

THESE

Présentée par
Caroline Kizilyaprak

Pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de l'Université de Strasbourg
Discipline : Science de la vie
Spécialité : **Biologie et génomique structurale**

Etudes fonctionnelles et structurales de la chromatine dans les noyaux des cellules photoréceptrices de souris sauvages et de souris modèles pour la maladie SCA7

Soutenue publiquement le 30 juin 2010

Directeur de thèse : Patrick Schultz, Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg
Rapporteur externe : Bruno Humbel, Maître d'enseignement et de recherche, Lausanne
Thierry Léveillard, Directeur de Recherche, Paris
Rapporteur interne : Anne Catherine Schmit, Professeur, Strasbourg
Membre invité : Danièle Spehner, Ingénieur de Recherche INSERM, Strasbourg
Didier Devys, Maître de Conférence - Praticien Hospitalier, Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je remercie les membres de mon jury, Madame Anne-Catherine Schmit, Monsieur Thierry Lévillard et Monsieur Bruno Humbel d'avoir accepté de lire et de critiquer mon manuscrit de thèse.

Je remercie Didier Devys pour le projet qu'il m'a permis de réaliser, pour son soutien et sa bonne humeur.

Je tiens à exprimer ma gratitude et toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Patrick Schultz, qui m'a offert la chance de réaliser mon doctorat dans son laboratoire.

Je te remercie Patrick pour tout ce que tu as fait pour moi, pour tes idées et nos discussions scientifiques que j'adore.

Je remercie infiniment mon « manager » Danièle Spohner de m'avoir choisie et de m'avoir encadrée pendant presque 4 ans. Mille mercis Danièle pour ton professionnalisme, la qualité de ton enseignement, pour ta gentillesse et pour cette magnifique amitié qui est née.

Je remercie vivement Robert Drillien pour son soutien de tous les instants. Merci Robert pour le vif intérêt que tu portes à mon projet, pour ton émulation scientifique, pour tes cours intensifs d'anglais et surtout pour ton sourire qui réchauffe le cœur.

Merci à toute l'équipe de microscopie électronique, Christine, Corinne et Gabor mais aussi Véro sans oublier Karine pour les parties de franchises rigolades.

Enfin je remercie Laszlo Tora et toute son équipe pour les « labmeetings » du lundi matin durant lesquels j'ai énormément appris.

Rien de tout cela n'aurait vu le jour sans le soutien inconditionnel de mes parents auxquels je serai éternellement reconnaissante de m'avoir faite telle que je suis.

Les derniers mots sont pour mon chéri et les gens que j'aime qui se reconnaîtront.

... merci.

SOMMAIRE

TABLE DES FIGURES	9
TABLE DES TABLEAUX	11
ABRÉVIATIONS & ACRONYMES.....	13
INTRODUCTION.....	17
I. Transcription et chromatine	17
1) Généralités sur la transcription :	17
a) Les acteurs :	19
b) Les différentes étapes de la transcription :	21
2) La chromatine :	24
a) Le nucléosome :	24
- Les histones de la particule cœur :	26
- Les histones internucléosomales :	26
b) Les différents niveaux de compaction de la chromatine :	28
- La fibre de 10 nm :	28
- La fibre de 30 nm :	28
c) Les notions d'euchromatine et d'hétérochromatine :	31
II. Les histones et la régulation de la transcription :	34
1) Les modifications post-traductionnelles des histones :	34
a) L'acétylation :	36
b) La méthylation :	39
c) L'ubiquitylation :	43
3) L'histone H1 :	48
III. L'Ataxie Spinocérébelleuse de type 7 : SCA7	51
1) Généralités sur les maladies à expansion polyglutamine :	51
a) Quelques caractéristiques communes des maladies polyQ:	52
b) Quelques caractéristiques de la maladie SCA7 :	55

2)	Le complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyl transferase) :.....	59
a)	La structure tridimensionnelle des complexes γ SAGA et hSAGA :.....	61
b)	Les activités catalytiques du complexe SAGA :.....	62
-	L'activité HAT de la sous-unité GCN5 :.....	62
-	L'activité de déubiquitinylation des histones :	64
c)	L'influence de l'ATXN7 polyQ au niveau du complexe SAGA :	68
IV.	La rétine et les photorécepteurs :.....	70
1)	La rétine:.....	70
a)	Organisation générale :.....	71
b)	La cascade de phototransduction :.....	73
c)	Le développement de la rétine :.....	73
2)	Le photorécepteur de type bâtonnet :.....	75
a)	Le développement des bâtonnets :	75
-	Des cellules progénitrices aux bâtonnets immatures :.....	75
-	La différenciation terminale des bâtonnets :	78
b)	La structure nucléaire des bâtonnets :	78
3)	Présentation du modèle murin pour l'étude la maladie SCA7 :.....	81
	OBJECTIFS.....	89
	MATERIELS ET METHODES.....	93
I.	Le matériel biologique :	93
1)	La lignée murine :	93
2)	Le génotypage :.....	93
a)	Préparation de l'ADN génomique :.....	93
b)	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :.....	93
II.	Les techniques de microscopie électronique :	95
1)	Préparation des échantillons pour la microscopie électronique:	95
a)	La biopsie des rétines :.....	95
b)	Optimisation de la congélation haute pression des rétines:	96
c)	Cryo-substitution et enrobage en résine :	100
2)	Ultramicrotomie à température ambiante:	102

3) La tomographie électronique cellulaire :.....	103
4) La méthode stéréologique :.....	105
III. Les techniques d'immunocytochimie :	106
1) Préparation des échantillons :.....	106
2) Cryo-ultramicrotomie :.....	106
3) Immunomarquages :	107
4) Optimisation de l'immuno-détection des protéines nucléaires :.....	110
5) Quantification des particules d'or :.....	113
IV. Les techniques de biochimie :.....	113
1) Extraction acide des histones de rétine:	113
2) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et Western Blot :.....	114
3) Analyse de protéine par spectrométrie de masse :	115
V. Analyse bioinformatique :.....	116
RESULTATS	119
I. Première partie :	119
Etude <i>in vivo</i> de l'organisation structurale de la chromatine des photorécepteurs de souris corrélée aux modifications des histones et à l'activité transcriptionnelle.	119
II. Deuxième partie :.....	153
Etude <i>in vivo</i> du remodelage de la chromatine dans les noyaux des photorécepteurs de souris modèles pour la maladie SCA7.....	153
1) Effets de l'ATXN7 polyQ sur l'organisation nucléaire des bâtonnets :.....	157
2) Organisation du territoire d'hétérochromatine dans les noyaux de bâtonnets SCA7 :	159
a) Le cœur d'hétérochromatine constitutive est conservé dans les noyaux de bâtonnets SCA7 :.....	161
b) L'hétérochromatine facultative s'associe à l'enveloppe nucléaire dans les noyaux de bâtonnets SCA7 :	161
3) Etude de l'activité HAT du complexe SAGA dans les noyaux de bâtonnets SCA7 :	162
4) Etude du phénotype nucléaire des bâtonnets de rétines SCA7 :.....	163
DISCUSSION.....	169

I.	L'interface entre le territoire d'euchromatine et d'hétérochromatine :	169
1)	De la fibre de chromatine de 10nm à la transcription des gènes:	169
2)	Les histones modifiées et l'organisation des gènes :	171
3)	De l'euchromatine « active » à l'hétérochromatine « compétente » :.....	173
II.	Organisation structurale de l'hétérochromatine dans les noyaux de bâtonnets normaux :.....	174
1)	Deux états de la chromatine condensée :.....	174
2)	L'histone H1 et les fibres de chromatine de 30nm:	175
III.	Les noyaux de bâtonnet de rétine de souris modèles pour la maladie génétique SCA7 :	177
1)	L'ATXN7 polyQ et le complexe SAGA :.....	177
2)	L'histone H1 et la décondensation de la chromatine :.....	179
IV.	Du noyau aux molécules :	180
1)	CEMOVIS des rétines de souris :.....	181
2)	En route vers le TOVIS (Tomography of vitreous sections) :.....	184
	ANNEXE	187
	BIBLIOGRAPHIE	195

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Structure cristallographique de l'ARN polymérase II.	18
Figure 2 : Les trois catégories de facteurs de transcription.	20
Figure 3: Représentation schématique des différents niveaux de compaction de l'ADN.	23
Figure 4: Structure cristallographique du nucléosome à une résolution de 1.9 Å en vue latérale (1) ou en vue frontale (2).	25
Figure 5 : Organisation structurale des histones de la particule cœur.	27
Figure 6: Modèles d'organisation de la fibre de 30 nm.	30
Figure 7: Morphologie d'un noyau de cellule de mammifère.	32
Figure 8 : Les principales modifications post-traductionnelles des histones de mammifères.	35
Figure 9: Réaction d'acétylation et de déacétylation des lysines.	37
Figure 10 : Réaction de méthylation et de déméthylation des lysines.	40
Figure 11 : Réactions d'ubiquitylation et de déubiquitylation d'une protéine substrat.	44
Figure 12 : Représentation schématique des différentes protéines à expansion polyglutamine.	50
Figure 13: Neuropathologie d'un patient SCA7.	56
Figure 14: Structure tridimensionnelle des complexes γ SAGA et hSAGA.	60
Figure 15: Organisation de la rétine de souris.	72
Figure 16: Cascade de phototransduction chez les vertébrés.	74
Figure 17: Développement ordonné des différents types cellulaires dans la rétine de souris.	74
Figure 18 : Développement des photorécepteurs de types bâtonnets.	76
Figure 19 : Organisation nucléaire du noyau de bâtonnet en microscopie électronique.	80
Figure 20: Immuno-détection de l'ataxine 7.	82
Figure 21: Altérations progressives des photorécepteurs de type bâtonnets dans les rétines de souris modèles pour la maladie SCA7.	84
Figure 22: Désorganisation de la structure de la chromatine dans les noyaux de bâtonnets SCA7.	84
Figure 23 : Biopsie des rétines.	94
Figure 24 : Observation aux microscopes optique et électronique de rétines cryo-fixées à haute pression, préalablement traitées avec différentes solutions de cryoprotectants.	98
Figure 25 : Courant moyen mesuré en fonction du temps au niveau de deux neurones de la rétine (A et B) en présence de différentes solutions de cryoprotectants.	101
Figure 26 : Principe de la tomographie.	104

Figure 27 : Les différentes étapes de la tomographie électronique cellulaire.....	104
Figure 28 : Immuno-détection des histones modifiées dans les noyaux de bâtonnets.....	111
Figure 29 : Immuno-détection de l'histone H4 acétylée.....	112
Figure 30 : Ultrastructure of the rod photoreceptor nuclei.....	127
Figure 31: Electron tomography of rod photoreceptor nuclei.....	129
Figure 32 : Immuno labelling of core histone H3.	132
Figure 33 : Immunolabelling of transcriptionally inactive histone marks.	134
Figure 34 : Immunolabelling of acetylated histone marks.....	136
Figure 35 : Immunolabelling of lysine 4 monomethylated histone H3.	137
Figure 36 : Immunolabelling of RNA polymerase II.....	139
Figure 37 : Radial distribution of the labelling densities within rod nuclei.....	141
Figure 38: Ultrastructure des noyaux de photorécepteurs de rétines de souris normales et SCA7...	156
Figure 39 : Immunomarquage des histones tri-méthylées associées à la transcription inactive dans les noyaux de bâtonnets normaux et SCA7.	158
Figure 40 : Distribution des densités de marquage des histones tri-méthylées associées à la transcription inactive dans les différents compartiments d'hétérochromatine des noyaux de bâtonnets normaux et SCA7.....	160
Figure 41 : Acétylation de l'histone H3 dans les rétines de souris normales et SCA7.	164
Figure 42 : Séparation des protéines extraites des rétines de souris normales et SCA7 âgées de 28 semaines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante.	166
Figure 43 : Modélisation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine	170
Figure 44 : Optimisation du porte objet AFM pour le CEMOVIS.....	182
Figure 45 : Résultats préliminaires de CEMOVIS de rétine de souris normale.	183

