5211, Mthc1, Prkcz, Id1, Ccna2, Ccdc88a, Cdk47, Jun, Hus1, Pura, Casp8, Endog, Calr, Hdac1, Pla2g1b, Polg, Tial1, Bax, Parp1, Itgb3, Hmg20b, Nt5e, Bik
Maladies cardiovasculaires	Fn1, Pfn1, Apoal, Tubb2a, Tuba4a, Clu, Parp1, Idh1, Apoc1, Ldlr, Tube1, Lsr, Tuba1c, Plat, Npc1l1
Morphologie cellulaire	Bmp4, Znf385a, Axin1, Tyro3, Kras, Nck1, Mia, Itga9, Cdk5r2, Cbfb, Klf1, Kat2a, Tesk1, Dnmt1, Them4, Sh3gl1, Tnfrsf9, Ccne2, Snai1, Itga5, Cdh1, Max, Kcnj10, Btg2, Nr3c2, Lrig1, Ptptra, Notch1, Mtlf, Alk, Map2k6, Slc4a2, Fn1, Prdx1, Trh, Wwtr1, Gdf15, Cttna3, Sept9, Lefty2, Prkcz, Eif4ebp1, Yes1, Jun, Sos1, Rarb, Rhou, Cited2, Plat, Itgb1, Plagl1, Sncg, Prkcg, F11r, Spry2, Maz, Pax6, Hoxb4, Arhgdia, Ndst2, Pfn1, Meis1, Diras1, Men1, Aurkb, Pbk, Styx, Pvr, Ppm1d, Arx, Rock2, Gpr4, Pim1, Bckdha, Irgm, Adnp, Rasa1, Klf2, Ralgs, Cdc25a, Spp1, Casp3, Cltc, Thra, Ncoa3, Nol3, Mnt, Stradb, Actn4, Pvr2, Rbbp4, Pebp1, Kcnn4, Mycl1, Tert, Clu, Ing4, Bcar1, Ccna2, Diaph1, Smad4, Rhof, Gzmc, Emilin1, Flt1, Bax, Ndufa13, Mllt1, Itgb3, Lpar1, Ing1
Réponse cellulaire aux médicaments	Xrcc6, Xrcc5, Parp1
Développement et fonction système digestif	Itgb1, Lama5, Fn1, Pax6, Itga5
Développement et fonction système hématologique	Itgb1, Col4a1, Bmp4, Znf385a, Ddit3, Ppib, Meis1, Lrpap1, Pvr, Itgb3, F11r, Cdk47, Gp5, Ldlr, Nfkb1a, Plcg2, Hoxb4, Klf1, Notch1, Klf2, Cx3cl1, Fgr, Il11
Hématopoïèse	Bmp4, Znf385a, Hoxb4, Meis1, Klf1, Notch1, Klf2, Il11
Maladies neurologiques	Mme, Nes, Arid1a, Fn1, Sfrp2, Tert, Clu, Kras, Ptma, Pvr, Mtl1e, Lamp1, Tuba1c, Nr2f6, Tlr3, Casp8, Stat1, Plat, Itgb1, Spp1, Casp3, Tubb2a, Tuba4a, Itga5, Cisd2, Parp1, Itgb3, Tube1, Btg2, Wfs1, Notch1, Mtlf, Bsn
Développement organes	Gdf6, Itgb1, Lama5, Bmp4, Fn1, Rarb, Pax6, Itga5
Morphologie organes	Gdf6, Itgb1, Lifr, Bmp4, Fn1, Casp3, Ppard, Rarb, Pax6, Itga5, Bax
Anormalités et blessures organisms	Mme, Ldlr, Mtl1e, Apoal, Smad4, Kras, Tlr3, Mtlf, Npc1l1, Parp1

Catégories fonctionnelles	Gènes
Organisation cellulaire	Neurl, Cln8, Limk2, Kras, Nck1, Men1, Pvr, Rock2, Gorasp2, Cstad, Fscn2, Klf1, Vcpip1, Kat2a, Rasa1, Tesk1, Dsp, Spp1, Mtss1, Cltc, Ywhaz, Epb49, Itga5, C19orf20, Coro1c, Cdc42bpb, Cdh1, Nol3, Trim63, Fscn1, Lim a1, Zyx, Actn4, Baz1b, Nploc4, Agrn, Ptptra, Mtlf, Ap3b2, Rbbp4, Mme, Nme1, Fn1, Rnd1, Trh, Gdf15, Rbbp7, Bcar1, Prkcz, Timm50, Diaph1, Jun, Mtl1e, Cit, Opa1, Cog2, Rho, Itgb1, Ap3m1, Hdac1, Pla2g1b, Bax, Parp1, Itgb3, Arf1, Kifc3, Hmg20b, Spry2, Cald1, Arhgdia, Epb4112
Développement cellulaire	Maged1, Ctf, Bmp4, Axin1, Rrm2b, Kras, Nck1, Lifr, Pkn2, Cby1, Cdk5r2, Cbfb, Ccnt2, Klf1, Frs2, Itgb5, Itga5, Cdh1, Max, Neurog2, Mst3, Pcg2, Ehm2, Btg2, Nr3c2, Nctch1, Nme1, Slc4a2, Fn1, Ddit3, Trh, Il17rd, Krr1, Wwtr1, Neurod4, Idh1, Tgm2, Id1, Jun, Rarb, Hoxa5, Itgb1, Map7, Tial1, Trib3, Stra8, Sox6, Eno1, Spry2, Pax6, Hoxb4, Tcf7l2, Foxc2, Dyrl1a, Pou5f1, Noc3l, Meis1, Limk2, Men1, Syt, Rock2, C1qbp, Ralgds, Dsp, Bdh2, Pelp1, Spp1, Casp3, Fbx10, Thra, Inhb, Neurog3, Mdk, Pvr12, Pebp1, Blnk, Sfrp2, Pa2g4, Sox1, Tert, Clu, Ext1, Map3k7, Ldb1, Smad4, Arid3a, Siat1, Calr, Agfg1, Ppard, Hdac1, Bax, Mllt1, Itgb3, Ebf1, Kctd11, Pafah1b3, Il11
Maladies dermatologiques	Map2k6, Gstp1, Fn1, Ddit3, Il17rd, Tert, Unc5b, Kras, Trpm2, Tgm2, Por, Pkn2, Cd47, Jun, Pim1, Ticam1, Rarb, Prkaa1, Smad4, Tuba1c, Nampt, Casp8, Mmp19, Itgb1, Spp1, Casp3, Ppard, Moap1, Tubb2a, Tuba4a, Itga5, Trib3, Bax, Tp53bp2, Itgb3, Emp1, Cdh1, Tubel, Top2b, Xrcc6, Bnip3l, Ing1, Vdac1, Notch1, Hspb1, Birc2
Développement et fonction système cardiovasculaire	Itgb1, Aoc3, Bmp4, Spp1, Flt1, Meis1, Itgb3, Parp1, F11r, Gp5, Klf1, Klf2, Foxc2, Cited2
Désordres génétiques	Ftl, Maged1, Rrm2b, Kras, Por, Cd2ap, Dnmt1, Timp2, Tnfrsf9, Rpl27, Tubb2a, Scn1g, Top2b, Fscn1, Nr3c2, Fn1, Trh, Gdf15, Hsd17b11, Tpd5211, Pma, Tgm2, Gins2, Yes1, Jun, Cldn4, Hsp90ab1, Sos1, Rarb, Hoxa5, Ssr2, Casp8, Plat, Il15, Rps19, Mfl1p, Nudt5, Ldlr, Tlk1, Eno1, Arhgdia, Cldn3, Akap1, Ifl2, Neurl, Cblc, Aurkb, Men1, Pbk, Anxa11, Gpr4, Snhg3-Rcc1, C17orf81, Ifi30, Tuba1c, Eif2c1, Cln3, Kifc1, Mcm5, Spp1, Pafah2, Pole2, Cltc, Thra, Cntnap2, Apoc1, Arrb2, Tubel, Armet, Actn4, Ptpn21, Aoc3, S100a6, Spire2, Frat1, Apo1, Tert, Clu, Ing4, Clec3b, Mil3, Foxl1, Ccna2, Adsl, Diaph1, Rabggtb, Smad4, Hsd11b2, Mmp11, M6prbp1, Mthfd11, Ppard, Flt1, Hdac1, Tuba4a, Pfkp, Bax, Cisd2, Nduf4, Lpar1, Cald1, Wfs1
Modifications post-traductionnelles	St6gal1, Ftl, Ube2h, Bmp4, Men1, Lrpap1, Ppm1d, Fbxo11, Smg1, Txn, Dusp12, Nhlrc1, Anapc11, Kat2a, Pdia5, Calm3, Spp1, G2e3, Csnk1g2, Ywhaz, Fbxo22, Ptpn3, Lman1, Prmt7, Arrb2, Erp29, Ctdp1, Myst3, Ube2g1, Senp1, Mtmr7, Sumo2, Cx3cl1, Ptptra, Hs3st5, Ptpn21, Alk, Arl2, Map2k6, Sumo3, Nme1, Fn1, Ddit3, Apo1, Ptpn9, Prdx1, Ptpn13, Dusp6, Mmp15, Galnt2, Ing4, Phka2, Timm50, Uchl1, Cd47, Yes1, Ccdc88a, Hsp90ab1, Myst1, Ppp3cb, Stub1, Map3k7, Dusp10, Ltbp4, Tbcd, Fkbp5, Stat1, Plat, Ube3c, Itgb1, Calr, Atg10, Sirt5, Ppard, Fkbp6, Itgb3, Fgf6, Parp1, Erp44, Trpm7, Mylip, Cd244, Ripk3, Psap, Uck2, Epb4112, Dyrk1a
Repliement protéines	Arl2, Pdia5, Calr, Lman1, Fkbp6, Lrpap1, Erp44, Erp29, Hsp90ab1, Stub1, Ltbp4, Tbcd, Txn, Fkbp5
Métabolisme Carbohydrates	Aspscr1, Ppp1r3c, Slc1a3, Ext1, Pfk1, Ecd, Foxl1, Prkcz, Yes1, Pcyt2, Prkaa1, Adprhl2, Etnk2, Itgb1, Pkm2, Slc2a1, Capn10, Agl, Slc2a4, Pfk, Prkcg, Ppp1r3b, Nudt5, Eno1, Nt5e, Gck, Ndst2, Hs3st5
Désordres système endocrine	Maged1, S100a6, Fn1, Ddit3, Prdx1, Trh, Kras, Men1, Nfkb, Cldn4, Smad4, Txn, Stat1, Timp2, Plat, Itgb1, Ucp2, Casp3, Thra, Bax, Capn10, Parp1, Ldlr, Gck, Pax6, Cth, Prdx2
Compromis cellulaire	Hnrnp1, Ube2h, Bmp4, Tyro3, Gbas, Tm9sf2, Wbp4, Rad23a, Pkn2, Gatad2a, Polr3a, A4galt, Crim1, Dusp12, Kat2a, Rnd2, Slc2a1, Ndufs7, Ralb, Itga5, Tfap4, Gpt2, Phf12, Pds1, Myst3, Btg2, Sumo2, Zyx, Hs3st5, Mtlf, Trim7, Rnf10, Fn1, Rragb, Dapk2, Gpsn2, Pfk1, Idh1, Cd47, Mtl1e, Pnrc1, Lefty1, Cog2, Pura, Casp8, Itgb1, Il15, Tmed2, Slco2a1, Serpinb6, Stac2, Znf148, Mnd1, Znf791, Arf1, Ldlr, Med4, Limk2, Sfrs6, Prkaa1, Stard3nl, Dag1, C1qbp, Klf2, Mus81, Agbl5, Top3b, Golph3, Nup155, Casp3, Cd97, Pfk, Aes, Ctdp1, Uel1, Ndufa6, Gck, Neurog3, Rusc2, Sptan1, Arid1a, Rnd1, Slc46a1, Ppib, Rps6ka3, Bcar1, Rnasel, Vps4a, Map3k7, Rnh1, Stat1, Gzmc, Hdac1, Bax, Itgb3, H3f3a, Abtb1, Uqcr1, Rtn3
Métabolisme acides nucléiques	Ucp2, Tert, Gpsn2, Dcxr, Slc2a4, Elov6, Pma, Nudt5, Cd47, Sox6, Nt5e, Eno1, Gck, Adk, Adprhl2, Vdac1
Production énergie	Cd47, Ucp2, Sox6, Eno1, Adk, Tert, Vdac1, Slc2a4, Ptma
Développement embryonnaire	Rnf2, Bmp4, Pfn1, Unc5b, Kras, Lrpap1, Pkn2, Gdf5, Cby1, Prkaa1, Adnp, Dag1, Frs2, Itgb5, Timp2, Tjp2, Spp1, Casp3, Moap1, Meox1, Itga5, Tp53bp2, Cdh1, Xrcc6, Vdac1, Nctch1, Cx3cl1, Hspb1, Map2k6, Fn1, Il17rd, Sema4c, Trpm2, Id1, Jun, Ticam1, Ldb1, Lefty1, Nampt, Casp8, Irx3, Itgb1, Calr, Lama5, Ppard, Flt1, Fto, Trib3, Bax, Itgb3, Emp1, Bnip3l, Tcf7l2, Pou5f1, Birc2, Il11
Fonction et maintenance cellulaire	Neurl, Rnd1, Fn1, Bmp4, Trh, Kras, Uqcrb, Nck1, Bcar1, Krr1, Rock2, Adsl, Id1, Diaph1, Mtl1e, Stx18, Slc39a4, Rho, Rasa1, Itgb5, Itgb1, Ucp2, Mtss1, Pla2g1b, Itga5, C19orf20, Bax, Nfatc4, Cisd2, Itgb3, Arhgdia, Uqcr1, Vdac1, Ptptra, Mtlf, Rbbp4