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les principales activités catalytiques du complexe hSAGA.....	68
Tableau 2: Les différentes solutions de cryoprotectants testées sur la rétine.....	96
Tableau 3 : Représentation schématique des différentes étapes de cryo-substitution des échantillons	100
Tableau 4 : Liste des anticorps primaires.....	108
Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires.....	108
Tableau 6 : Liste des gènes dérégulés dans les rétines de souris SCA7.....	187

ABRÉVIATIONS & ACRONYMES

A :

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
ADCA de type II : Autosomal dominant cerebellar ataxia
Ada : adaptator
ATXN7L3 : Ataxin-7 like 3
ATXN7 : Ataxine 7
ATXN7 polyQ : ataxine 7 mutée portant l'expansion polyglutamine
ACSF : Artificial cerebrospinal fluid
AFM : Atomic Force Microscope

B :

bHLH : basic helix-loop-helix
BSA : Bovine serum albumin
BSA-cTM : BSA acétylée

C :

CTD : domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II
CRX : Cone-rod-homeobox
CNTF : Ciliary neurotrophic factor
Chx10 : ceh-10 homeodomain containing homolog
CCD : Charge-coupled device
ChIP : Chromatin immuno-precipitation
CEMOVIS : Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections

D :

dSAGA : drosophila SAGA
DUBm : module de déubiquitylation des histones
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
dChip : DNA-Chip analyser
DRPLA : Atrophie dentato-rubro-pallido-lusienne

E :

ERG : électrorétinogramme
EDTA : Acide éthylène diamine tetra acétique
EC : Euchromatine

F :

FACT : Facilitates chromatin transcription
FISH : Fluorescent in situ hybridization

G :

GTF : General transcription factor
GCN5 : General control nonderepressible 5
GMPc : Guanosine 3'-5' monophosphate cyclique
GTP : Guanosine triphosphate
GMP : Guanosine monophosphate
GABA : Acide gamma amino butyrique
GCRMA : Guanine cytosine robust multi-array analysis
Gbp : Giga base-pairs

H :

HAT : Histones-acétyltransférase
HDAC : Histones-déacétylase
HDM : Histones déméthylases
H2Aub : Histone H2A mono-ubiquitylée
H2Bub : Histone H2B mono-ubiquitylée
HMT : Histones méthyle-transférase
HD : Huntington disease
HES1 : Hairy and enhancer of split 1
HC : Hétérochromatine
hSAGA : human SAGA
HP1 : Heterochromatin Protein type 1

I :

IS : Inner segments
INL : Inner nuclear layer

IPL : Inner plexiform layer
IGL : Immuno-gold labelling

L :

LIF : Leukemia inhibitory factor
Lys : Lysine

M :

MBT : Malignant brain tumor

N :

Nrl : Neural retina leucine zipper
NR2E3 : Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3
NE: Enveloppe nucléaire
NE-HC : Hétérochromatine associée à l'enveloppe nucléaire.
NEF : Negative elongation factor

O :

OS : Outer segments
ONL : Outer nuclear layer
OPL : Outer plexiform layer

P :

PIC : Complexe de pré-initiation
PolyQ : Polyglutamine
PCAF : P300/CBP associated factor complex
Pax6 : Paired box gene 6
PCR : Polymerase chain reaction
PAG : Protein A gold
PBS : Phosphate buffer saline
PHD : Plant homeodomain

R :

Rax : Retinal homeobox protein
R7E : Rod sca7 expanded
RNA pol II : ARN polymerase II

S :

SAM : S-adénosine-méthionine
SAGA : Spt-Ada-Gcn5-Acetylase coactivator complex
SCA7 : Ataxie Spinocérébelleuse de type 7
SCA1: Ataxie Spinocérébelleuse de type 1
Spt : Suppressor of ty element
SUMO : Small ubiquitin- like modifier
STAGA : Spt3-TAF9-GCN5L acetylase
SIRT : Simultaneous iterative reconstruction technique
SDS : sodium dodécyl sulfate
SBMA : Amyotrophie spinobulbaire
STAT : Signal transducers and activators of transcription

T :

TAF : TBP-associated factor
TBP : Tata-binding protein
TFTC : TBP-free TAF containing complex
TEMED: tétraméthyléthylènediamine
TOVIS : Tomography of vitreous section

U :

US : Ultra-small
USP22 : Ubiquitin-specific-peptidase 22
Ubp5: Ubiquitin-specific-processing protease 5
Ubp8 : Ubiquitin-specific-processing protease 8

W :

WD40 : Tryptophane-aspartic-acid-repeat-every 40 residues
WDR5 : WD40 Repeat type 5

Y :

ySAGA : yeast SAGA

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Transcription et chromatine

Les noyaux des cellules eucaryotes d'un organisme vivant renferment l'ensemble de l'information génétique nécessaire au développement, à la différenciation et à la multiplication des cellules pour former les différents organes et tissus. Cette spécialisation dépend de la régulation spatio-temporelle très ordonnée de l'expression des gènes. L'initiation de la transcription est une étape majeure dans la régulation de l'expression des gènes qui repose sur l'accessibilité de l'information génétique et fait intervenir la machinerie de transcription de base, les facteurs de transcription séquences spécifiques et les cofacteurs (Sikorski and Buratowski, 2009).

1) Généralités sur la transcription :

La transcription des gènes par l'ARN polymérase II dans les cellules eucaryotes est divisée en trois grandes étapes. Ces étapes sont distinctes mais dépendantes les unes des autres. La première étape est *l'initiation* pendant laquelle les premières liaisons ribonucléiques sont synthétisées. La deuxième étape est *l'élongation*, elle assure l'allongement de la chaîne d'ARN. L'ARN polymérase II parcourt le gène et synthétise un ARN simple brin complémentaire à l'ADN matriciel. L'ARN néo-synthétisé est rapidement protégé de la dégradation par l'ajout au niveau de son extrémité 3' d'une molécule de guanosine qui, plus tard, sera méthylée. Cette réaction de « coiffage » de l'ARN est la première étape de la maturation de l'ARN pré-messager. Enfin, *la terminaison* est la dernière étape de la transcription. Elle provoque la libération de l'ARN pré-messager et le départ de la machinerie de transcription (Buratowski, 1994).

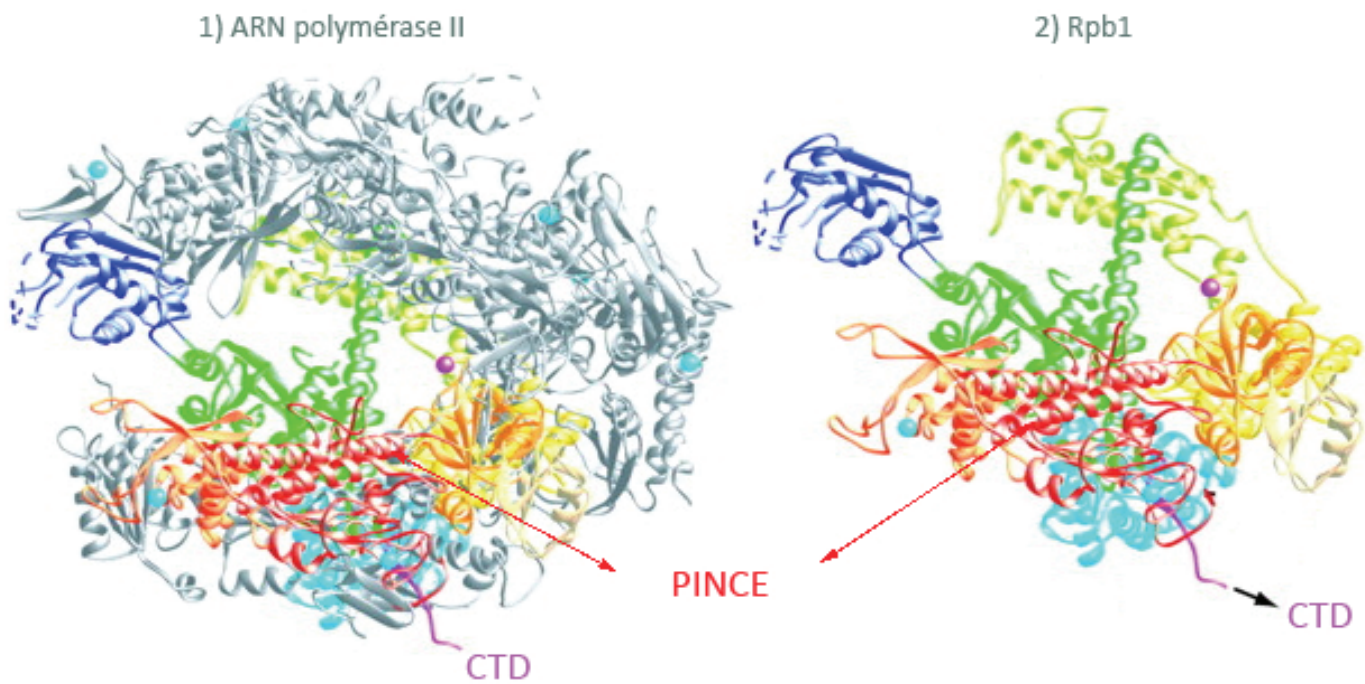


Figure 1: Structure cristallographique de l'ARN polymérase II.

1) Enzyme libre avec une résolution de 2.8 Å montrant la localisation de la grande sous-unité Rpb1 à l'intérieur de l'enzyme.

2) La sous-unité Rpb1 seule avec notamment la pince en rouge et l'extrémité carboxy-terminale en mauve (CTD) (Cramer et al., 2001).

a) Les acteurs :

L'ARN polymérase II constitue la sous-unité catalytique des complexes de transcription responsable de la synthèse de l'ARN. De par son rôle primordial au sein de la cellule, la composition et la structure de l'ARN polymérase II sont assez bien conservées entre les espèces (Young, 1991). L'ARN polymérase II est un complexe multi-protéique d'environ 0.5 MDa composé chez les eucaryotes de 12 sous-unités. Ces sous-unités sont nommées de Rpb1 (RNA Polymérase B1) pour la plus grande sous-unité (220kDa) à Rpb12 (RNA Polymérase B12) pour la plus petite (12kDa). La détermination de la structure cristallographique de l'ARN polymérase II libre (**figure 1**) (Cramer et al., 2001) et en élongation (Gnatt et al., 2001) a permis de mieux comprendre le mécanisme de la transcription. Les structures de l'ARN polymérase II libres ou en association avec le duplex ADN-ARN diffèrent principalement au niveau de la position d'une structure mobile : la pince ou « clamp », formée d'une partie des sous-unités Rpb1 et Rpb2. La pince peut effectuer une rotation de 30° pour fermer un sillon et retenir la matrice d'ADN et le transcrit au sein du complexe transcriptionnel afin d'assurer une élongation efficace. Une caractéristique importante de l'ARN polymérase II, est la répétition de l'héptapeptide Y-S-P-T-S-P-S qui constitue le domaine C-terminal ou CTD (Carboxy Terminal Domain) de la plus grande sous-unité. Ce motif, répété 52 fois chez les mammifères, présente plusieurs cibles de phosphorylation, la tyrosine (Y), la thréonine (T), et les trois sérines (S). Ce domaine peut être hautement phosphorylé par des kinases spécifiques et l'ARN polymérase II non phosphorylée est transcriptionnellement inactive alors que l'ARN polymérase II phosphorylée est associée à la transcription active (Palancade and Bensaude, 2003). Suivant son degré de phosphorylation, le domaine CTD pourra recruter de nombreux facteurs tels que les facteurs d'élongation et de terminaison de la transcription mais aussi les facteurs de maturation de l'ARN jouant ainsi un rôle important dans le bon déroulement de la transcription (Meinhart et al., 2005).

Dans les cellules eucaryotes, l'ARN polymérase II seule n'est pas capable de reconnaître le promoteur du gène puis de démarrer la synthèse d'ARN messagers. La présence de facteurs généraux de transcription (GTF : *General Transcription Factor*) est nécessaire pour initier la transcription. Les facteurs de transcription généraux (TFIIA, TFIIB,

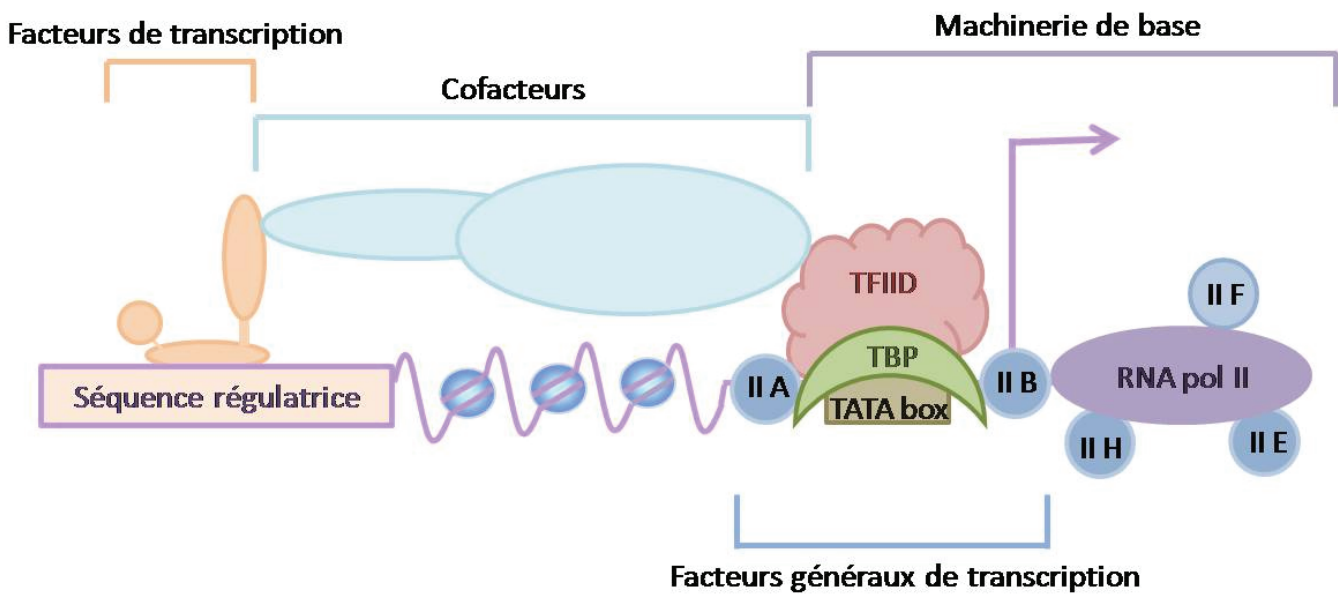


Figure 2 : Les trois catégories de facteurs de transcription.

Les facteurs généraux de transcription, les facteurs séquences spécifiques et les cofacteurs interviennent dans la formation du PIC (Pre-initiation complex) et participent à l'initiation de la transcription (TBP : *Tata Binding Protein*) (TFII : *Transcription Factor II*).

TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH) vont s'associer à la région promotrice d'un gène destiné à être transcrit par l'ARN polymérase II pour former le complexe de pré-initiation (PIC : *PreInitiation Complex*) (**figure 2**). Le PIC, consiste en un important complexe multi-protéique composé de 44 protéines distinctes avec une masse totale d'environ 2.2 MDa (Martinez, 2002). Par l'intermédiaire du PIC, l'ARN polymérase II peut se lier au promoteur du gène à transcrire.

En réponse à des stimuli internes ou externes, des facteurs de transcription séquences spécifiques vont venir se lier à des séquences d'ADN régulatrices. Il existe plusieurs familles de facteurs de transcription séquences spécifiques (en fonction de leur domaine de liaison à l'ADN). Ces facteurs sont capables d'activer ou de réprimer la transcription des gènes en reconnaissant différentes séquences d'ADN régulatrices. Ces séquences localisées au niveau de la région promotrice des gènes, peuvent également se situer à des distances variables du site d'initiation de la transcription comme c'est le cas pour les séquences « enhancers » et « silencers » (Felsenfeld et al., 1996; Levine and Davidson, 2005).

Les facteurs de transcription séquences spécifiques vont réguler la transcription de leurs gènes par l'intermédiaire de cofacteurs. Les cofacteurs, qui font le lien entre les facteurs de transcription séquences spécifiques et les facteurs généraux de transcription, sont pour la plupart des complexes multi-protéiques capable d'activer ou de réprimer la transcription selon qu'ils soient co-répresseurs ou co-activateurs transcriptionnels. Certains peuvent agir directement sur la machinerie basale de transcription en stimulant ou en inhibant la formation du PIC (Myers and Kornberg, 2000). D'autres agissent sur la modification et le remodelage de la structure de la chromatine (Kornberg and Lorch, 1999). Parmi ces cofacteurs, on peut citer le complexe SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-Acetylase coactivator complex*) qui est un co-activateur de transcription sur lequel je reviendrai ultérieurement (voir III.2).

b) Les différentes étapes de la transcription :

Une fois le PIC assemblé au niveau du promoteur, l'initiation peut commencer. Un facteur de transcription présent dans le PIC possède une activité hélicase qui va permettre à la double hélice d'ADN de s'ouvrir de part et d'autre du site d'initiation de transcription (en position -9 et +2) formant ainsi la bulle transcriptionnelle (Holstege et al., 1996). Les ribonucléotides libres vont pouvoir s'apparier au brin matrice, et former la première liaison

phosphodiester aboutissant à la formation d'un oligoribonucléotide. Le PIC est alors stabilisé mais l'ARN polymérase peut s'arrêter à tout moment, relâcher l'ARN en formation, reculer au site d'initiation de transcription puis reprendre un nouveau cycle. La bulle de transcription reste instable jusqu'à l'addition du 4^{ème} nucléotide (Holstege et al., 1997). Le complexe de transcription subit alors un changement de conformation qui le stabilise dans sa forme ouverte. La bulle de transcription s'agrandit et s'étend au fur et à mesure que la synthèse de l'ARN progresse. Entre les positions +9 et +11, le complexe subit un nouveau changement de conformation important, l'ADN se referme entre les positions -9 et +2. Le complexe ne peut plus ré-initier la transcription. Cette étape de transition entre l'étape d'initiation à l'étape d'élongation de la transcription est nommée « échappée du promoteur » (promoter escape) (Holstege et al., 1997). L'initiation de la transcription s'achève par la libération des facteurs d'initiation favorisée par la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II essentiellement au niveau de la sérine 5 (Palancade and Bensaude, 2003). Certains facteurs de transcription peuvent être maintenus sur le promoteur par un activateur transcriptionnel et ainsi former une plateforme pour la ré-initiation d'un second complexe de transcription (Yudkovsky et al., 2000).

L'élongation de la transcription débute lors du recrutement des facteurs d'élongation. Leur rôle est d'augmenter la vitesse d'élongation de l'enzyme (Svejstrup, 2007). Au cours de la progression de la transcription, la bulle transcriptionnelle s'étend en aval d'une paire de base de plus que la position du dernier ribonucléotide ajouté. L'ARN polymérase II peut à certaine position marquer une pause dans l'élongation. Cette pause se traduit par un recul de l'enzyme de 2 à 4 nucléotides et l'ARN est clivé (Uptain et al., 1997). Certains facteurs agissent directement sur l'enzyme pour supprimer ces arrêts transitoires (Shilatifard et al., 2003). L'enzyme peut aussi trop reculer, l'extrémité 3' de l'ARN est alors mal positionnée par rapport au site actif et l'ARN polymérase II est incapable de continuer la synthèse (Komissarova and Kashlev, 1997). Un mécanisme de clivage des dernières bases synthétisées assure le réalignement de l'extrémité 3' de l'ARN avec le centre catalytique de l'enzyme. L'ARN polymérase II peut alors reprendre l'élongation (Rudd et al., 1994). La phosphorylation de la sérine 2 du CTD de l'ARN polymérase II par des facteurs d'élongation favorise l'allongement des transcrits (Palancade and Bensaude, 2003). En effet la phosphorylation de l'enzyme provoque la dissociation de facteurs dit « négatifs » réprimant

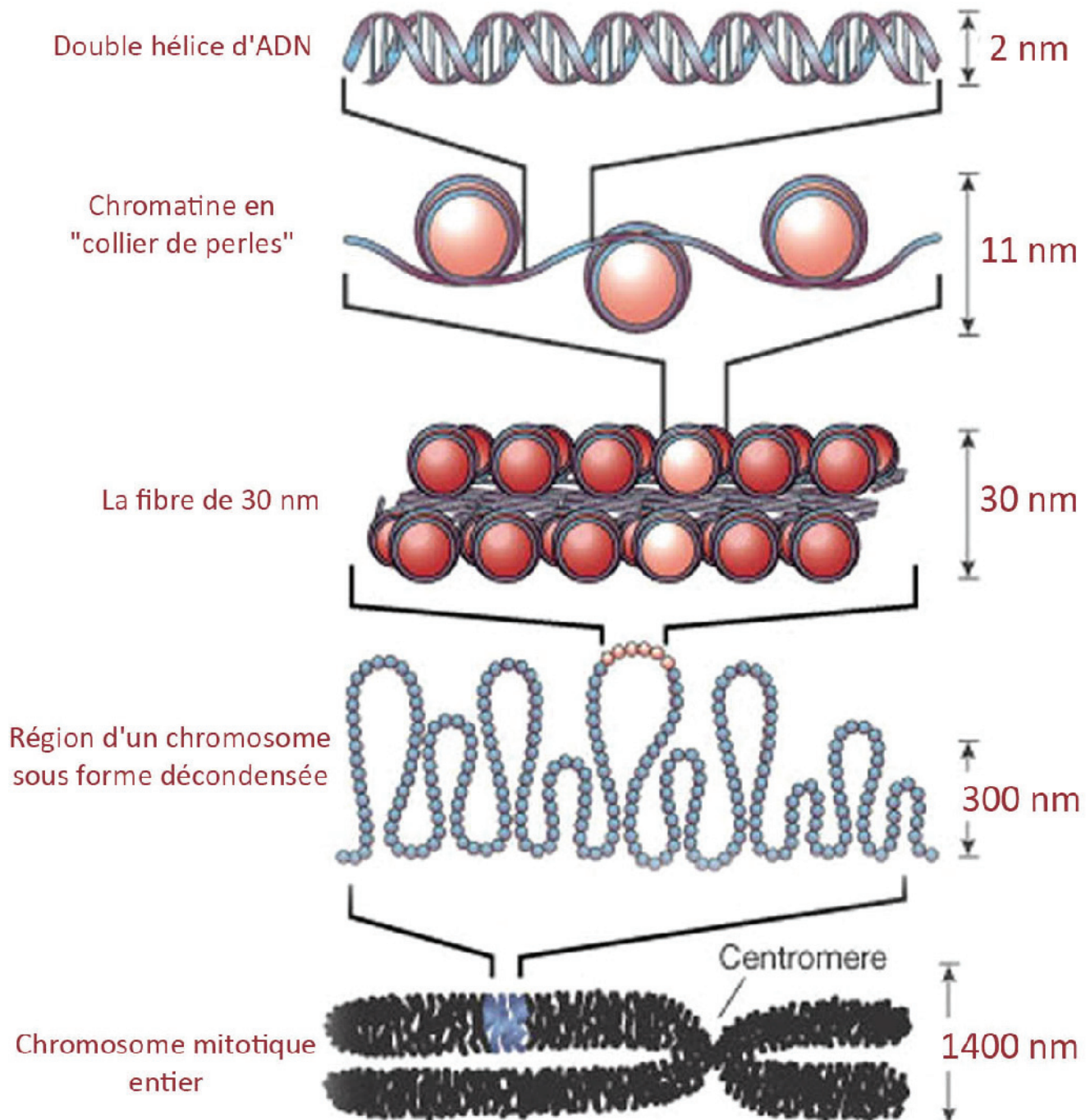


Figure 3: Représentation schématique des différents niveaux de compaction de l'ADN.

Les différents niveaux de compaction de l'ADN sont représentés de la forme la moins condensée qui est l'ADN libre (en haut) à la forme la plus condensée qui est le chromosome mitotique (en bas) d'après (Felsenfeld and Groudine, 2003).

l'élongation (*negative elongation factor*). En absence de phosphorylation ces facteurs se lient à l'enzyme pour s'opposer à sa progression (Yamaguchi et al., 2002).