Catégories fonctionnelles	Gènes
Développement et fonction système hépatique	Mt1e, Itga5, Mt1f, Itgb3
Mécanisme Infection	Sumo3, Ilf2, Pa2g4, Axin1, Frat1, Ppp1r8, Itga5, Bcl3, Lrpap1, Bcar1, Ncoa3, Itgb3, Gtf2b, Ldlr, Jun, Sumo2, Nr3c2, Tcf7l2
Maladies métaboliques	Apoc1, Ldlr, Scnn1g, Apoa1, Trh, Lsr, Thra, Nr3c2, Wfs1, Cisd2, Idh1, Npc1l1
Développement et fonctions du système nerveux	Bmp4, Fn1, Sox1, Axin1, Trh, Gfra3, Slc1a3, Clu, Lrpap1, Sema4c, Neurod4, Lifr, Arx, Id1, Adnp, Cdk5r2, Peg3, Plat, Itgb1, Ap3m1, Cltc, Bax, Vdac3, Prkeg, Arf1, Ebf1, Sox6, Neurog2, Slc17a7, Top2b, Btg2, Apbb2, Pax6, Mdk, Vdac1, Notch1, Ptpa, Ap3b2, Alk, Bsn
Survie Organisme	Rnf2, Rrm2b, Kras, Lifr, Por, Gnpat1, A4galt, Fbln1, Traf4, Cdk5r2, Txn, Klfl, Kat2a, Fbl, Ccne2, Tnfrsf9, Slc2a1, Anp1l6, Itga5, Asah1, Cdh1, Max, Kcnj10, Top2b, Ehm2, Nr3c2, Notch1, Xrcc5, Mt1f, Mme, Flnb, Slc4a2, Slc1a3, Tgm2, Klfl9, Mt1e, Hsp90ab1, Rarb, Adk, Ly6e, Tlr3, Casp8, Cited2, Plat, Itgb1, Endog, Ppif, Mylpf, Rps19, Fus, Ldlr, Slc17a7, Spry2, Bnip3l, Dyrk1a, Slc31a1, Pfn1, Men1, Spred2, Sacm1l, Rock2, Arx, Pcyt2, Amph, Irgm, Adnp, Rasa1, Klfl2, Dsp, Cdc25a, Col4a1, Tjp2, G2e3, Casp3, Birc6, Paxip1, Thra (Includes Eg:7067), Tp53bp2, Mnt, Xrcc6, Mbtps1, Neurog3, Phc2, Slc12a5, Nfkb1a, Map3k7, Stub1, Cit, Hsd11b2, Smad4, Stx4, Stat1, Erf, Calr, Atf1, Ppard, Flt1, Parp1, Itgb3, Capns1, Lpar1
Morphologie tumeur	Mme, Rpl22, Nme1, Gstp1, Fn1, Bmp4, Nes, Tert, Rps6ka3, Kras, Men1, Cd47, Pcyt1b, Nfkb1a, Mt1e, Pim1, Smad4, Nr2f6, Txn, Dnmt1, Itgb5, Timp2, Itgb1, Tnfrsf9, Slc25a1, Spp1, Col4a1, Casp3, Flt1, Itga5, Parp1, Itgb3, Arrb2, Timp4, Btg2, Nuak1, Mt1f, Xrcc5, Alk
Maladie Système hépatique	Itgb1, Fstl3, Casp3, Ddit3, Axin1, Itga5, Bax, Prkec, Ptger1, F11r, Cdh1, Tenc1, Nfkb1a, Mt1e, Nuak1, Smad4, Stat1, Casp8, Notch1, Mt1f, Cdc25a, Pmepa1
Maladies infectieuses	Hnrp1, Ube2h, Tyro3, Gbas, Sfrs6, Limk2, Tm9sf2, Wbp4, Rad23a, Pkn2, Polr3a, Gata2a, A4galt, Prkaa1, Srd3nl, C1qbp, Dag1, Dusp12, Crim1, Kat2a, Mus81, Klfl2, Agbl5, Golp3, Top3b, Rnd2, Nup155, Slc2a1, Ndufs7, Ralb, Tfap4, Cd97, Gpt2, Pfhf12, Pfkml, Aes, Pds1, Ctdp1, Ndufa6, Use1, Myst3, Btg2, Neurog3, Gck, Zyx, Rusc2, Sumo2, Sptan1, Hs3st5, Trim7, Rnf10, Rnd1, Arid1a, Fn1, Rragb, Slc46a1, Dapk2, Ppib, Rps6ka3, Pfkml, Gpsn2, Rnasel, Vps4a, Idh1, Map3k7, Pnrcl, Lefty1, Rnh1, Cog2, Stat1, Pura, Hdac1, Il15, Tmed2, Slc2a1, Stac2, Serpinb6, Mnd1, Znf148, Znf791, Arf1, H3f3a, Ldlr, Abtb1, Uqcr1, Med4, Rtn3
Signalisation cellulaire	Calr, Ccne2, Casp3, Cdk5r2, C13orf15, Hexim2, Bax, Ccnt2, Sertad1, Men1, Cdc25a
Réponse inflammatoire	Itgb1, Gp5, Nfkb1a, Ldlr, Ppib, Plcg2, Stx18, Cx3cl1, Lrpap1, Itgb5, Fgr, Itgb3
Maladies immunologiques	Itgb1, Spp1, Stub1, Nuak1, Bnip3l, Rnasel, Parp1
Désordres musculaires et squelettiques	Map2k6, Bmp4, Axin1, Dusp6, Tert, Mkl1, Traf4, Cables2, Hla-B, Prkaa1, Lamp1, Nampt, Dag1, Stat1, Casp8, Rasa1, Dsp, Timp2, Hla-Dma, Plagl1, Casp3, Ppif, Bax, Tp53bp2, Prkeg, Itgb3, Parp1, Cdh1, Arrb2, Scnn1g, Capns1, Xaf1, Psmb1, Bik, Bnip3l, Zyx, Nr3c2, Mdk, Hspb1
Développement et fonction système reproductive	Itgb1, Orc2l, Fn1, Bmp4, Ppard, Insl3, Bax, Sept9, Itgb3, Lifr, Itga9, Ldb1, Bik
Trafic cellules immunitaires	Aoc3, Itgb1, Dpysl2, Spp1, Fn1, Col4a1, Flt1, Il15, Pvr, Itgb3, Tgm2, F11r, Diaph1, Arrb2, Cd47, Ldlr, Nt5e, Tnfrsf13, Plcb3, Cx3cl1, Timp2
Présentation antigène	Nfkb1a, Ldlr
Métabolisme drogues	Tcn2, Cubn
Maladies hématologiques	Sigirr, Nme1, Rab4a, Fn1, Clu, Por, Rock2, Cd47, Diaph1, Gtf2b, Mt1e, Anxa11, Amph, Lamp1, Txn, Casp8, Plat, Timp2, Amacr, Dnase2, Casp3, Ranbp3, Fus, Nutf2, Itgb3, Parp1, F11r, Max, Lpar1, Top2b, Xrcc6, Neurog3, Cald1, Abcc4, Mt1f
Développement et fonction système visuel	Pax6, Neurod4
Métabolisme vitamines	Calr, Bax

<u>Catégories fonctionnelles</u>	<u>Gènes</u>
Développement organisme	Rnf2, Tjp2, Trim24, Atf1, Tcf15, Hoxa5, Traf4, Hes7, Dnmt1, Tgif1
Réponse immunitaire médiée par cellules	Itgb1, Dpysl2, Fn1, Col4a1, Il15, Itgb3, Tgm2, Arrb2, Diaph1, Ldlr, Plcb3, Cx3cl1, Timp2
Synthèse protéines	Rpl22, Ube2h, Cln8, Axin1, Tsfm, Abcg1, Nck1, Rad23a, Atg4c, Eif2c1, Mpl34, Tim p2, Unc13a, Casp3, Rpl3, Eef2, Fbxo22, Arkaip1, Capn10, Top1, Inhbb, Rpl37, Arh1, Cdh1, Eif3c, Mbtps1, Use1, Ube2g1, Senp1, Smurf2, Eif5a, Dus2l, Hspb1, Mme, Fn1, Ubr1, Abcf1, Man1b1, Igfbp1, Eif4ebp1, Usp3, Uchl1, Nfx1, Lnpep, Stub1, Ticam1, Ube2k, Eif3a, Mmp11, Ltbp4, Tlr3, Acol, Casp8, Dph1, Plat, Itgb1, Calr, Adrm1, Mrpl12, Rps19, Bcl3, Ndufa13, Prkcg, Rps10, Capns1, Ubc
Maladie inflammatoire	C14orf2, Ftl, Spp1, Tube1, Il15, Tubb2a, Tuba4a, Tuba1c
Maladies ophtalmologiques	Tgm2, Tube1, Tubb2a, Cltc, Tuba4a, Clu, Tuba1c, Timp2
Désordre développemental	Sos1, Kras