La phosphorylation du CTD joue aussi un rôle important dans le couplage fonctionnel entre la synthèse et la maturation des ARNs en recrutant notamment des facteurs de polyadénylation (Proudfoot et al., 2002).

La terminaison de la transcription implique la libération du transcrit et la dissociation du complexe transcriptionnel de la matrice ADN. La polyadénylation du transcrit néo-synthétisé joue un rôle important dans sa libération (Richard and Manley, 2009). Les phosphatases du CTD de l'ARN polymérase II sont alors nécessaires pour recycler l'enzyme et former une forme hypo-phosphorylée compétente pour l'initiation (Brookes and Pombo, 2009).

2) La chromatine :

Dans le noyau des cellules eucaryotes, 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). Le génome eucaryote est constitué de 3 milliards de paire de bases ce qui correspond à une longueur d'environ 2 mètres. Un repliement très ordonné est indispensable pour empaqueter l'ADN à l'intérieur du compartiment nucléaire restreint de la cellule. L'organisation dynamique de la chromatine assure la compaction de l'information génétique avec différents niveaux de condensation (**figure 3**). Cette organisation interfère sur l'accessibilité des séquences régulatrices et la structure de la chromatine joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes.

a) Le nucléosome :

Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine. 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., 1997b) et plus récemment à une résolution de 1,9 Å (Davey et al., 2002) (**figure 4**). Le nucléosome est formé d'une particule cœur centrale qui se présente sous la forme d'un disque et d'une séquence d'ADN internucléosomale ou « DNA linker » qui relie les particules cœur entre elles. La particule cœur est composée d'un octamère d'histone autour duquel s'enroulent 146 paires de bases d'ADN en une superhélice gauche soit 1,65 tours

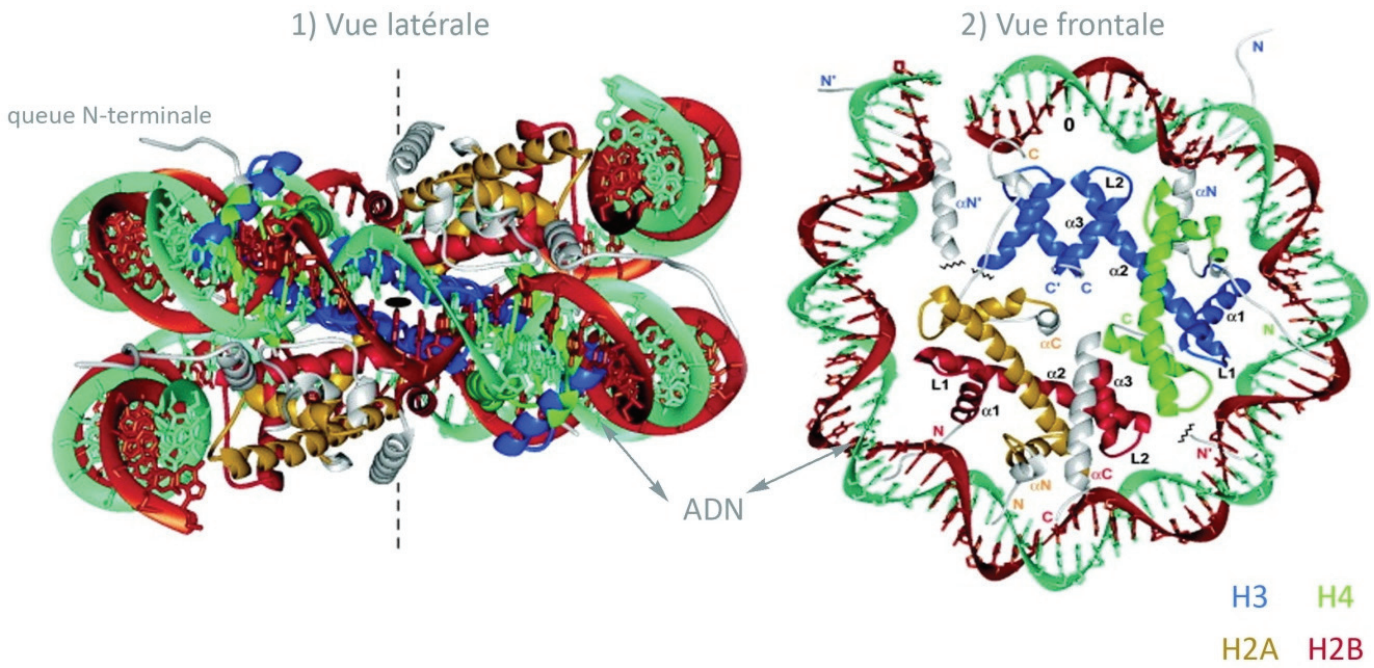


Figure 4: Structure cristallographique du nucléosome à une résolution de 1.9 Å en vue latérale (1) ou en vue frontale (2).

Les histones H3 (bleu), H4 (vert), H2A (jaune) et H2B (rouge) forment la particule cœur composée d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule la double hélice d'ADN (rouge et vert). Les extrémités N-terminales des histones (N) dépassent du cylindre formé par l'octamère d'histones (Felsenfeld and Groudine, 2003).

autour du cœur protéique. L'octamère d'histones comporte un tétramère central, constitué de deux hétérodimères H3-H4, flanqué de part et d'autre d'un hétérodimère H2A-H2B. De nombreuses interactions de type électrostatique et hydrogène confèrent aux nucléosomes une grande stabilité.

- Les histones de la particule cœur :

Les histones de la particule cœur (histones H3, H4, H2A et H2B) sont des petites protéines basiques d'environ 15kDa, très conservées en longueur et en séquence au cours de l'évolution (Malik and Henikoff, 2003; Sullivan and Landsman, 2003). Ces protéines sont formées d'un domaine « histone fold » structuré en trois hélices α reliées entre elles par des boucles flexibles. De part et d'autre du domaine on trouve les extrémités N et C terminales qui sont non structurées (**figure 5**).

L'extrémité N-terminale des histones constitue une « queue » flexible d'une trentaine d'acides aminés qui se projette en dehors de la surface cylindrique du cœur du nucléosome. Les extrémités N-terminales sont les régions les plus conservées car elles remplissent deux fonctions fondamentales. Tout d'abord, elles favorisent les interactions entre les nucléosomes et permettent ainsi la condensation de la chromatine en fibres compactes. D'autre part, elles sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles qui participent à l'assemblage de la chromatine et jouent un rôle important dans la régulation de l'accessibilité de l'information génétique.

- Les histones internucléosomales :

Les histones internucléosomales ou « histones linker » sont des protéines peu conservées entre les espèces. Elles présentent des spécificités d'expression au cours du développement et de la différenciation cellulaires (Godde and Ura, 2009; Khochbin, 2001). L'exemple majeur d'histone de liaison est l'histone H1. L'histone H1 est constituée d'un domaine globulaire central flanqué de part et d'autre d'une courte région N-terminale et d'une longue région C-terminale basique peu structurée (Khochbin, 2001). L'histone H1 est en contact avec l'ADN au niveau de son point d'entrée et de sortie du nucléosome (Woodcock, 2006). Des observations de mononucléosomes par microscopie électronique ont permis de mettre en évidence que les répulsions électrostatiques qui écartent les extrémités d'ADN de part et d'autre du mononucléosome sont neutralisées en présence d'histone H1.

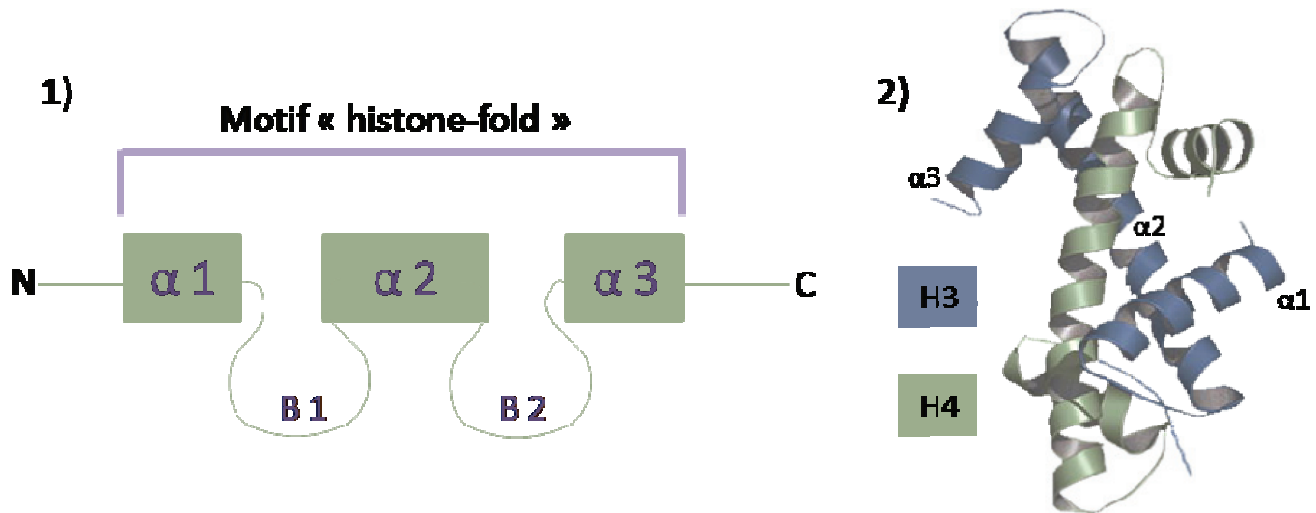


Figure 5 : Organisation structurale des histones de la particule cœur.

1) Les trois hélices (α) du domaine « histone-fold » sont reliées entre-elles par deux boucles (B1 et B2).

2) Interaction caractéristique des domaines « histone-fold » des histones H3 et H4 (d'après (Marino-Ramirez et al., 2005)).

En effet, l'addition d'histone internucléosomale permet d'assembler les deux ADN duplex pour former une structure en forme de tige d'environ 30 nm de long (Hamiche et al., 1996). L'histone H1 stabilise le nucléosome qui est alors moins mobile, joue un rôle dans l'espacement nucléosomal et peut réduire l'activité transcriptionnelle de la chromatine en favorisant sa compaction (voir II.2) (Robinson and Rhodes, 2006).

b) Les différents niveaux de compaction de la chromatine :

- La fibre de 10 nm :

Les premières observations de la chromatine isolée en microscopie électronique ont révélé une organisation régulière et répétée en forme de « collier de perles », communément appelée « fibre de 10nm » (Oudet et al., 1975). Ce premier niveau d'organisation correspond aux nucléosomes régulièrement espacés par des segments d'ADN nu (Kornberg, 1974). La chromatine n'existe sous cette forme qu'en basse force ionique ou en absence de l'histone H1. En présence de concentrations physiologiques en sels, les nucléosomes se replient en structure secondaire plus complexe.

- La fibre de 30 nm :

L'observation en microscopie électronique de fines sections de chromosomes métaphasiques de cellules HeLa montre la présence d'une fibre chromatinienne plus condensée de 30 nm (Marsden and Laemmli, 1979). De plus, des expériences de diffraction aux rayons X (SAXS : Small Angle X-ray Scattering) réalisées sur des noyaux intacts de cellules ont révélé un profil de diffusion présentant un signal important à 30 nm (Langmore and Paulson, 1983). Cependant, l'existence de ces fibres reste encore très controversée *in vivo* et l'observation de ces fibres par microscopie électronique n'est pas reproductible. En effet, les expériences de cryo-microscopie électronique réalisées par le groupe du Professeur Dubochet, n'ont pas permis de mettre en évidence des structures périodiques incluant les fibres de 30 nm *in situ* dans les chromosomes des cellules de mammifères (Eltsov et al., 2008). Ces données supportent l'absence de fibre de chromatine de 30 nm à l'intérieur des chromosomes en métaphase.

La formation des fibres de 30 nm reposerait sur des associations internucléosomiques entre nucléosomes voisins présents en conditions diluées (identique aux systèmes *in vitro*), où les interactions entre les fibres de nucléosomes ainsi que les interactions entre fragments distants de la même fibre de nucléosome sont négligeables. A l'inverse, pour des concentrations élevées en nucléosomes, similaires aux conditions *in vivo*, les interactions entre fibres de nucléosomes voisines deviennent dominantes et les nucléosomes sont forcés d'interagir les uns avec les autres. *In vivo*, ces interactions interfèreraient avec la formation et le maintien des fibres de 30 nm, formant ainsi une « mer de nucléosomes » (Maeshima et al., 2010). Différentes expériences ont permis de mettre en évidence l'existence de telles interactions. Des résultats obtenus *in vitro* ont montré que les interactions entre les queues des histones H3 et H4 augmentent significativement pour des concentrations en Mg^{2+} supérieures à 2 mM. Ces études ont aussi prouvé que l'association entre-elles de fibres nucléosomales individuelles, inhibe la formation de la fibre de chromatine de 30 nm (Zhou et al., 2007). De plus, des expériences de simulation par la méthode de Monte-Carlo, suggèrent que les associations latérales de régions distantes d'une fibre de nucléosome ainsi que l'inter-digitation des fibres de nucléosomes entre-elles dépendent de la géométrie du nucléosome et de la longueur de la fibre de chromatine (Stehr et al., 2008).

In vitro, la structure de cette fibre n'est pas encore finement déterminée et deux principaux modèles sont proposés (Tremethick, 2007) (**figure 6**). Le premier modèle de type hélice à départ simple ou solénoïde dans lequel deux nucléosomes consécutifs seraient à côté l'un de l'autre et une rangée de nucléosomes se replie de façon à être adjacente à une autre rangée (Finch and Klug, 1976). Le deuxième modèle sous forme d'hélice à départ double, suggère que les nucléosomes consécutifs se feraient face de sorte que la fibre adopterait une structure hélicoïdale en zigzag (Schalch et al., 2005). Des travaux réalisés par le groupe de Daniela Rhodes suggèrent que les différences structurales de compaction de la fibre de chromatine sous forme d'une hélice à départ simple (solénoïde) ou à départ double (zigzag), sont définies par la longueur de l'ADN internucléosomale (Routh et al., 2008). De plus, des expériences récentes mettent en évidence que les hélices à départ simple (solénoïde) et à départ double (zigzag) peuvent être présentes simultanément au sein d'une fibre de chromatine de 30nm de diamètre. Cette fibre hétéromorphique se forme dans certaines conditions, notamment en présence de cations bivalents et d'histones internucléosomales (Grigoryev et al., 2009).

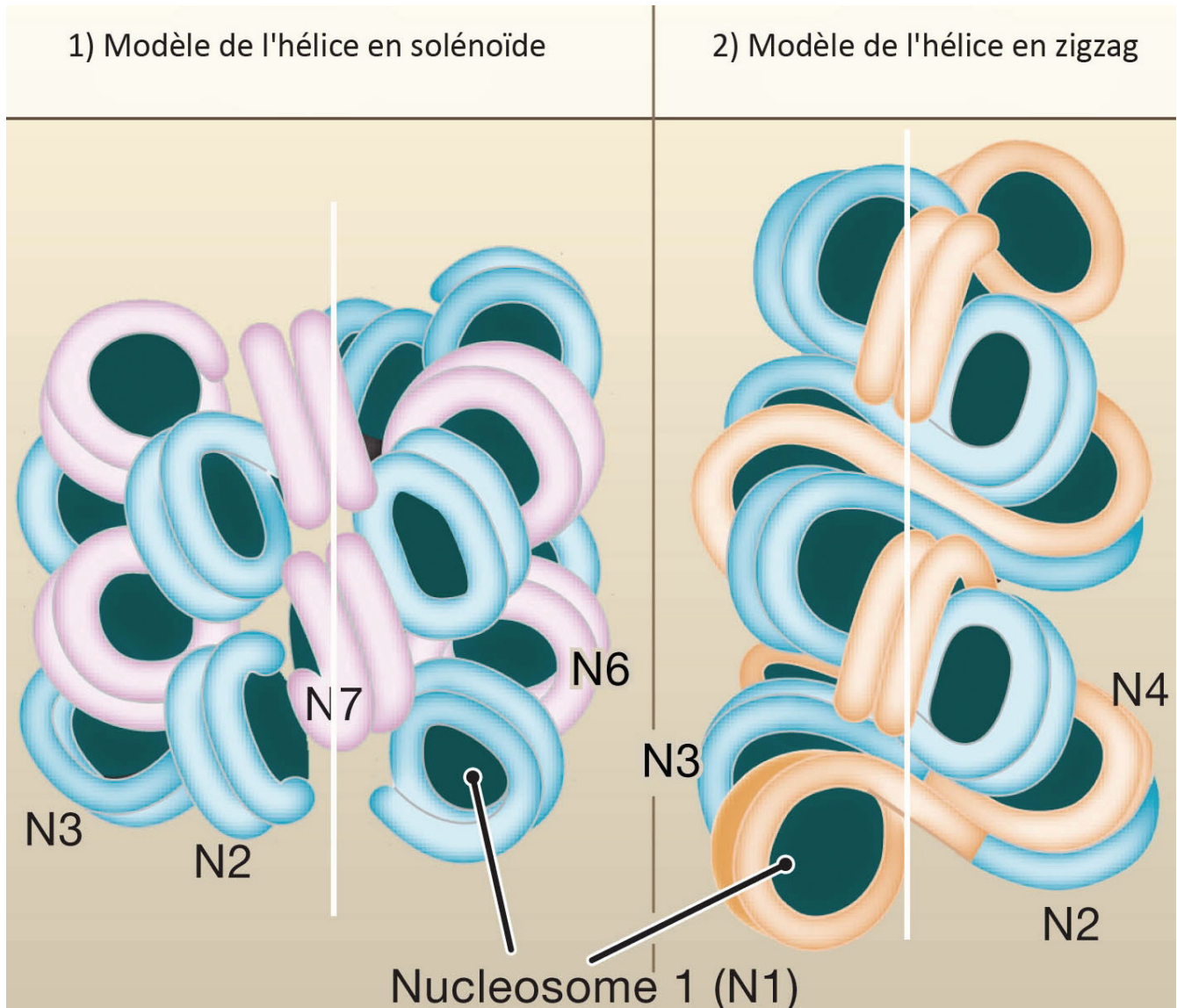


Figure 6: Modèles d'organisation de la fibre de 30 nm.

Les 7 premiers nucléosomes (N1 à N7) sont indiqués pour les deux modèles et l'axe de la fibre est matérialisé en blanc (Tremethick, 2007).

1) Modèle de l'hélice à départ simple en solénoïde proposé par Finch et Klug (Finch and Klug, 1976). L'hélice a un diamètre de 33 nm pour une hauteur de 33 nm et à chaque nouveau tour autour de l'axe la couleur de l'ADN alterne entre le bleu et le rose.

2) Modèle de l'hélice à double départ en zigzag proposé par Schalch et ses collègues (Schalch et al., 2005). L'hélice a un diamètre de 28,4 nm et une hauteur d'environ 47 nm et à chaque nouveau tour autour de l'axe la couleur de l'ADN alterne entre le bleu et l'orange.

A l'heure actuelle, l'existence et les détails structuraux des fibres de chromatine de 30 nm de diamètre sont assez controversés. Néanmoins, pendant longtemps il a été admis que la fibre de nucléosome pourrait former une fibre de chromatine de 30 nm avant d'adopter des niveaux de compaction encore bien supérieur. La super-hélice de 30 nm pourrait se replier en une fibre de 100 à 300 nm de diamètre constituée de boucles ou « chromomères » de plusieurs centaines de kpb (Belmont, 2006; Cook, 1995). La compaction extrême de ces boucles de 300 nm donnera ensuite naissance aux chromosomes mitotiques.

c) Les notions d'euchromatine et d'hétérochromatine :

Dans le noyau des cellules eucaryotes en interphase, une fois l'ADN contrasté à l'aide de métaux lourds, la chromatine se présente sous 2 formes en microscopie électronique. Une chromatine faiblement contrastée nommée euchromatine et une chromatine fortement contrastée nommée hétérochromatine (**figure 7**). C'est en 1928, que cette observation fut décrite pour la première fois par le botaniste germanique Emil Heitz. Il identifia l'hétérochromatine par son fort marquage au carmin acétique tout au long du cycle cellulaire (Heitz, 1928a). L'hétérochromatine est alors décrite comme la partie du génome qui est fortement condensée, au contraire l'euchromatine constitue la forme décondensée de la chromatine.

Cette première description structurale est ensuite corrélée à une description fonctionnelle et biochimique de la chromatine. La chromatine est alors séparée en euchromatine et hétérochromatine sur la base de son accessibilité aux nucléases, de ces modifications d'histones et de l'activité transcriptionnelle associée (Schneider and Grosschedl, 2007). D'une façon générale, l'euchromatine qui est moins condensée, est accessible aux nucléases et riche en gènes transcrits. L'euchromatine est caractérisée par une hyperacétylation des résidus lysines des histones H3 et H4. L'hétérochromatine à l'inverse est plus compacte donc résistante aux nucléases, elle est associée à des régions pauvres en gènes qui sont par ailleurs peu exprimés. L'hétérochromatine est caractérisée par une hypoacétylation des histones et une hyperméthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 et de la lysine 20 de l'histone H4 (Kouzarides, 2007).

Il existe deux types d'hétérochromatine en fonction des séquences qui leurs sont associées. Une hétérochromatine constitutive qui représente environ 10 % du génome et qui est constituée de séquences d'ADN répétées. Ces séquences incluent les éléments d'ADN

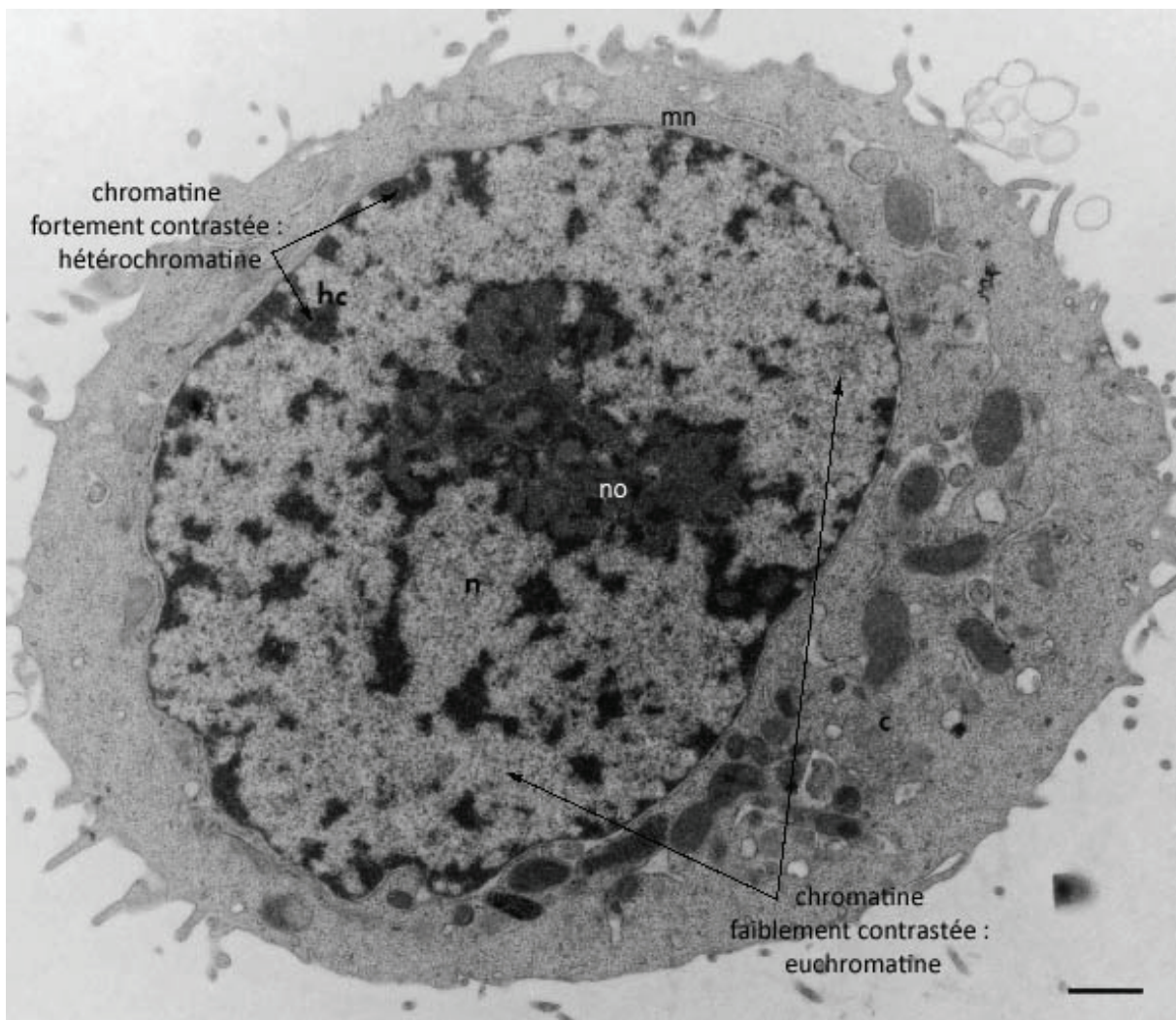


Figure 7: Morphologie d'un noyau de cellule de mammifère.