Annexe II**+ Séquences des oligonucléotides****1. PCR quantitative en temps réel**

- A4galt*** : BCY132 (sens) 5'-GACACACTTGCCACCATTTG-3'
BCY133 (antisens) 5'-TGTGAGCTGTGGAACCTCAGG-3'
- ARBP*** : BBC799 (sens) 5'-GTCGATGGAACCAGCCAATA-3'
BAI109 (antisens) 5'-CCTCCCACAACAAAACAACC-3'
- Birc6*** : BCY126 (sens) 5'-GGAAGAACTGGGACGTTGA-3'
BCY127 (antisens) 5'-CTTCCGAAGGCACAGAAAAG-3'
- Calr*** : BCY114 (sens) 5'-TCACGTGACTGAACCTCAGC-3'
BCY115 (antisens) 5'-CCTCTGACCAGAGAGGATGG-3'
- Ccdc88a*** : BCY120 (sens) 5'-CATGAGCGAGCAAGCAGA-3'
BCY121 (antisens) 5'-GAAAACCGCTGCAAGAGC-3'
- Cited2*** : BCY734 (sens) 5'-GCCAAAGCTACCAAGAGCTG-3'
BCY735 (antisens) 5'-TGGATGCACCCTTTAACTCC-3'
- Cog2*** : BCY742 (sens) 5'-GGGCAGTGACGTTTTCTCTC-3'
BCY743 (antisens) 5'-GCGCACTGTTGGTGATAAGA-3'
- Cpe*** : BCY142 (sens) 5'- CTCCTCTCGCTCACCTTC-3'
BCY143(antisens) 5'-ACGTGGGTCTGAACCAAGAA-3'
- Dus11*** : BCY116 (sens) 5'-GCCTTGTGAAACGAGAGAG-3'
BCY117 (antisens) 5'-TCGTTTCTATTGTGGTGGTG-3'
- Ebfl*** : BCY134 (sens) 5'-CGCTCCTTCCAGTTTAGACG-3'
BCY135 (antisens) 5'-TCATCCTTCCGCCTTATCAC-3'
- Gk5*** : BCY744 (sens) 5'- GCCATCTTTGCCAAATTCC-3'
BCY745 (antisens) 5'- CGGAGCTATAAACGCCAGAC-3'
- Jub*** : BCY748 (sens) 5'-GGGGGAGTGAAAAGGAACTC-3'
BCY749 (antisens) 5'-GGCCCCCTGTCTTATCACTT-3'
- Kcnj10*** : BCY122 (sens) 5'-GGGAACAGCGAATAACTTGG-3'
BCY123 (antisens) 5'-CAGAATGGAGGAACCAGGAC-3'
- Kctd17*** : BCY740 (sens) 5'- CCCCCTACAAAGCAGAACAA-3'
BCY741 (antisens) 5'- ATGCCGGGAGCTGTAGTCT-3'
- Krr1*** : BCY128 (sens) 5'-TTATCCGGAACCTCGTTTTGC-3'
BCY129 (antisens) 5'-GGGTCTCACGCTTCTGT TTC-3'
- Limk2*** : BCY138 (sens) 5'-CGCCTGCGGTCTAGAGAA-3'
BCY139 (antisens) 5'- CTAGGTGCGGGAGTTACCAG-3'
- Mapkbp1***: BCY150 (sens) 5'- AGGCTCTAGTTCGCGTTTTG-3'
BCY151(antisens) 5'- CACACCCACTGCCTACTTCA-3'
- Mash2*** : BCX669 (sens) 5'-CTAGGACGCGATTTGCAATG-3'
BCX670 (antisens) 5'-TTTCAAGCCTGAGCAAGACC-3'
- Max*** : BCY730 (sens) 5'-CGCGAGTTGTCAGGAGATTT-3'
BCY731 (antisens) 5'-TTTTGGCAGCCAGTTTCTCT-3'
- Mest*** : AID184 (sens) 5'-CAGCAGCTTCTGGCATGTGG-3'
BAL374 (antisens) 5'-TAAATGGCTAGGGAATGGAC-3'
- Mrpl39*** : BCY124 (sens) 5'-GGGACCGGATGCTAGGAG-3'
BCY125 (antisens) 5'-AAGGCGCCTGTGTGACTC-3'

Pkm2: BCY726 (sens) 5'-CGCAGCTGTGATAACCTTGA-3'
BCY727 (antisens) 5'-CTCTGGGGACAGATGGCTTA-3'

Sox8 : BCY736 (sens) 5'-GGCTAAGGGTGAAGTACTGC-3'
BCY737 (antisens) 5'-CCAGAGATGCGGCAGAGT-3'

Svil : BCY746 (sens) 5'-GGGCTCTATTTACCCGAAGC-3'
BCY747 (antisens) 5'-GGGCTCTATTTACCCGAAGC-3'

Taf10 : BCY728 (sens) 5'-GGCGAGCTGTGTGAGATGT-3'
BCY729 (antisens) 5'-GAAGACCGTCAGGAGACTGG-3'

Ylpm1 : BCY130 (sens) 5'-CCCATAGGGCGTTAGGATCT-3'
BCY131 (antisens) 5'-CGGAGAACAAGGCCAGATA-3'

2. RT-PCR quantitative en temps réel

A4galt : BCO189 (sens) 5'-GAGCATGAGAGGACAAG-3'
BCO190 (antisens) 5'-TCTCCTCCAGATGGGAAC-3'

Birc6 : BCO170 (sens) 5'-CTGCTGGAAACCATAGATG-3'
BCO171 (antisens) 5'-TTGGCTGCAAGAGGATCC-3'

Calr : BDA431 (sens) 5'-GGAGGATGATTGGGACTTTC-3'
BDA432 (antisens) 5'-TCCTCAGGCTTCTTAGCATC-3'

Cited2 : AIC277 (sens) 5'-TGGCAGACCATATGATGGCC-3'
AIC278 (antisens) 5'-GCTGCTGCTGCTGGTGATG-3'

Dus11 : BDA433 (sens) 5'-TGAGGAACCTCACAAAACC-3'
BDA434 (antisens) 5'-TTCCAGGCCAAAGACTTCTC-3'

Gk5 : BDA449 (sens) 5'-CAACACAGAGAGCCACTTTC-3'
BDA450 (antisens) 5'-TGCTGAAATTGAAGCGGCTG-3'

Hprt : AFF73 (sens) 5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'
AFF74 (antisens) 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'

Kcnj10 : BDA435 (sens) 5'-TATCAGAGCAGCCACTTCAC-3'
BDA436 (antisens) 5'-GCAATGTGCTCCATTCTCAC-3'

Kctd17 : BDA443 (sens) 5'-TGGAGGAAGCAGAGTTCTAC-3'
BDA444 (antisens) 5'-TAGTGGATACCATCTGTGTG-3'

Krr1 : BDA437 (sens) 5'-AGAGGCAGGAAGAACGAAAC-3'
BDA438 (antisens) 5'-GCCTCCATCTTGAGCTTAAC-3'

Mash2 : BCQ449 (sens) 5'-TCTCTGTCCTGCGCCTCTAC-3'
BCQ450 (antisens) 5'-CCAAGTGGAAAAGTCAAGCAG-3'

Mest : AHY249 (sens) 5'-GAAATTCAGAAGACGCTGGG-3'
AHN102 (antisens) 5'-CTCCAAAACTCTGGATACG-3'

Pkm2 : BDA439 (sens) 5'-TGGAGATGCTGAAGGAGATG-3'
BDA440 (antisens) 5'-GCAAAGCTTTCTGTGGCTTC-3'

Svil: BDA447 (sens) 5'-AAACCACCCCGGTGACTCAC-3'
BDA448 (antisens) 5'-CCCCACATCTTAGGTCCAG-3'

Taf10 : BDA441 (sens) 5'-CACCTCTAGTGGACTTCTTG-3'
BDA442 (antisens) 5'-AGGGCATCATTGGCAATATC-3'

Références

Références

A

- Aagaard L, Lai ble G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh PB, Reuter G, Jenuwein T.** (1999). Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J.* **18**, 1923-1938.
- Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF.** (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 56-59.
- Abrink M, Ortiz JA, Mark C, Sanchez C, Looman C, Hellman L, Chambon P, Losson R.** (2001). Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1422-1426.
- Ahmad K, Henikoff S.** (2002). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (Suppl 4), 16477-16484.
- Ahn SH, Diaz RL, Grunstein M, Allis CD.** (2006). Histone H2B deacetylation at lysine 11 is required for yeast apoptosis induced by phosphorylation of H2B at serine 10. *Mol. Cell* **24**, 211-220.
- Akhmanova A, Miedema K, Hennig W.** (1996). Identification and characterization of the *Drosophila* histone H4 replacement gene. *FEBS Lett.* **388**, 219-222.
- Akhtar A, Gasser SM.** (2007). The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 507-517.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE.** (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 786-94.
- Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwein T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhata R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y.** (2007). New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* **131**, 633-636.
- Andrulis ED, Neiman AM, Zappulla DC, Sternglanz R.** (1998). Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature* **394**, 592-595.
- Angelov D, Molla A, Perche PY, Hans F, Côté J, Hochbin S, Bouvet P, Dimitrov S.** (2003). The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell* **11**, 1033-1041.
- Antequera F, Bird A.** (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11995-11999.
- Aucott R, Bullwinkel J, Yu Y, Shi W, Billur M, Brown JP, Menzel U, Kioussis D, Wang G, Reiser I, Weimer J, Pandita RK, Sharma GG, Pandita TK, Fundele R, Singh PB.** (2008). H P1-beta is required for development of the cerebral neocortex and neuromuscular junctions. *J. Cell Biol.* **183**, 597-606.
- Ayoub N, Jayasekharan AD, Bernal JA, Venkataraman AR.** (2008). H P1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* **453**, 682-686.

Ayyanathan K, Lechner MS, Bell P, Maul GG, Schultz DC, Yamada Y, Tanaka K, Torigoe K, Rauscher FJ 3rd. (2003). Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.* **17**, 1855-1869.

B

Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. (2001). Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J. Biol. Chem.* **276**, 32282-32287.

Badenhorst P, Voas M, Rebay I, Wu C. *Genes Dev.* (2002). Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev.* **16**, 3186-3198.

Badugu R, Yoo Y, Singh PB, Kellum R. (2005). Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma* **113**, 370-384.

Bakshi R, Prakash T, Dash D, Brahmachari V. (2004). In silico characterization of the INO80 subfamily of SWI2/SNF2 chromatin remodeling proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 197-204.

Ball AR Jr, Yokomori K. (2009). Revisiting the role of heterochromatin protein 1 in DNA repair. *J. Cell Biol.* **185**, 573-575.

Bannister A J, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire R C, Kouzarides T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-124.

Bao Y, Konisky K, Park Y J, Rosu S, Dyer PN, Rangasamy D, Tremethick D J, Laybourn PJ, Luger K. (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J.* **23**, 3314-3324.

Bao Y, Shen X. (2007). INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutat. Res.* **618**, 18-29.

Bártová E, Kozubek S, Jirsová P, Kozubek M, Lukášová E, Skalníková M, Cafourková A, Koutná I, Pásek R. (2001). Higher-order chromatin structure of human granulocytes. *Chromosoma* **110**, 360-370.

Beckstead R, Ortiz JA, Sanchez C, Prokopenko SN, Chambon P, Losson R, Bellen H. (2001). Bonus, a Drosophila homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription. *Mol. Cell* **7**, 753-765.