Cellule HeLa contrastée et observée au microscope électronique montrant la définition histologique des deux formes de chromatine : une forme fortement contrastée nommée hétérochromatine et une forme faiblement contrastée nommée euchromatine (no: nucléole, n: noyau, hc: hétérochromatine, mn: membrane nucléaire, c: cytoplasme) (Jackson, 1997).

transposables et des séquences satellites majeures chez la souris (Pardue and Gall, 1970). Les histones sont spécifiquement tri-méthylées sur la lysine 9 de l'histone H3 et sur la lysine 20 de l'histone H4. L'hétérochromatine constitutive est stable et garde ses propriétés à tous les stades du développement. L'hétérochromatine facultative quant à elle, correspond à la fraction de la chromatine condensée qui varie d'un type cellulaire à l'autre. Elle est constituée des gènes dont l'expression est régulée au cours du développement (Grewal and 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 voies de différenciation (Surani et al., 2007). Les régions d'hétérochromatine facultative sont caractérisées entre autres par la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (Trojer and Reinberg, 2007). Le chromosome X des mammifères est un exemple bien caractérisé d'hétérochromatine facultative. Chez les individus femelles, un seul des 2 chromosomes X est actif, l'autre est inactivé à un stade précoce du développement, et demeure sous forme d'hétérochromatine facultative. Les gènes de ce chromosome sont maintenus silencieux ce qui assure un niveau d'expression des gènes du chromosome X identique chez les individus mâles et femelles.

Ces définitions de l'euchromatine et de l'hétérochromatine sont largement admises. Cependant la corrélation entre le niveau de compaction de la chromatine et les modifications post-traductionnelles des histones, n'a jamais été démontrée *in vivo* à un niveau ultrastructural. De plus, au fil des années, des résultats sont venus remettre en question les relations préalablement établies qui admettent que la chromatine décondensée est accessible et de ce fait transcriptionnellement active et qu'à l'inverse la chromatine condensée est inaccessible et donc transcriptionnellement inactive. En effet, le groupe de Bickmore a analysé la structure de la chromatine à un niveau plus global. Pour ce faire, la chromatine est séparée en fibres ouvertes ou fermées (en fonction de leur sensibilité aux nucléases) et la densité des gènes ainsi que le niveau d'activité transcriptionnelle sont déterminés. Ces expériences ont démontré qu'il existe un lien entre la structure de la chromatine et la densité des gènes, indépendamment du statut transcriptionnel des gènes en question. Ainsi les fibres de chromatine accessibles aux nucléases sont associées à une densité élevée en gènes mais pas nécessairement à un fort niveau d'expression de ces

gènes. Les fibres compactes quant à elles, ont généralement une densité faible de gènes mais peuvent présenter des gènes transcriptionnellement actifs (Gilbert et al., 2004).

La capacité d'un gène à être transcriptionnellement actif n'est pas nécessairement perdue lorsque la chromatine est condensée en fibres compactes. Dans ce cas, ce n'est pas la localisation des gènes dans des domaines d'euchromatine ou d'hétérochromatine qui va réguler l'activité des gènes mais d'autres facteurs comme par exemple les modifications des histones (Schneider and Grosschedl, 2007).

II. Les histones et la régulation de la transcription :

L'action des facteurs de transcription et la séquence d'ADN jouent un rôle primordial dans la régulation de la transcription ; mais pour assurer ces fonctions, la structure de la chromatine doit pouvoir être modulée de façon très dynamique. Pour ce faire il existe au sein de la cellule un ensemble de mécanismes capables de modifier la structure de la chromatine et de réguler l'expression des gènes sans altérer la séquence d'ADN (Goldberg et al., 2007). Ces mécanismes déterminent le phénotype de la cellule et reposent principalement sur la méthylation de la séquence d'ADN, les modifications chimiques des histones, la présence des variants d'histones et l'action de petits ARN non-codants. Dans la suite du manuscrit seule la contribution assurée par les modifications post-traductionnelles des histones sur la régulation de la transcription sera détaillée. En effet, les combinaisons des modifications chimiques des histones participent à l'identité des cellules et peuvent être modifiées au cours du développement et de la différenciation cellulaire (Sasaki and Matsui, 2008).

1) Les modifications post-traductionnelles des histones :

Les histones de la particule cœur des nucléosomes sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles qui contrôlent différents processus physiologiques dans la cellule comme par exemple, la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (Blackwell et al., 2007; Hyland et al., 2005). Ces modifications sont localisées principalement sur les régions amino-terminales flexibles des histones mais peuvent également se retrouver dans certain cas sur le domaine « histone fold » central et les régions carboxy-terminales.

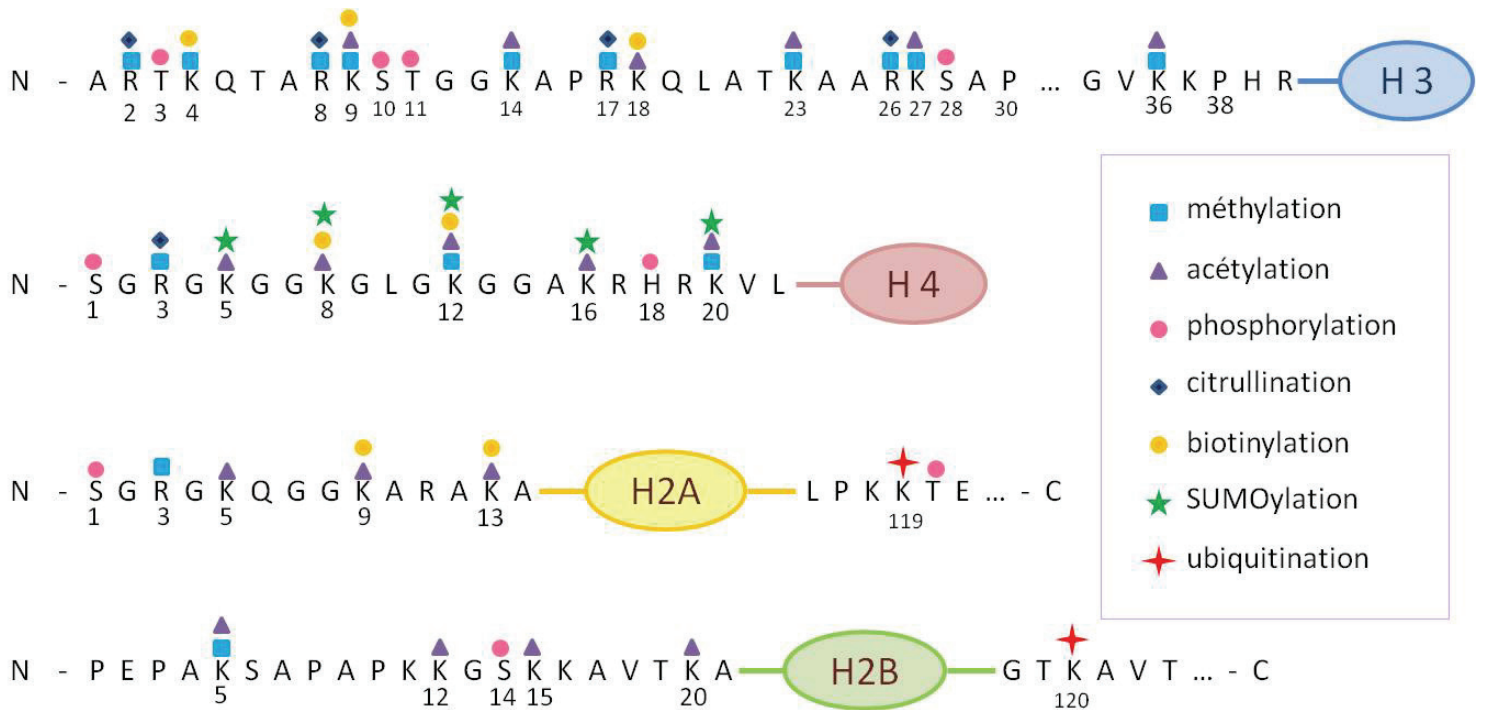


Figure 8 : Les principales modifications post-traductionnelles des histones de mammifères.

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

A l'heure actuelle, au moins neuf types de modifications différentes ont été identifiés et répertoriés au niveau de résidus spécifiques des histones (**figure 8**) (Kouzarides, 2007). Les modifications les plus étudiées sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitinylation et l'ADP-ribosylation, mais d'autres modifications ont également été décrites telles que la SUMOylation, la déimination, la biotinylation ou l'isomérisation. La technique de spectrométrie de masse ne cesse d'accroître l'identification de nouvelles modifications (Garcia et al., 2007). De plus, la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) permet l'étude de la distribution dynamique de ces modifications sur l'ensemble du génome.

Ces modifications peuvent être associées aussi bien à l'activation qu'à la répression des gènes, définissant des états spécifiques de la chromatine donnant lieu à des réponses biologiques variées. Parmi les modifications d'histones précédemment citées, l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitinylation nécessaires à la compréhension du manuscrit seront détaillées.

a) L'acétylation :

L'acétylation des histones consiste au transfert d'un groupement acétyle (COCH_3) à partir d'une molécule d'acétyl-coenzyme A vers le groupement ϵ -aminé d'un résidu lysine (K). Cette réaction est catalysée par des enzymes appelées histone-acétyltransférases (HATs) et la réaction inverse est le résultat de l'action des histone-déacétylases (HDACs) (**figure 9**). Le niveau d'acétylation est donc la résultante de l'activité de ces deux enzymes antagonistes et peut conduire, s'il est mal contrôlé, à diverses pathologies (Timmermann et al., 2001). La cellule est capable de réguler l'activité enzymatique de ces protéines en contrôlant la quantité disponible, la localisation cellulaire ou encore la capacité des enzymes à interagir avec des facteurs de transcription spécifiques (Legube and Trouche, 2003).

Les HATs sont capables d'acétyler à la fois les histones mais aussi les facteurs de transcription ainsi que d'autres protéines nucléaires. Les HATs ont été classées phylogénétiquement et présentent des affinités distinctes pour des lysines spécifiques (Berndsen and Denu, 2008; Marmorstein, 2001). *In vivo*, la majorité des HATs se trouve au sein de complexes multi-protéiques et l'association de l'enzyme aux autres protéines du complexe peut stimuler l'activité catalytique de l'enzyme en élargissant la spécificité de substrat (Grant et al., 1998; Martinez et al., 1998; Ogryzko et al., 1998).