Belikov S, Astrand C, Holmqvist PH, Wrangé O. (2004). Chromatin-mediated restriction of nuclear factor 1/CTF binding in a repressed and hormone-activated promoter in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3036-3047.

Bellefroid E J, Poncelet D A, Lecocq PJ, Revelant O, Martial JA. (1991). The evolutionarily conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3608-3612.

Belmont AS. (2006). Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 632-638.

Berger S L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-412.

Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire R C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* **294**, 2539-2542.

- Berndsen CE, Denu JM.** (2008). Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 682-689.
- Bernstein BE, Kim M, Lindblad-Toh K, Beckmann S, Bilenky M, Greenberg M, et al.** (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**, 169-181.
- Bernstein E, Hake SB.** (2006). The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 505-517.
- Bestor TH.** (2003). Imprinting errors and developmental asymmetry. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **358**, 1411-1415.
- Bird AP.** (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213.
- Bird AP, Wolffe AP.** (1999). Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**, 451-454.
- Bird A.** (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21.
- Blower MD, Karpen GH.** (2001). The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat. Cell Biol.* **3**, 730-739.
- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Müller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T.** (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* **3**, e157.
- Borrow J, Stanton VP Jr, Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, Civin CI, Disteche C, Dubé I, Frischauf AM, Horsman D, Mitelman F, Volinia S, Watmore AE, Housman DE.** (1996). The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat. Genet.* **14**, 33-41.
- Boulard M, Gautier T, Mbele GO, Gerson V, Hamiche A, Angelov D, Bouvet P, Dimitrov S.** (2006). The N H2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol. Cell Biol.* **26**, 1518-1526.
- Boulikas T.** (1990). Poly(ADP-ribosylated) histones in chromatin replication. *Biol. Chem.* **265**, 14638-14647.
- Bourque G, Leong B, Vega VB, Chen X, Lee YL, Srinivasan KG, Chew JL, Ruan Y, Wei CL, Ng HH, Liu ET.** (2008). Evolution of the mammalian transcription factor binding repertoire via transposable elements. *Genome Res.* **18**, 1752-1762.
- Boyes J, Bird A.** (1991). DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* **64**, 1123-1134.
- Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K.** (2006). Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.* **20**, 1123-1136.
- Brandt WF, Strickland WN, Strickland M, Carlisle L, Woods D, von Holt C.** (1979). A histone programme during the life cycle of the sea urchin. *Eur. J. Biochem.* **94**, 1-10.
- Brickner JH, Walter P.** (2004). Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS Biol.* **2**, e342.

- Briers S, Crawford C, Bickmore WA, Sutherland HG.** (2009). KRAB zinc-finger proteins localise to novel KAP1-containing foci that are adjacent to PML nuclear bodies. *J. Cell Sci.* **122**, 937-946.
- Brown SW.** (1966). Heterochromatin. *Science* **151**, 417-425.
- Brown KE, Guest SS, Smeal ST, Ham K, Merkenschlager M, Fisher AG.** (1997). Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* **91**, 845-854.
- Brown KE, Baxter J, Graf D, Merkenschlager M, Fisher AG.** (1999). Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol. Cell* **3**, 207-217.
- Brown CR, Kennedy CJ, Delmar VA, Forbes DJ, Silver PA.** (2008). Global histone acetylation induces functional genomic reorganization at mammalian nuclear pore complexes. *Genes Dev.* **22**, 627-639.
- Buggy JJ, Sideris ML, Mak P, Lorimer DD, McIntosh B, Clark JM.** (2000). Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem. J.* **350**, 199-205.
- Burke TW, Kadonaga JT.** (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes Dev.* **11**, 3020-3031.
- Butler JE, Kadonaga JT.** (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* **16**, 2583-2592.

C

- Caldas C, Kim MH, MacGregor A, Cain D, Aparicio S, Wiedemann LM.** (1998). Isolation and characterization of a pufferfish MLL (mixed lineage leukemia)-like gene (fMll) reveals evolutionary conservation in vertebrate genes related to Drosophila trithorax. *Oncogene* **16**, 3233-3241.
- Cammas F, Mark M, Dolle P, Dierich A, Chambon P, Losson R.** (2000). Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development* **127**, 2955-2963.
- Cammas F, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Losson R.** (2002). Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J. Cell Sci.* **115**, 3439-3448.
- Cammas F, Herzog M, Le rouge T, Chambon P, Losson R.** (2004). Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev.* **18**, 2147-2160.
- Cammas F, Janoshazi A, Lerouge T, Losson R.** (2007). Dynamic and selective interactions of the transcriptional corepressor TIF1beta with the heterochromatin protein HP1 isoforms during cell differentiation. *Differentiation* **75**, 627-637.
- Camporeale G, Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zemleni J.** (2007). K12-biotinylated histone H4 marks heterochromatin in human lymphoblastoma cells. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 760-768
- Capili AD, Schultz DC, Rauscher III FJ, Borden KL.** (2001). Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *EMBO J.* **20**, 165-177.

- Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Côté J.** (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**, 321-329.
- Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA.** (2004). Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* **117**, 427-439.
- Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A.** (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* **5**, 675-679.
- Chadee DN, Hendzel MJ, Tylicski CP, Allis CD, Bazett-Jones DP, Wright JA, Davie JR.** (1999). Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **274**, 24914-24920.
- Chadwick BP, Willard HF.** (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J. Cell. Biol.* **152**, 375-384.
- Chambeyron S, Bickmore WA.** (2004). Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes Dev.* **18**, 1119-1130.
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK.** (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* **318**, 444-447.
- Chang CW, Chou HY, Lin YS, Huang KH, Chang CJ, Hsu TC, Lee SC.** (2008). Phosphorylation at Ser473 regulates heterochromatin protein 1 binding and corepressor function of TIF1beta/KAP1. *BMC Mol. Biol.* **9**, 61.
- Chang PC, Fitzgerald LD, Van Geelen A, Izumiya Y, Ellison TJ, Wang DH, Ann DK, Luciw PA, Kung HJ.** (2009). Kruppel-associated box domain-associated protein-1 as a latency regulator for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and its modulation by the viral protein kinase. *Cancer Res.* **69**, 5681-5689.
- Chaumeil J, Le Baccon P, Wutz A, Heard E.** (2006). A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes Dev.* **20**, 2223-2237.
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P.** (2000a). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**, 263-271.
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD.** (2000b). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell* **5**, 905-915.
- Cheung WL, Ajiro K, Samejima K, Kloc M, Cheung P, Mizzen CA, Beeser A, Etkin LD, Chernoff J, Earnshaw WC, Allis CD.** (2003). Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell* **113**, 507-517.
- Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T.** (2003). Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* **299**, 721-725.
- Churikov D, Siino J, Svetlova M, Zhang K, Gineitis A, Morton Bradbury E, Zalensky A.** (2004). Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* **84**, 745-756.
- Clarke AS, Lowell JE, Jacobson SJ, Pillus L.** (1999). Esap1 is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2515-2526.

- Clegg NJ, Honda BM, Whitehead IP, Grigliatti TA, Wakimoto B, Brock HW, Lloyd VK, Sinclair D A.** (1998). Suppressors of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affect expression of the heterochromatic gene *light* in the absence of a chromosome rearrangement. *Genome* **41**, 495-503.
- Cobb BS, Morales-Alcelay S, Kleiger G, Brown KE, Fisher AG, Smale ST.** (2000). Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev.* **14**, 2146-2160.
- Cohen CJ, Lock WM, Mager DL.** (2009). Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: A critical assessment. *Gene* (In press).
- Conley AB, Miller WJ, Jordan IK.** (2008). Human cis natural antisense transcripts initiated by transposable elements. *Trends Genet.* **24**, 53-6.
- Cook PR.** (1995). A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *J. Cell Sci.* **108**, 2927-2935.
- Cooper SJ, Trinklein ND, Anton ED, Nguyen L, Myers RM.** (2006). Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome Res.* **16**, 1-10.
- Costanzi C, Pehrson JR.** (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**, 599-601.
- Couteau F, Guerry F, Muller F, Palladino F.** (2002). A heterochromatin protein 1 homologue in *Caenorhabditis elegans* acts in germline and vulval development. *EMBO Rep.* **3**, 235-241.
- Couture JF, Hauk G, Thompson MJ, Blackburn GM, Trievel RC.** (2006). Catalytic roles for carbon-oxygen hydrogen bonding in SET domain lysine methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **281**, 19280-19287.
- Cremer T, Kreth G, Koester H, Fink RH, Heintzmann R, Cremer M, Solovei I, Zink D, Cremer C.** (2000). Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **10**, 179-212.
- Cremer T, Cremer C.** (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 292-301.
- Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S.** (2006). Chromosome territories--a functional nuclear landscape. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **18**, 307-316.
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA.** (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell. Biol.* **145**, 1119-1131.
- Cryderman DE, Grade SK, Li Y, Fanti L, Pimpinelli S, Wallrath LL.** (2005). Role of *Drosophila* HP1 in euchromatic gene expression. *Dev. Dyn.* **232**, 767-774.
- Csank A K, Henikoff S.** (1996). Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature* **381**, 529-531.
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T.** (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**, 545-553.

D

- Dai J, Sultan S, Taylor SS, Higgins JM.** (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 T hr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* **19**, 472-488.
- Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ.** (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **319**, 1097-1113.
- De Lucia F, Ni JQ, Vaillant C, Sun FL.** (2005). HP1 modulates the transcription of cell-cycle regulators in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2852-2858.
- Delaval K, Govin J, Cerqueira F, Rousseaux S, Khochbin S, Feil R.** (2007). Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO J.* **26**, 720-729.
- Dernburg AF, Broman KW, Fung JC, Marshall WF, Philips J, A gard DA, Sedat JW.** (1996). Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell* **85**, 745-759.
- Deuschle U , Meyer WK , Thiesen HJ.** (1995). Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1907-1914.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM.** (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491-496.
- Dillon N, Festenstein R.** (2002). Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.* **18**, 252-258.
- Dimitri P, Corradini N, Rossi F, Verni F.** (2005). The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays* **27**, 29-41.
- Dorigo B, Schalch T, Bystricky K, Richmond TJ.** (2003). Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J. Mol. Biol.* **327**, 85-96.
- Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, Duda S, Schroeder RR, Richmond TJ.** (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* **306**, 1571-1573.
- Dougherty MK, Morrison DK.** (2004). Unlocking the code of 14-3-3. *J. Cell Sci.* **117**, 1875-1884.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Côté V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Côté J.** (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol. Cell* **21**, 51-64.
- Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S.** (2005). Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* **121**, 87-99.

E

- Ebbert R, Birkmann A, Schüller HJ.** (1999). The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Mol. Microbiol.* **32**, 741-751.
- Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC.** (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9923-9927.

- Eissenberg JC , Hartnett T.** (1993). A heat shock-activated cDNA rescues the recessive lethality of mutations in the heterochromatin-associated protein HP1 of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **240**, 333-338.
- Eissenberg JC , Ge Y W, Hartnett T.** (1994). Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J. Biol. Chem.* **269**, 21315-21321.
- Esteller M.** (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 286-298.