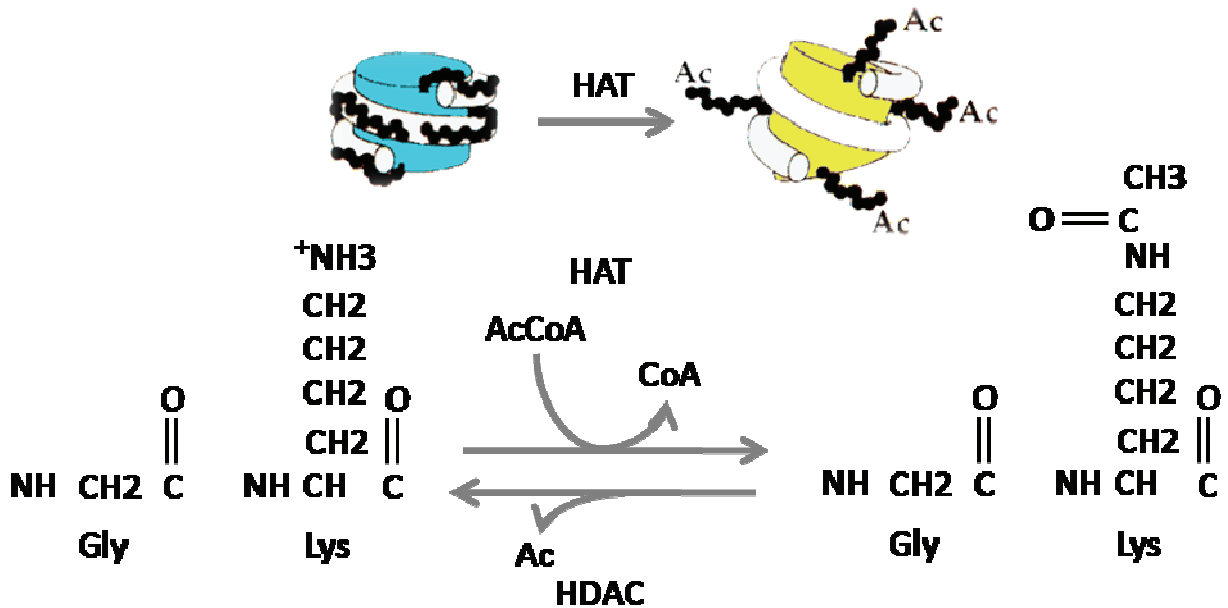


Figure 9: Réaction d'acétylation et de déacétylation des lysines.

L'acétylcoenzyme A (AcCoA) permet à l'histone acétylase transférase (HAT) d'acétyler le substrat. La réaction inverse est catalysée par l'histone déacétylase HDAC. Le nucléosome bleu est hypo-acétylé alors que le nucléosome jaune est hyper-acétylé. L'acétylation neutralise la charge positive et permet aux queues d'histones (noires) d'être plus flexibles (Wolffe and Pruss, 1996).

Les HDACs sont les sentinelles de la répression transcriptionnelle. Ces protéines diffèrent par leurs structures, leurs fonctions enzymatiques, leur localisation sub-cellulaire et leur profil d'expression (Haberland et al., 2009). De la même façon que les HATs sont recrutées sur des promoteurs spécifiques par des activateurs ou des co-activateurs transcriptionnels, les HDACs interagissent avec des co-répresseurs. Des études montrent l'importance des HDACs dans la régulation du cycle cellulaire et l'expression des gènes ainsi que leur implication dans certaines formes de cancers et l'utilisation d'inhibiteur de HDAC constitue une stratégie de traitement (Timmermann et al., 2001).

L'acétylation des histones au niveau des résidus lysine 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). De la même façon, les HDACs permettent souvent de passer d'un état permissif à un état répressif en termes de compétences transcriptionnelles (Verdone et al., 2005). Des analyses globales à l'échelle du génome, réalisées à la fois chez la drosophile, la souris et l'homme, en utilisant des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et de puces à ADN (DNA microarray), montrent que cette modification est particulièrement enrichie au niveau des régions promotrices et au niveau des séquences codantes des gènes (Bernstein et al., 2005; Schubeler et al., 2004).

Le contrôle de l'expression des gènes par l'acétylation des histones peut reposer sur deux mécanismes. Le premier mécanisme, de type « électrostatique » repose sur la mobilité des nucléosomes et l'accessibilité des régions promotrices à la machinerie transcriptionnelle. En effet, l'addition du groupement acétyle sur une lysine, neutralise la charge positive de l'acide aminé et affaiblit le contact avec la molécule d'ADN chargée négativement (Kingston and Narlikar, 1999). Le second mécanisme est basé sur le recrutement de protéines capables de reconnaître spécifiquement les lysines acétylées (Yang, 2004). Ces deux mécanismes peuvent agir ensemble pour réguler la transcription des gènes.

L'acétylation d'un résidu lysine crée un site d'ancrage aux domaines protéiques appelés bromodomains (Jeanmougin et al., 1997; Yang, 2004). Ce domaine prend son nom de la première protéine dans laquelle il a été découvert : la protéine de drosophile brahma (Tamkun et al., 1992). Ce domaine est présent dans plusieurs protéines associées à la chromatine ce qui lui confère diverses fonctions (de la Cruz et al., 2005). Le module est

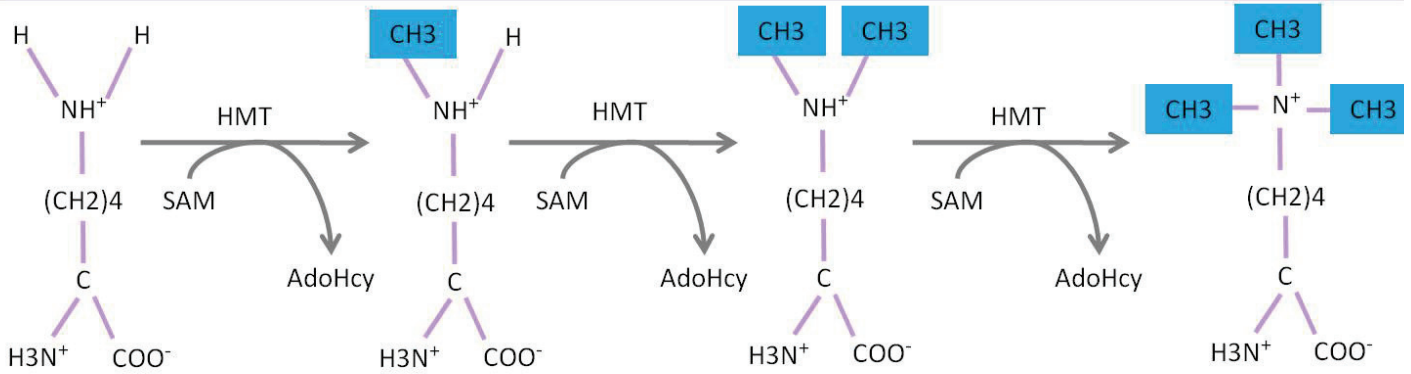
également présent dans une grande partie des HATs. Des bromodomains sont aussi retrouvés au niveau de sous-unités de complexes multi-protéiques de remodelage de la chromatine. Par exemple l'acétylation de la lysine 8 de l'histone H4 recrute spécifiquement un complexe de remodelage de la chromatine. La chromatine remodelée est alors accessible à un co-activateur transcriptionnel qui vient se lier spécifiquement à l'histone H3 acétylée sur ses lysines 9 et 14 (Agalioti et al., 2002). Les bromodomains sont aussi présents au sein de certaines histones méthyle-transférases (HMTs). Ainsi, *in vitro*, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est stimulée par un peptide H3 acétylé permettant l'activation de l'expression du gène cible (Milne et al., 2002). Ceci renforce l'idée qu'il existe un langage de la chromatine et illustre l'interdépendance des modifications d'histones entre elles.

b) La méthylation :

La méthylation des histones consiste en une réaction de transfert d'un groupement méthyle, apporté par une molécule de S-adénosine-méthionine (SAM), vers un résidu lysine ou arginine mais seule la méthylation des résidus lysines des histones sera détaillée dans le manuscrit. La méthylation des lysines est catalysée par les histones méthyle-transférases (HMTs) et enlevée par les histone déméthylases (HDMs) (Shi and Whetstine, 2007) (**figure 10**).

Les HMTs spécifiques des lysines ont été classées en huit familles en fonction de leurs similarités de séquences et de leurs propriétés structurales (Volkel and Angrand, 2007). Ces protéines ont souvent des spécificités de substrat bien déterminées et sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle (Martin and Zhang, 2005). La méthylation des histones est une réaction réversible qui peut être retirée par plusieurs protéines de la famille des histone déméthylases (HDMs) (Lan et al., 2008). La première HDM à avoir été identifiée, déméthyle spécifiquement les lysines 9 et 14 de l'histone H3 lorsque ces dernières sont mono- ou di-méthylées. Cette enzyme catalyse une réaction d'oxydation qui nécessite de la flavine comme cofacteur (Shi et al., 2004). Une grande famille de HDMs a ensuite été caractérisée, ces enzymes assurent la déméthylation des histones mono- di- et tri-méthylées par une réaction d'oxydation qui nécessite du fer et de l' α - cétoglutarate comme cofacteur (Tsukada et al., 2006) (**figure 10**). La présence d'une HMT et d'une HDM a pu être identifiée au sein du même complexe protéique. Cette association met en évidence la nécessité d'une fine

1) Méthylation des Lysines:



2) Déméthylation des Lysines:

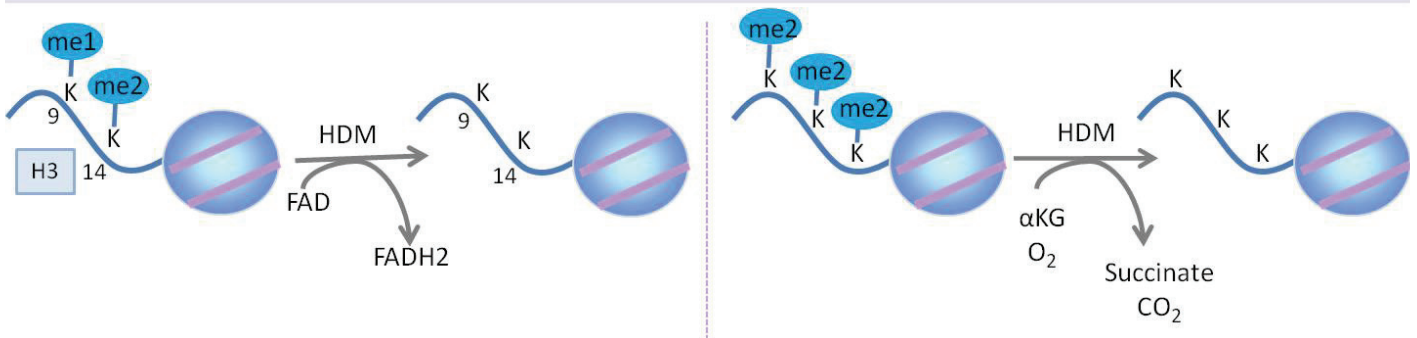


Figure 10 : Réaction de méthylation et de déméthylation des lysines.

- 1) Les différents niveaux de méthylation des lysines par les histones méthyle-transférase (HMT) en présence de S-adénosine-méthionine (SAM).
- 2) Déméthylation des lysines par les lysines-déméthylase (HDM) en présence de différents cofacteurs : flavine adénine dinucléotide (FAD) ou d' α -cétoglutarate (αKG) en fonction des spécificités de l'enzyme.

balance entre les histones méthylées et les histones non méthylées pour réguler l'expression des gènes (Wang et al., 2007).

La méthylation des histones joue un rôle complexe car souvent associée à une répression de la transcription (méthylation de K9 et K27 de l'histone H3 et de K20 de l'histone H4) (Martin and Zhang, 2005) mais peut également être associée à un état transcriptionnellement actif de la chromatine (méthylation de K4 de l'histone H3 par exemple).

La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) est probablement la mieux définie à ce jour, elle peut subir jusqu'à trois niveaux de méthylation différents (mono- di- ou triméthylé), mais chacun d'entre eux n'est pas trouvé au même endroit dans le génome. La triméthylation de H3K9 favorise la formation d'une structure chromatinienne condensée (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). L'effet de cette modification pourrait donc dépendre de sa position sur le gène (région promotrice ou codante) ainsi que de son association avec d'autres modifications.