F

- Fan JY, Rangasamy D, Luger K, Tremethick DJ.** (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1 α -mediated chromatin fiber folding. *Mol. Cell* **16**, 655-661.
- Fang J, Chen T, Chadwick B, Li E, Zhang Y.** (2004). Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J. Biol. Chem.* **279**, 52812-52815.
- Fanti L, Giovinazzo G, Berloco M, Pimpinelli S.** (1998). The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol. Cell* **2**, 527-538.
- Fanti L, Berloco M, Piacentini L, Pimpinelli S.** (2003). Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: a cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica* **117**, 135-147.
- Fazzari MJ, Gready JM.** (2004). Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 446-455.
- Featherstone M.** (2002). Coactivators in transcription initiation: here are your orders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 149-155.
- Fedorova E, Zink D.** (2008). Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 2174-2184.
- Felsenfeld G, Boyes J, Chung J, Clark D, Studitsky V.** (1996). Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9384-9388.
- Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y.** (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.* **12**, 1052-1058.
- Feschotte C.** (2008). Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 397-405.
- Festenstein R, Pagakis SN, Hiragami K, Lyon D, Verreault A, Sekkali B, Kioussis D.** (2003). Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary mammalian cells. *Science* **299**, 719-721.
- Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA.** (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 169-181.
- Finch JT, Klug A.** (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1897-1901.
- Finlan LE, Sproul D, Thomson I, Boyle S, Kerr E, Perry P, Ylstra B, Chubb JR, Bickmore WA.** (2008). Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet.* **4**, e1000039.

- Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD.** (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116-1122.
- Fitzgerald DJ, Dryden GL, Bronson EC, Williams JS, Anderson JN.** (1994). Conserved patterns of binding in satellite and nucleosome positioning DNA. *J. Biol. Chem.* **269**, 21303-21314.
- Font-Burgada J, Rossell D, Auer H, Azorín F.** (2008). Drosophila HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. *Genes Dev.* **22**, 3007-3023.
- Fournier C, Goto Y, Baldestar E, Delaval K, Hever AM, Esteller M, Feil R.** (2002). Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *EMBO J.* **21**, 6560-6570.
- Francastel C, Schübeler D, Martin DI, Groudine M.** (2000). Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 137-143.
- Franklin SG, Zweidler A.** (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* **266**, 273-275.
- Fraser P, Bickmore W.** (2007). Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* **447**, 413-417.
- Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, Rauscher III FJ.** (1996). KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev.* **10**, 2067-2078.
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T.** (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2305-2312.

G

- Gaillard PH, Martini EM, Kaufman PD, Stillman B, Moustacchi E, Almouzni G.** (1996). Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* **86**, 887-896.
- Galasinski SC, Resing KA, Goodrich JA, Ahn NG.** (2002). Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J. Biol. Chem.* **277**, 19618-19626.
- Galy V, Olivo-Marin JC, Scherthan H, Doye V, Rascalou N, Nehrbass U.** (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* **403**, 108-112.
- Gannon F, O'Hare K, Perrin F, LePennec JP, Benoist C, Cochet CM, Breathnach R, Royal A, Garapin A, Cami B, Chambon P.** (1979). Organisation and sequences at the 5' end of a cloned complete ovalbumin gene. *Nature* **278**, 428-434.
- Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF.** (2007). Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 66-73.
- Gardiner-Garden M, Frommer M.** (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196**, 261-282.
- Gary JD, Clarke S.** (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **61**, 65-131.
- Gebelein B, Urrutia R.** (2001). Sequence-specific transcriptional repression by KS1, a multiple-zinc-finger-Krüppel-associated box protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 928-939.

- Gershenson NI, Ioshikhes IP.** (2005). Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. *Bioinformatics* **21**, 1295-1300.
- Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Zalensky AO.** (2000). Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J. Cell Biol.* **151**, 1591-1598.
- Godde JS, Ura K.** (2009). Dynamic alterations of linker histone variants during development. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 215-224.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E.** (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* **128**, 635-638.
- Goldmark JP, Fazio TG, Estep PW, Church GM, Tsukiyama T.** (2000). The ISW2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell* **103**, 423-433.
- Goll MG, Bestor TH.** (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 481-514.
- Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Löbrich M, Jeggo PA.** (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell* **31**, 167-177.
- Gotta M, Larocche T, Formenton A, Maillet L, Scherthan H, Gasser SM.** (1996). The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **134**, 1349-1363.
- Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lu govskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, Chen J, Rao VR, Brugge JS, Ferguson CG, Poyras B, Myska DG, Cantley LC, Wagner G, Divecha N, Prestwich GD, Yuan J.** (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**, 99-111.
- Grewal SI, Moazed D.** (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* **301**, 798-802.
- Grewal SI, Jia S.** (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 35-46.
- Grüne T, Brzeski J, Eberharder A, Clapier CR, Corona DF, Becker PB, Müller CW.** (2003). Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol. Cell* **12**, 449-460.

H

- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN.** (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 32-42.
- Hake SB, Garcia BA, Duncan EM, Kauer M, Dellaire G, Shabanowitz J, Bazett-Jones DP, Allis CD, Hunt DF.** (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J. Biol. Chem.* **281**, 559-568.
- Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI.** (2002). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* **297**, 2232-2237.
- Hampsey M, Reinberg D.** (1999). RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 132-139.
- Han J, Zhou H, Horazdovsky B, Zhang K, Xu RM, Zhang Z.** (2007). Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science* **315**, 653-655.

- Hans F, Dimitrov S.** (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* **20**, 3021-3027.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO.** (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 789-829.
- Hassan Y I, Zempleni J.** (2006). Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *J. Nutr.* **136**, 1763-1765.
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E.** (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**, 1983-1993.
- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massagué J.** (2006). Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* **125**, 929-941.
- Heard E, Rougeulle C, Arnaud D, Avner P, Allis CD, Spector DL.** (2001). Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell* **107**, 727-738.
- Heard E.** (2004). Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **16**, 247-255.
- Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C.** (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**, 1395-1402.
- Hecht A, Laroche T, Strahl-Bolsinger S, Gasser SM, Grunstein M.** (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**, 583-592.
- Heitz E.** (1928). Das heterochromatin des moose. *Jarrb. Wiss. Bot.* **69**, 762-818.
- Hendrich B, Bird A.** (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6538-6547.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD.** (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**, 348-360.
- Henikoff S.** (2005). Histone modifications: combinatorial complexity or cumulative simplicity?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5308-5309.
- Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A.** (2003). The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 31717-31721.
- Hermann A, Gowher H, Jeltsch A.** (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2571-2587.
- Hiragami K, Festenstein R.** (2005). Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2711-2726.
- Hodawadekar S C, Armourstein R.** (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* **26**, 5528-5540.
- Hogan BL.** (1976). Changes in the behaviour of teratocarcinoma cells cultivated in vitro. *Nature* **263**, 136-137.

- Holaska JM, Wilson KL.** (2007). An e merin "proteome": puri fication of d istinct e merin-containing com plexes f rom H eLa cel ls s uggests m olecular ba sis f or di verse r oles including g ene r egulation, mRNA s plicing, signaling, mechanosensing, and nuclear architecture. *Biochemistry* **46**, 8897-8908.
- Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM.** (1993). Studies of t he DNA binding properties of hi stone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J. Biol. Chem.* **268**, 305-314.
- Howard ML, Davidson EH.** (2004). c is-Regulatory control c ircuits i n development. *Dev. Biol.* **271**, 109-118.
- Howell C Y, Bestor T H, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR.** (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* **2104**, 829-838.
- Howlett SK, Reik W.** (1991). Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* **113**, 119-127.
- Hu G, Kim J, Xu Q, Leng Y, Orkin SH, Elledge SJ.** (2009). A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Genes Dev.* **23**, 837-848.
- Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, Xu RM.** (2006). Recognition of h istone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* **312**, 748-751.
- Huntley S, Baggot DM, Hamilton AT, Tran-Gyamfi M, Yang S, Kim J, Gordon L, Branscomb E, Stubbs L.** (2006). A c omprehensive c atalog of hum an KRAB-associated zinc finger genes: insights into the evolutionary history of a large family of transcriptional repressors. *Genome Res.* **16**, 669-677.
- Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA Jr, Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD.** (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**, 406-411.
- Hwang KK, Eisenberg JC, Worman HJ.** (2001). Transcriptional repression of euchromatic genes by Drosophila heterochromatin protein 1 and histone modifiers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 11423-11427.
- Hyland EM, Cosgrove MS, Molina H, Wang D, Pandey A, Cottee RJ, Boeke JD.** (2005). Insights i nto t he role of hi stone H3 a nd hi stone H4 c ore m odifiable r esidues i n *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10060-10070.

I

- Ignat M, Teletin M, Tisserand J, Khetchoumian K, Dennefeld C, Chambon P, Losson R, Mark M.** (2008). Arterial calcifications and increased expression of vitamin D receptor targets in mice lacking TIF1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 2598-2603.
- Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L.** (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.
- Ivanov AV, Peng H, Yurchenko V, Yap KL, Negorev DG, Schultz DC, Psulkowski E, Fredericks WJ, White DE, Maul GG, Sadofsky MJ, Zhou MM, Rauscher FJ 3rd.** (2007). PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol. Cell* **28**, 823-837.

J

- Jaenisch R, Bird A.** (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33 Suppl**, 245-254.
- Jakobsson J, Cordero MI, Bisaz R, Groner AC, Busskamp V, Bensadoun JC, Cammas F, Losson R, Mansuy IM, Sandi C, Trono D.** (2008). KAP1-mediated epigenetic repression in the forebrain modulates behavioral vulnerability to stress. *Neuron* **60**, 818-831.
- James TC, Elgin SC.** (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3862-3872.
- Jeanmougin F, Wurtz JM, Ledouarin B, Chambon P, Losson R.** (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 151-153.
- Jenuwein T, Allis CD.** (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- Jia S, Yamada T, Grewal SI.** (2004). Heterochromatin regulates cell type-specific long-range chromatin interactions essential for directed recombination. *Cell* **119**, 469-480.
- Jing Z, Liu Y, Dong M, Hu S, Huang S.** (2004). Identification of the DNA binding element of the human ZNF333 protein. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 663-670.
- Jones DO, Cowell IG, Singh PB.** (2000). Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* **22**, 124-137.
- Jones KW.** (1970). Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature* **225**, 912-915.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP.** (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* **19**, 187-191.

K

- Kamakaka RT, Biggins S.** (2005). Histone variants: deviants?. *Genes Dev.* **19**, 295-310.
- Kamitani S, Ohbayashi N, Ikeda O, Togi S, Muromoto R, Sekine Y, Ohta K, Ishiyama H, Matsuda T.** (2008). KAP1 regulates type I interferon/STAT1-mediated IRF-1 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**, 366-370.
- Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K.** (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* **19**, 489-501.
- Keogh MC, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR, Schuldiner M, Chin K, Punna T, Thompson NJ, Boone C, Emili A, Weissman JS, Hughes TR, Strahl BD, Grunstein M, Greenblatt JF, Buratowski S, Rogan NJ.** (2005). Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* **123**, 593-605.
- Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cervino M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Losson R.** (2004). TIF1delta, a novel HPI1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J. Biol. Chem.* **279**, 48329-48341.

- Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C, Metzger D, Chambon P, Losson R.** (2007). Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat. Genet.* **39**, 1500-1506.
- Khochbin S.** (2001). Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**, 1-12.
- Kim SS, Chen YM, O'Leary E, Witzgall R, Vidal M, Bonventre JV.** (1996). A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15299-15304.
- Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E, Winandy S, Viel A, Sawyer A, Ikeda T, Kingston R, Georgopoulos K.** (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* **10**, 345-355.
- Kim SH, McQueen PG, Lichtman MK, Shevach EM, Parada LA, Misteli T.** (2004). Spatial genome organization during T-cell differentiation. *Cytogenet. Genome Res.* **105**, 292-301.
- Kim J, Daniel J, Espejo A, Lake A, Krishna M, Xia L, Zhang Y, Bedford MT.** (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep.* **7**, 397-403.
- Klose RJ, Zhang Y.** (2007). Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 307-318.
- Koczan D, Thiesen HJ.** (2006). Survey of microarray technologies suitable to elucidate transcriptional networks as exemplified by studying KRAB zinc finger gene families. *Proteomics* **6**, 4704-4715.
- Koike N, Maita H, Taira T, Ariga H, Iguchi-Ariga SM.** (2000). Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1(1). *FEBS Lett.* **467**, 17-21.
- Kornberg RD.** (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871.
- Kornberg RD, Thomas JO.** (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* **184**, 865-868.
- Kornberg RD, Lorch Y.** (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294.
- Kourmouli N, Theodoropoulos PA, Dialynas G, Bakou A, Politou AS, Cowell IG, Singh PB, Georgatos SD.** (2000). Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *EMBO J.* **19**, 6558-6568.
- Kouzarides T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Krebs A, Frontini M, Tora L.** (2008). GPAT: retrieval of genomic annotation from large genomic position datasets. *BMC Bioinformatics* **9**, 533.
- Kurshakova MM, Krasnov AN, Kopytova DV, Shidlovskii YV, Nikolenko JV, Nabirochkina EN, Spehner D, Schultz P, Tora L, Georgieva SG.** (2007). SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *EMBO J.* **26**, 4956-4965.

- Kurz A, Lampel S, Nickolenko JE, Bradl J, Benner A, Zirbel RM, Cremer T, Lichter P.** (1996). Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J. Cell Biol.* **135**, 1195-1205.
- Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D.** (2004). Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol. Cell* **14**, 183-193.
- Kwon SH, Workman JL.** (2008). The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1. *Mol. Cells* **26**, 217-227.

L

- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T.** (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116-120.
- Lachner M, Jenuwein T.** (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**, 286-298.
- Lacoste N, Côté J.** (2003). [The epigenetic code of histones]. *Med. Sci. (Paris)* **19**, 955-959.
- Laird PW.** (2005). Cancer epigenetics. *Hum. Mol. Genet.* **14**, R65-76.
- Lan F, Nottke AC, Shi Y.** (2008). Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **20**, 316-325.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Latham JA, Dent SY.** (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1017-1024.
- Le Douarin B, Zechel C, Garnier JM, Lutz Y, Tora L, Pierrat P, Heery D, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R.** (1995). The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* **14**, 2020-2033.
- Le Douarin B, Nielsen AL, Garnier JM, Ichinose H, Jeanmougin F, Losson R, Chambon P.** (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* **15**, 6701-6715.
- Lee DY, Hayes JJ, Purcell D, Wolffe AP.** (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**, 73-84.
- Lee TI, and Young RA.** (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 77-137.
- Lee DY, Teysier C, Strahl BD, Stallcup MR.** (2005). Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr. Rev.* **26**, 147-170.
- Lee YK, Thomas SN, Yang AJ, Ann DK.** (2007). Doxorubicin down-regulates Kruppel-associated box domain-associated protein 1 sumoylation that relieves its transcription repression on p21WAF1/CIP1 in breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 1595-1606.
- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters A H.** (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.* **13**, 1192-1200.
- Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH.** (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**, 865-873.

- Levine M , Tjian R .** (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**, 147-151.
- Levine M, Davidson EH.** (2005). Gene regulatory networks for development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **102**, 4936-4942.
- Li E.** (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 662-673.
- Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ.** (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* **442**, 91-95.
- Li B, Carey M, Workman JL.** (2007a). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-719.
- Li J, Wang Y, Fan X, Mo X, Wang Z, Li Y, Yin Z, Deng Y, Luo N, Zhu C, Liu M, Ma Q, Ocorr K, Yuan W, Wu X.** (2007b). ZNF307, a novel zinc finger gene suppresses p53 and p21 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 895-900.
- Li X, Lee YK, Jeng JC, Yen Y, Schultz DC, Shih HM, Ann DK.** (2007c). Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* **282**, 36177-36189.
- Li Y, Yang D, Bai Y, Mo X, Huang W, Yuan W, Yin Z, Deng Y, Murashko O, Wang Y, Fan X, Zhu C, Ocorr K, Bodmer R, Wu X.** (2008). ZNF418, a novel human KRAB/C2H2 zinc finger protein, suppresses MAPK signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **310**, 141-151.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA.** (2002). Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 480-491.
- Lin CH, Li B, Swanson S, Zhang Y, Florens L, Washburn MP, Abmayr SM, Workman JL.** (2008). Heterochromatin protein 1a stimulates histone H3 lysine 36 demethylation by the *Drosophila* KDM4A demethylase. *Mol. Cell* **32**, 696-706.
- Liu LP, Ni JQ, Shi YD, Oakeley EJ, Sun FL.** (2005). Sex-specific role of *Drosophila melanogaster* HP1 in regulating chromatin structure and gene transcription. *Nat. Genet.* **37**, 1361-1366.
- Liu H, Hu Q, Kaufman A, D'Ercole AJ, Ye P.** (2008). Developmental expression of histone deacetylase 11 in the murine brain. *J. Neurosci. Res.* **86**, 537-543.
- Lo WS, Duggan L, Emre NC, Belotserkovskaya R, Lane WS, Shiekhattar R, Berger SL.** (2001). Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* **293**, 1142-1146.
- Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL.** (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell* **5**, 917-926.
- Lomberk G, WalIrath L, Urrutia R .** (2006). The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol.* **7**, 228.
- Looman C, Abrink M, Mark C, Hellman L.** (2002). KRAB zinc finger proteins: an analysis of the molecular mechanisms governing their increase in numbers and complexity during evolution. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 2118-2130.
- Looman C, Mark C, Abrink M, Hellman L.** (2003). MZF6D, a novel KRAB zinc-finger gene expressed exclusively in meiotic male germ cells. *DNA Cell Biol.* **22**, 489-496.

- Loyola A, Huang JY, Le Roy G, Hu S, Wang YH, Donnelly RJ, Lane WS, Lee SC, Reinberg D.** (2003). Functional analysis of the subunits of the chromatin assembly factor RSF. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6759-6768.
- Loyola A, Tagami H, Bonaldi T, Roche D, Quivy JP, Imhof A, Nakatani Y, Dent SY, Almouzni G.** (2009). The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep.* **10**, 769-775.
- Lu BY, Emtage PC, Duyf BJ, Hilliker AJ, Eisenberg JC.** (2000). Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* **155**, 699-708.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ.** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.

M

- Maas NL, Miller KM, DeFazio LG, Toczyski DP.** (2006). Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol. Cell* **23**, 109-119.
- Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, Clayton AL, Endicott JA, Mahadevan LC.** (2005). Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol. Cell* **20**, 199-211.
- Maillet L, Boscheron C, Gotta M, Marcand S, Gilson E, Gasser SM.** (1996). Evidence for silencing compartments within the yeast nucleus: a role for telomere proximity and Sir protein concentration in silencer-mediated repression. *Genes Dev.* **10**, 1796-1811.
- Maison C, Bailly D, Peters AH, Quivy JP, Roche D, Taddei A, Lachner M, Jenuwein T, Almouzni G.** (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat. Genet.* **30**, 329-334.
- Maison C, Almouzni G.** (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 296-304.
- Malik HS, Henikoff S.** (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 882-891.
- Malik S, Roeder, RG.** (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 256-263.
- Margueron R, Trojer P, Reinberg D.** (2005). The key to development: interpreting the histone code?. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 163-176.
- Marmorstein R.** (2001). Structure of histone acetyltransferases. *J. Mol. Biol.* **311**, 433-444.
- Marsden MP, Laemmli UK.** (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* **17**, 849-858.
- Martens JA, Winston F.** (2002). Evidence that Swi/Snf directly represses transcription in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* **16**, 2231-2236.
- Martin C, Zhang Y.** (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 838-849.
- Masclé XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estéphan P, Aubry M.** (2007). Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the corepressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J. Biol. Chem.* **282**, 10190-10202.

- Mateescu B, Bourachot B, Rachez C, Ogryzko V, Muchardt C.** (2008). Regulation of an inducible promoter by an HP1beta-HP1gamma switch. *EMBO Rep.* **9**, 267-272.
- Mathieu O, Probst AV, Paszkowski J.** (2005). Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis. *EMBO J.* **24**, 2783-2791.
- McBride AE, Silver PA.** (2001). State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* **106**, 5-8.
- Meehan RR, Kao CF, Pennings S.** (2003). HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J.* **22**, 3164-3174.
- Meehan RR, Lewis JD, Bird AP.** (1992). Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5085-5092.
- Mellor J.** (2006). Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet.* **22**, 320-329.
- Meneghini MD, Wu M, Madhani HD.** (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* **112**, 725-736.
- Meroni G, Diez-Roux G.** (2005). TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* **27**, 1147-1157.
- Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F.** (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**, 751-763.
- Métivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G.** (2008). Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**, 45-50.
- Metzger E, Yin N, Wissmann M, Kunowska N, Fischer K, Friedrichs N, Patnaik D, Higgins JM, Potier N, Scheidtmann KH, Buettner R, Schüle R.** (2008). Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nat. Cell Biol.* **10**, 53-60.
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C.** (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-348.
- Moggs JG, Grandi P, Quivy JP, Jónsson ZO, Hübscher U, Becker PB, Almouzni G.** (2000). A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1206-1218.
- Mohrmann L, Verrijzer CP.** (2005). Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1681**, 59-73.
- Moosmann P, Georgiev O, Le Douarin B, Bourquin J-P, Schaffner W.** (1996). Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4859-4867.
- Muchardt C, Guilleme M, Seeler JS, Trouche D, Dejean A, Yaniv M.** (2002). Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep.* **3**, 975-981.
- Mujtaba S, Zeng L, Zhou MM.** (2007). Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**, 5521-5527.
- Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA.** (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197-208.

- Muller HJ.** (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* **22**, 299-334.
- Murphy SK, Jirtle RL.** (2003). Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* **25**, 577-588.
- Murzina N, Verreault A, Laue E, Stillman B.** (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol. Cell* **4**, 529-540.
- Mutskov V, Felsenfeld G.** (2004). Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J.* **23**, 138-149.

N

- Nan X, Meehan RR, Bird A.** (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4886-4892.
- Nathan D, Ingvarsdottir K, S terner D E, By lebyl G R, D okmanovic M , D orsey JA , Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL.** (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev.* **20**, 966-976.
- Nelson CJ, Santos-Rosa H, Kouzarides T.** (2006). Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* **126**, 905-916.
- Ng HH, Xu RM, Zhang Y, Struhl K.** (2002). Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79. *J. Biol. Chem.* **277**, 34655-34657.
- Nielsen AL, Ortiz JA, You Y, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, Losson R.** (1999). Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.* **18**, 6385-6395.
- Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R.** (2001a). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol. Cell* **7**, 729-739.
- Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T.** (2001b). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**, 561-565.
- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D.** (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.* **16**, 479-489.
- Noma K, Cam HP, Maraia RJ, Grewal SI.** (2006). A role for TFIIC transcription factor complex in genome organization. *Cell* **125**, 859-872.
- Nowak SJ, Corces VG.** (2000). Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev.* **14**, 3003-3013.

O

- Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y.** (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**, 1132-1136.

- O'Geen H, Squazzo SL, Iyengar S, Blahnik K, Rinn JL, Chang HY, Green R, Farnham PJ.** (2007). Genome-wide analysis of KAP1 binding suggests autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet.* **3**, e89.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E.** (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257.
- Olins AL, Olins DE.** (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* **183**, 330-332.
- Orlando V, Paro R.** (1993). Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* **75**, 1187-1198.
- Ornaghi P, Ballario P, Lena AM, González A, Filetici P.** (1999). The bromo domain of Gcn5p interacts in vitro with specific residues in the N terminus of histone H4. *J. Mol. Biol.* **287**, 1-7.
- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P.** (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**, 281-300.
- P**
- Pal S, Sif S.** (2007). Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J. Cell Physiol.* **213**, 306-315.
- Panteleeva I, Boutillier S, See V, Spiller DG, Rouaux C, Almouzni G, Bailly D, Maison C, Lai HC, Loeffler JP, Boutillier AL.** (2007). HP1alpha guides neuronal fate by timing E2F-targeted genes silencing during terminal differentiation. *EMBO J.* **26**, 3616-3628.
- Paoloni-Giacobino A.** (2007). Epigenetics in reproductive medicine. *Pediatr. Res.* **61**, 51R-57R.
- Papp B, Müller J.** (2006). Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev.* **20**, 2041-2054.
- Parada L, Misteli T.** (2002). Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Curr. Biol.* **12**, 1692-1697.
- Pardue ML, Gall JG.** (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* **168**, 1356-1358.
- Peña P V, Davrazou F, Shi X, Walter K L, Verkhusha V V, Gozani O, Zhao R, Kutateladze TG.** (2006). Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* **442**, 100-103.
- Peng H, Begg GE, Schultz DC, Friedman JR, Jensen DE, Speicher DW, Rauscher FJ 3rd.** (2000). Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* **295**, 1139-1162.
- Peng H, Zheng L, Lee WH, Rux JJ, Rauscher FJ 3rd.** (2002). A common DNA-binding site for SZF1 and the BRCA1-associated zinc finger protein, ZBRK1. *Cancer Res.* **62**, 3773-3781.
- Peters A H, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T.** (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323-337.

- Peters A H, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan R J, Derijck A A, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T.** (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell* **12**, 1577-1589.
- Pickersgill H, Kalverda B, de Wit E, Talhout W, Fornerod M, van Steensel B.** (2006). Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat. Genet.* **38**, 1005-1014.
- Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos P A, Singh P B, Giannakouros T, Georgatos SD.** (2001). Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep.* **2**, 920-925.
- Pray-Grant M G, Daniell JA, Schieltz D, Yates JR 3rd, Grant P A.** (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and S LIK-dependent acetylation. *Nature* **433**, 434-438.
- Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E.** (2001). The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.* **15**, 1613-1618.
- Q**
- Qiu P.** (2003). Recent advances in computational promoter analysis in understanding the transcriptional regulatory network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 495-501.
- Quivy JP, Roche D, Kirschner D, Tagami H, Nakatani Y, Almouzni G.** (2004). A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *EMBO J.* **23**, 3516-3526.
- Quivy JP, Gérard A, Cook A J, Roche D, 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**, 972-979.
- R**
- Rambaud J, Desroches J, Balsalobre A, Drouin J.** (2009). TIF1beta/KAP-1 is a coactivator of the orphan nuclear receptor NGFI-B/Nur77. *J. Biol. Chem.* **284**, 14147-14156.
- Ramji DP, Foka P.** (2002). CC AAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* **365**, 561-575.
- Rangasamy D, Greaves I, Tremethick DJ.** (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 650-655.
- Ransom DG, Haffter P, Odenthal J, Brownlie A, Vogelsang E, Kelsh RN, Brand M, van Eeden F J, Furutani-Seiki M, Granato M, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Mullins MC, Nusslein-Volhard C.** (1996). Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development* **123**, 311-319.
- Ransom D G, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trade N S, Paffett-Lugassy N, Saganic WJ, Lim CA, Hersey C, Zhou Y, Barut BA, Lin S, Kingsley PD, Palis J, Orkin SH, Zon L I.** (2004). The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol.* **2**, E237.
- Reifnyder C, Lowell J, Clarke A, Pillus L.** (1996). Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat. Genet.* **16**, 109.

- Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A.** (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* **20**, 2140-2151.
- Richards EJ, Elgin S C.** (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**, 489-500.
- Ringrose L, Paro R.** (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* **134**, 223-232.
- Robinson PJ, Rhodes D.** (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 336-343.
- Rodríguez-Navarro S, Fischer T, Luo MJ, Antúnez O, Brettschneider S, Lechner J, Pérez-Ortín JE, Reed R, Hurt E.** (2004). Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* **116**, 75-86.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM.** (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**, 5858-5868.
- Roth SY, Allis CD.** (1992). Chromatin condensation: does histone H1 phosphorylation play a role?. *Trends. Biochem. Sci.* **17**, 93-98.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD.** (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81-120.
- Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Viegas-Pequignot E.** (1998). Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev.* **12**, 2108-2113.
- Ryan R F, Schultz D C, Ayyanathan K, Singh P B, Friedman JR, Fredericks WJ, Rauscher FJ 3rd.** (1999). KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4366-4378.

S

- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR.** (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 437-447.
- Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume D A.** (2007). Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 424-436.
- Sarg B, Helliger W, Talasz H, Koutzamani E, Lindner H H.** (2004). Histone H4 hyperacetylation precludes histone H4 lysine 20 trimethylation. *J. Biol. Chem.* **279**, 53458-53464.
- Sarma K, Reinberg D.** (2005). Histone variants meet their match. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 139-149.
- Sasai N, Defossez P A.** (2009). Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 323-334.
- Sasaki H, Matsui Y.** (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 129-140.

- Schalch T, Duda S, Sargent D F, Richmond TJ.** (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436**, 138-141.
- Schott S, Coustham V, Simonet T, Bedet C, Palladino F.** (2006). Unique and redundant functions of *C. elegans* HP1 proteins in post-embryonic development. *Dev. Biol.* **298**, 176-187.
- Schott S, Ramos F, Coustham V, Palladino F.** (2009). HPL-2/HP1 prevents inappropriate vulval induction in *Caenorhabditis elegans* by acting in both HYP7 and vulval precursor cells. *Genetics* **181**, 797-801.
- Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R, Reuter G.** (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* **21**, 1121-1131.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T.** (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* **18**, 1251-1262.
- Schübeler D, Francastel C, Cimbara DM, Reik A, Martin DI, Groudine M.** (2000). Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev.* **14**, 940-950.
- Schübeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M.** (2004). The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**, 1263-1271.
- Schueler MG, Higgins AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard HF.** (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* **294**, 109-115.
- Schultz DC, Friedman JR, Rauscher III F J.** (2001). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 α subunit of NuRD. *Genes Dev.* **15**, 428-443.
- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher F J.** (2002). SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* **16**, 919-932.
- Schwartz YB, Pirrotta V.** (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **20**, 266-273.
- Seet BT, Dikic I, Zhou MM, Pawson T.** (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 473-483.
- Sexton T, Schober H, Fraser P, Gasser SM.** (2007). Gene regulation through nuclear organization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1049-1055.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M.** (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**, 843-852.
- Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, Wu C.** (2000). A chromatin remodeling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* **406**, 541-544.
- Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan GC, Orkin SH.** (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol. Cell* **32**, 491-502.

- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y.** (2004). Histone de methylation mediated by the nuclear lysine demethylase LSD1. *Cell* **119**, 941-953.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Peña P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Côté J, Chua KF, Gozani O.** (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**, 96-99.
- Shibahara K, Stillman B.** (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* **96**, 575-585.
- Shiio Y, Eisenman RN.** (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 13225-13230.
- Shilatifard A.** (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 243-269.
- Shiloh Y.** (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 155-168.
- Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, Nakanishi M.** (2008). Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* **132**, 221-232.
- Shin JA, Choi ES, Kim HS, Ho JC, Watts FZ, Park SD, Jan g YK.** (2005). SUMO modification is involved in the maintenance of heterochromatin stability in fission yeast. *Mol. Cell* **19**, 817-828.
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL.** (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844-847.
- Sikorski TW, Buratowski S.** (2009). The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **21**, 344-351.
- Sims JK, Houston SI, Magazinnik T, Rice JC.** (2006). A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin. *J. Biol. Chem.* **281**, 12760-12766.
- Smale ST, Kadonaga JT.** (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 449-479.
- Smallwood A, Esteve PO, Pradhan S, Carey M.** (2007). Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev.* **21**, 1169-1178.
- Smothers JF, Henikoff S.** (2000). The HP1 chromoshadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr. Biol.* **10**, 27-30.
- Somech R, Shaklai S, Geller O, Amariglio N, Simon AJ, Rechavi G, Gal-Yam EN.** (2005). The nuclear-envelope protein and transcriptional repressor LAP2beta interacts with HDAC3 at the nuclear periphery, and induces histone H4 deacetylation. *J. Cell Sci.* **118**, 4017-4025.
- Sproul D, Gilbert N, Bickmore WA.** (2005). The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 775-781.
- Sripathy SP, Stevens J, Schultz DC.** (2006). The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8623-8638.

- Stephanou A, Latchman DS.** (2003). STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *Int. J. Exp. Pathol.* **84**, 239-244.
- Sterner DE, Berger SL.** (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **64**, 435-459.
- Stewart MD, Li J, Wong J.** (2005). Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2525-2538.
- Stokes DG, Tartof KD, Perry RP.** (1996). CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 7137-7142.
- Strahl BD, Allis CD.** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Strickland S, Mahdavi V.** (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15**, 393-403.
- Strickland S, Smith KK, Marotti KR.** (1980). Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell* **21**, 347-355.
- Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S.** (2004). DNMT3L stimulates the DNAmethylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J. Biol. Chem.* **279**, 27816-27823.
- Sullivan SA, Landsman D.** (2003). Characterization of sequence variability in nucleosome core histone folds. *Proteins* **52**, 454-465.
- Sun HB, Shen J, Yokota H.** (2000). Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J.* **79**, 184-190.
- Sun ZW, Allis CD.** (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**, 104-108.
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P.** (2007). Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* **128**, 747-762.

T

- Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y.** (2001). Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.* **276**, 25309-25317.
- Taddei A, Van Houwe G, Hediger F, Kalck V, Cubizolles F, Schober H, Gasser SM.** (2006). Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* **441**, 774-778.
- Taddei A.** (2007). Active genes at the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **19**, 305-310.
- Takai D, Jones PA.** (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* **99**, 3740-3745.
- Takai D, Jones PA.** (2003). The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol.* **3**, 235-240.
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ.** (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1025-1040.

- Thiesen H J, Bellefroid E, Revelant O, Martial JA .** (1991). Conserved KRAB protein domain identified upstream from the zinc finger region of Kox 8. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3996.
- Thiru A, Nietlispach D, Mott HR, Okuwaki M, Lyon D, Nielsen PR, Hirshberg M, Verreault A, Murzina NV, Lau e ED.** (2004) Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J.* **23**, 489-499.
- Thomas M C, Chiang CM.** (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 105-178.
- Tian C, Xing G, Xie P, Lu K, Nie J, Wang J, Li L, Gao M, Zhang L, He F.** (2009). KRAB-type zinc-finger protein Apak specifically regulates p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 580-591.
- Tomilin NV.** (2008). Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. *Bioessays* **30**, 338-348.
- Trojer P, Reinberg D.** (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature?. *Mol. Cell* **28**, 1-13.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Roachers CH, Tempst P, Zhang Y.** (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811-816.
- Tsukiyama T.** (2002). The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 422-429.
- Tsuruma R, Ohbayashi N, Kamitani S, Ikeda O, Sato N, Muromoto R, Sekine Y, Oritani K, Matsuda T.** (2008). Physical and functional interactions between STAT3 and KAP1. *Oncogene* **27**, 3054-3059.
- Turner BM.** (1993). Decoding the nucleosome. *Cell* **75**, 5-8.
- Turner BM.** (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**, 836-845.
- Turner B M.** (2005). Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 110-112.
- Tyler JK, Kadonaga JT.** (1999). The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell* **99**, 443-446.

U

- Underhill C, Qutob MS, Yee SP, Torchia J.** (2000). A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 40463-40470.
- Urrutia R.** (2003). KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol.* **4**, 231.
- Urtle RT, Côté J.** (2003). The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **274**, 203-236.

V

- Vakoc CR, Mandat SA, Olenschok BA, Blobel GA.** (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell* **19**, 381-391.
- Vassallo MF, Tanese N.** (2002). Isoform-specific interaction of HP1 with human TAFII130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5919-5924.

- Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH M, Mattei M G, Ganser A, Chambon P, Losson R, de Thé H.** (1999). TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* **18**, 1209-1217.
- Verschure PJ, van Der Kraan I, Manders EM, van Driel R.** (1999). Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J. Cell Biol.* **147**, 13-24.
- Vissel B, Choo KH.** (1989). Mouse major (gamma) satellite DNA is highly conserved and organized into extremely long tandem arrays: implications for recombination between nonhomologous chromosomes. *Genomics* **5**, 407-414.
- Vissing H, Meyer WK, Aagaard L, Tommerup N, Thiesen H J.** (1995). Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins. *FEBS Lett.* **369**, 153-157.
- Völkel P, Angrand PO.** (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* **89**, 1-20.
- Volpi E V, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S, Campbell R D, Goldsworthy M, Powis SH, Ragoussis J, Trowsdale J, Sheer D.** (2000). Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J. Cell Sci.* **113**, 1565-1576.
- Vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine MJ, Garnier JM, Vivat V, Le Douarin B, Gronemeyer H, Chambon P, Losson R.** (1996). Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J.* **15**, 110-124.
- ## W
- Wade PA, Pruss D, Wolffe AP.** (1997). Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 128-132.
- Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP.** (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodeling and histone deacetylation. *Nat. Genet.* **23**, 62-66.
- Wallrath LL.** (1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 147-153.
- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH.** (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.* **20**, 116-117.
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee Y H, Perlman JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA.** (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* **306**, 279-283.
- Wang C, Ivanov A, Chen L, Fredericks WJ, Seto E, Rauscher FJ 3rd, Chen J.** (2005). MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *EMBO J.* **24**, 3279-3290.
- Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y.** (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol. Cell* **22**, 383-394.
- Wang C, Rauscher FJ 3rd, Cress WD, Chen J.** (2007). Regulation of E2F1 function by the nuclear co-repressor KAP-1. *J. Biol. Chem.* **282**, 29902-29909.

- Wang F, Li X, Xie X, Zhao L, Chen W.** (2008). UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion. *FEBS Lett.* **582**, 1919-1927.
- Wang X, Elling AA, Li X, Li N, Peng Z, He G, Sun H, Qi Y, Liu XS, Deng XW.** (2009). Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *Plant Cell* **21**, 1053-1069.
- Watt F, Molloy PL.** (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* **2**, 1136-1143.
- Weber P, Cammas F, Gerard C, Metzger D, Chambon P, Losson R, Mark M.** (2002). Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1beta is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Development* **129**, 2329-2337.
- Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD.** (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**, 99-109.
- Weiler KS, Wakimoto BT.** (1995). Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 577-605.
- White DE, Negorev D, Peng H, Ivanov AV, Maul GG, Rauscher FJ 3rd.** (2006). KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions. *Cancer Res.* **66**, 11594-11599.
- Williams RR, Azuara V, Perry P, Sauer S, Dvorkina M, Jørgensen H, Roix J, McQueen P, Misteli T, Merkenschlager M, Fisher A G.** (2006). Neural induction promotes large-scale chromatin reorganization of the *Mash1* locus. *J. Cell Sci.* **119**, 132-140.
- Witt O, Albig W, Doenecke D.** (1996). Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp. Cell Res.* **229**, 301-306.
- Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I.** (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets?. *Cancer Lett.* **277**, 8-21.
- Wiznerowicz M, Jakobsson J, Szulc J, Liao S, Quazzola A, Beermann F, Aebischer P, Trono D.** (2007). The Kruppel-associated box repressor domain can trigger de novo promoter methylation during mouse early embryogenesis. *J. Biol. Chem.* **282**, 34535-34541.
- Wolf D, Goff SP.** (2007). TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* **131**, 46-57.
- Wolf D, Cammas F, Losson R, Goff SP.** (2008). Primer binding site-dependent restriction of murine leukemia virus requires HP1 binding by TRIM28. *J. Virol.* **82**, 4675-4679.
- Wolf D, Goff SP.** (2009). Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature* **458**, 1201-1204.
- Wolffe AP, Pruss D.** (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* **84**, 817-819.
- Woodage T, Basrai MA, Baxevanis AD, Hieter P, Collins FS.** (1997). Characterization of the CHD family of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11472-11477.
- Woodcock CL.** (2006). Chromatin architecture. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 213-220.
- Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, Balhoff JP, Pizer M, Rockman MV, Romano LA.** (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 1377-1419.

- Wu C T, Morris JR.** (2001). Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* **293**, 1103-1105.
- Wunsch AM, Reinhardt K, Lough J.** (1991). Normal transitions in synthesis of replacement histones H2A.Z and H3.3 during differentiation of dystrophic myotube cells. A brief note. *Mech. Ageing. Dev.* **59**, 299-305.
- Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL, Roeder RG, Brivanlou AH, Allis CD.** (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**, 859-872.

X

- Xue Y, Wong J, Moreno GT, Young MK, Cote J, Wang W.** (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell* **2**, 851-861.

Y

- Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J.** (2007). Sirtuin functions in health and disease. *Mol. Endocrinol.* **21**, 1745-1755.
- Yang XJ, Seto E.** (2003). Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 143-153.
- Yang XJ.** (2004). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res.* **32**, 959-976.

Z

- Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, Bradbury EM.** (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* **277**, 43474-43480.
- Zeng L, Zhou N.** (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* **513**, 124-128.
- Zeng L, Yap KL, Ivanov AV, Wang X, Mujtaba S, Plotnikova O, Rauscher FJ 3rd, Zhou MM.** (2008). Structural insights into human KAP1 PHD finger-bromodomain and its role in gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 626-633.
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D.** (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* **13**, 1924-1935.
- Zhang Y, Reinberg D.** (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**, 2343-2360.
- Zhang K, Williams KE, Huang L, Yau P, Siino JS, Bradbury EM, Jones PR, Minch MJ, Burlingame AL.** (2002). Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* **1**, 500-508.
- Zhang X, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, Goodrich J, Jacobsen SE.** (2007). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol.* **5**, e129.

-
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eickhout J, Johnson DS, Bernstein BE, Nussbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS.** (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* **9**, R137.
- Zhao T, Heyduk T, Eisenberg J C.** (2001). Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 9512-9518.
- Zheng L, Pan H, Li S, Fl esken-Nikitin A, Chen PL, Boyer T G, Lee W H.** (2000). Sequence-specific transcriptional corepressor function for BRCA1 through a novel zinc finger protein, ZBRK1. *Mol. Cell* **6**, 757-768.
- Zhou W, Zhu P, Wang J, Pascual G, Ohgi KA, Lozach J, Glass CK, Rosenfeld M G.** (2008). Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol. Cell* **29**, 69-80.
- Zhu B, Zheng Y, Pham AD, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D.** (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol. Cell* **20**, 601-611.
- Zink D, Amaral MD, Englmann A, Lang S, Clarke LA, Rudolph C, Alt F, Luther K, Braz C, Sadoni N, Rosenecker J, Schindelhauer D.** (2004). Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J. Cell. Biol.* **166**, 815-825.
- Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J, Shiloh Y.** (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat. Cell Biol.* **8**, 870-876.
- Zlatanova J, van Holde K.** (1996). The linker histones and chromatin structure: new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **52**, 217-259.

Résumé

Initialement identifié en tant que corépresseur des facteurs de transcription à domaine « KRAB », TIF1 β (*Transcriptional Intermediary Factor 1 β*) a par la suite été montré interagir avec les protéines HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) et diverses machineries de remodelage de la chromatine. Grâce à l'établissement d'une lignée de cellules F9 exprimant une protéine TIF1 β incapable d'interagir avec les protéines HP1 (*TIF1 β ^{HP1box/-}*), il a été établi au laboratoire que cette interaction est essentielle pour la progression de la différenciation des cellules F9. Mon travail de thèse a consisté à exploiter les propriétés de cette lignée cellulaire en vue d'identifier et de caractériser les gènes directement régulés par les complexes de répression TIF1 β -HP1. En combinant une analyse transcriptomique comparative entre des cellules F9 *TIF1 β ^{+/-}* et des cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}* avec des expériences de ChIP, nous avons identifié le gène *MEST* (*Mesoderm Specific Transcript*) comme étant un gène cible direct de TIF1 β . Nous avons démontré que TIF1 β , grâce à son interaction avec les protéines HP1, est essentiel à l'établissement et à la maintenance d'une structure de type hétérochromatine dans la région promotrice de *MEST*, caractérisée par une triméthylation de H3K9 et de H4K20, une hyperméthylation de l'ADN et un enrichissement en protéines HP1. Cette structure de type hétérochromatine nécessite l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1, puisqu'elle est complètement désorganisée dans les cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}*. Dans ces cellules *TIF1 β ^{HP1box/-}*, le promoteur *MEST* est en effet hypométhylé et caractérisé par une triméthylation de H3K27, associée à une réactivation de l'expression de ce gène. Des expériences de DNA-FISH ont démontré de plus que *MEST* adopte une localisation sub-nucléaire préférentielle à proximité de l'hétérochromatine grâce à l'interaction entre TIF1 β et les protéines HP1.

Dans le but d'identifier des gènes directement régulés par TIF1 β à une plus grande échelle, nous avons réalisé une expérience de ChIP-seq dans des cellules F9 au cours de la différenciation cellulaire. Cette étude a mis en évidence un nombre considérable de régions du génome enrichies en TIF1 β et permis d'établir que les cibles directes de TIF1 β sont majoritairement des gènes impliqués dans l'expression des gènes, la mort cellulaire, la croissance et la prolifération cellulaire ainsi que dans le cancer; cette analyse suggère aussi que TIF1 β pourrait jouer un rôle au niveau des séquences répétées de type LTR et SINE.

Ces recherches ont permis d'établir que TIF1 β est un régulateur majeur de la physiologie cellulaire et d'apporter un éclairage nouveau sur le rôle de TIF1 β et plus généralement de la dynamique de la chromatine dans la régulation de l'expression des gènes ainsi que sur les mécanismes de répression exercés par les complexes TIF1 β /HP1.