Les marques de tri-méthylation sur la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27) et de di-méthylation de H3K9 jouent un rôle dans le maintien de l'inactivation du chromosome X (Fang et al., 2004). La méthylation de H3K27, a deux points communs avec la méthylation de H3K9. Tout d'abord, le résidu lysine peut accueillir différents degrés de méthylation distribués différemment dans la chromatine. L'autre similarité repose sur le fait que ces deux modifications forment des sites pour le recrutement de protéines effectrices spécifiques. Ces protéines ont la particularité de porter des domaines structuraux spécifiques, appelés chromodomaines, capables de se lier à l'histone H3 méthylée sur les lysines 9 et 27. L'un des principaux rôles de H3K27 triméthylée est de réguler l'expression des facteurs de transcription qui caractérisent l'identité des tissus embryonnaires. Dans l'embryon en cours de développement, la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 réprime l'expression des facteurs de transcription limitant ainsi l'expression des gènes régulés par ces facteurs, à des types de cellules spécifiques (Ringrose and Paro, 2004).

La triméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20) nécessite la triméthylation de H3K9, on la retrouve donc dans la chromatine condensée transcriptionnellement inactive

(Schotta et al., 2004). La mono- et la di- méthylation de H4K20 sont localisées dans les gènes réprimés au sein de la chromatine décondensée (Martin and Zhang, 2005).

La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) est corrélée à l'activité transcriptionnelle et semble être directement liée au mécanisme d'initiation de la transcription. Les enzymes qui catalysent cette méthylation sont associées à l'ARN polymérase II (Krogan et al., 2003; Ng et al., 2003). Des études génomiques ont montré une évolution du degré de méthylation de H3K4 le long de la séquence codante des gènes. Il y a un enrichissement en H3K4 tri-méthylée au niveau du site d'initiation de transcription. Au contraire H3K4 di-méthylée est localisée tout le long de la séquence codante et H3K4 mono-méthylée se localise préférentiellement à la fin de la séquence codante des gènes. Ce profil de méthylation d'H3K4 sur la séquence d'un gène donné, suggère un rôle de cette modification au niveau de l'activation de la transcription (Shukla et al., 2009). La tri-méthylation d'H3K4 peut interagir avec différents partenaires qui appartiennent aussi bien au complexe de pré-initiation qu'au spliceosome (responsable de la maturation de l'ARN pré-messager) , elle joue donc un rôle dans l'initiation de la transcription, au cours de l'élongation et pendant la maturation des pré-messagers. Des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine, ont mis en évidence des « domaines de chromatine bivalents », avec une coexistence de H3K4 tri-méthylée (associée à une transcription active des gènes) et H3K27 tri-méthylée (associé à une répression de l'expression génique) sur la séquence de gènes importants pour le développement des cellules souches. Ces domaines bivalents sont censés protéger ces gènes d'une activation prématurée et en même temps « empoisonner » ces gènes pour une activation future (Bernstein et al., 2006; Lan and Shi, 2009)

Contrairement à l'acétylation, la méthylation n'affecte pas la charge globale de l'acide aminé sur lequel elle a lieu. La méthylation peut toutefois ajouter du volume et de l'hydrophobicité qui peuvent réduire la stabilité du nucléosome ou servir de plateforme pour la fixation d'autres protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. La méthylation est la marque majeure de recrutement de machinerie modifiant la chromatine via la reconnaissance des lysines méthylées par au moins cinq domaines spécifiques (décrits ci-dessous) et associés à différentes protéines effectrices.

Le chromodomaine (*CHR*omatin *OR*ganization *MO*difier) est le premier à avoir été découvert chez la drosophile au sein des protéines du groupe HP1 (*Heterochromatin Protein type 1*) et polycomb qui reconnaissent spécifiquement les lysines 9 et 27 de l'histone H3 lorsqu'elles sont méthylées (préférentiellement tri-méthylées) (Nielsen et al., 2001). Ces protéines impliquées dans la répression sont capables de recruter d'autres répresseurs travaillant en synergie pour établir une structure chromatinienne compacte (Grewal and Jia, 2007). Chez la levure, *S. Cerevisiae*, une des sous unités du complexe de co-activation transcriptionnel SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase coactivator complex*) présente deux chromodomaines. Ces chromodomaines reconnaissent spécifiquement la lysine 4 méthylée sur l'histone H3 (Pray-Grant et al., 2005).

Le domaine Tudor est présent, par exemple, au niveau de la déméthylase JMJD2A. Cette protéine possède un double domaine qui reconnaît spécifiquement la lysine 4 méthylée de l'histone H3 et la lysine 20 méthylée de l'histone H4 (Huang et al., 2006).

Le motif WD40 (*tryptophane-aspartic-acid-repeat-every 40 residues*) est présent par exemple, au sein de l'activateur transcriptionnel WDR5 (*WD40 Repeat type 5*), ce motif reconnaît la lysine 4 méthylée de l'histone H3 indépendamment de son niveau de méthylation (mono- di- ou tri-méthylée) (Couture and Trievel, 2006).

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

Le domaine MBT (*Malignant Brain Tumor*) présente une affinité préférentielle pour les lysines mono-méthylées. Ce domaine est associé aux répresseurs transcriptionnels où il peut fixer ensemble au moins deux nucléosomes consécutifs. Par ce mécanisme, la chromatine se trouve « scellée » et l'expression génique est réprimée (Trojer et al., 2007; Wu et al., 2007).

c) L'ubiquitylation :

L'ubiquitylation consiste en une réaction de conjugaison d'une ou plusieurs protéines ubiquitines sur un résidu lysine. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés hautement conservée parmi les espèces eucaryotes avec une masse moléculaire totale d'environ 8.5kDa. Cette réaction implique trois activités enzymatiques distinctes

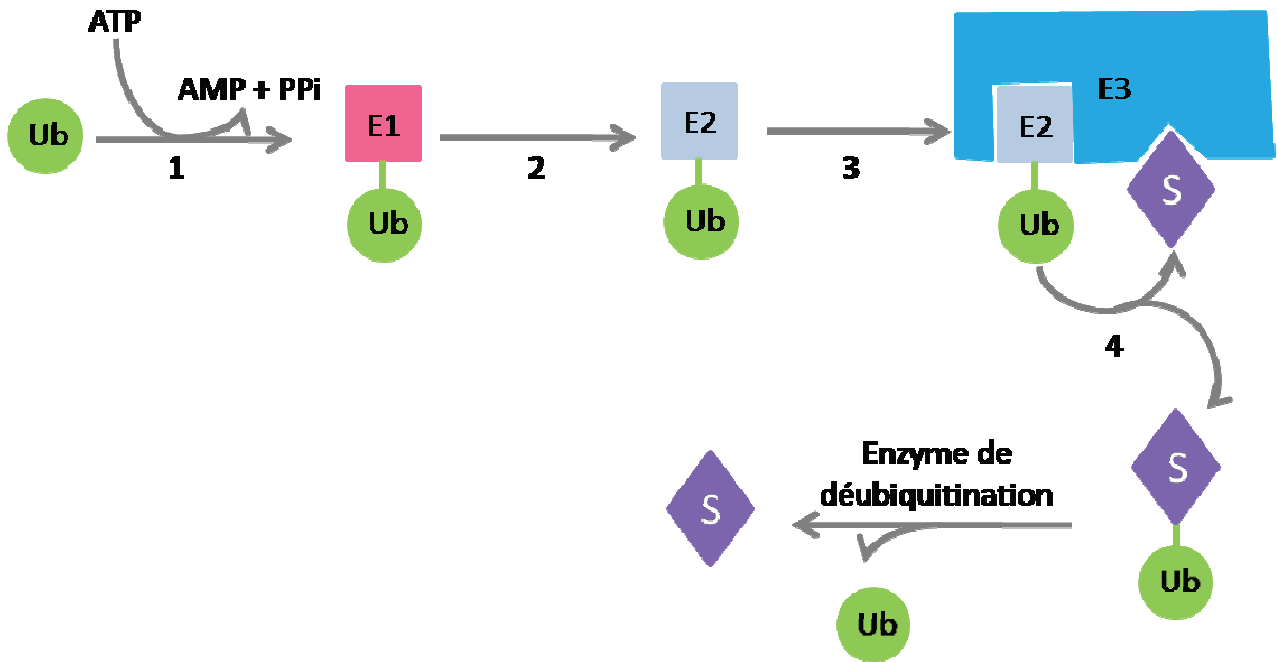


Figure 11 : Réactions d'ubiquitinylation et de déubiquitinylation d'une protéine substrat.

L'ubiquitine est activée par l'enzyme activatrice E1 en présence d'ATP (1) puis elle est transférée sur l'enzyme de conjugaison E2 (2). L'enzyme E2 et la protéine substrat viennent se fixer à la protéine ubiquitine ligase E3 (3) et la molécule d'ubiquitine est alors transférée sur la protéine substrat S (4). La déubiquitinylation du substrat est catalysée par une enzyme qui présente une activité déubiquitinylyase.

(Hochstrasser, 1996). L'ubiquitine est tout d'abord activée par une réaction ATP dépendante catalysée par l'enzyme activatrice E1. L'ubiquitine peut alors être conjuguée au niveau d'un résidu cystéine de l'enzyme de conjugaison E2 par une liaison thioester. L'étape finale, permet le transfert de l'ubiquitine depuis E2 sur une lysine portée par le substrat protéique cible. Cette réaction est catalysée par une enzyme isopeptide ligase E3 (**figure 11**). Les substrats protéiques cibles peuvent être mono- ou poly-ubiquitinylés. La polyubiquitinylation est une marque pour la dégradation via le protéasome 26S. Dans le cas des histones, la réaction d'ubiquitinylation n'a jamais été décrite comme impliquée dans un processus protéolytique.

Cette modification est présente au niveau de la lysine 119 de l'histone H2A et au niveau de la lysine 123 de l'histone H2B dans les cellules eucaryotes supérieures (Weake et al., 2008; Weake and Workman, 2008). La réaction de mono-ubiquitinylation est réversible et l'ubiquitine peut être soustraite de son substrat cible par des enzymes présentant une activité déubiquitinyllase connue comme protéases spécifiques des ubiquitines (Nijman et al., 2005).

La mono-ubiquitinylation de H2A ou de H2B a des effets très différents au sein de la cellule. Alors que l'ubiquitinylation de H2A est associée à l'inactivation de la transcription, l'ubiquitinylation de H2B, joue un rôle à la fois dans la répression mais aussi dans l'activation de la transcription.

L'histone H2A mono-ubiquitinylée (H2Aub) est présente sur le chromosome X inactivé (Xi) chez la souris (Fang et al., 2004). H2Aub est aussi présent au niveau du promoteur des gènes réprimés par le complexe polycomb (Nakagawa et al., 2008). L'histone H2A ubiquitinylée peut inhiber la transcription par différents mécanismes.

Pavri et ses collaborateurs (Pavri et al., 2006) ont démontré que la perte de fonction d'une ubiquitine ligase réduit le niveau d'ubiquitinylation de H2A, stimule la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II et stimule l'élongation de la transcription. H2Aub jouerait donc un rôle important dans l'inhibition de l'élongation de la transcription.

De plus, des expériences réalisées *in vitro* mettent en évidence que H2Aub inhibe la di- et tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, renforçant l'idée que H2Aub vient réprimer l'initiation de la transcription (Nakagawa et al., 2008).

Un autre mécanisme par lequel H2Aub peut réprimer la transcription repose sur le rôle joué par l'histone « linker » H1. *In vitro*, H2Aub stimule la fixation de l'histone H1 au niveau des nucléosomes (Jason et al., 2005). Zhu et ses collègues (Zhu et al., 2007) ont montré que la mutation de la lysine 119 de l'histone H2A inhibe la liaison de l'histone H1 au niveau des nucléosomes, ainsi la déubiquitinylation de l'histone H2A pourrait jouer un rôle dans la dissociation de l'histone H1 au niveau des nucléosomes. La possible implication de l'histone H1 dans ce mécanisme de répression de la transcription est cohérente avec la structure même du nucléosome. Dans le nucléosome, l'histone H1 interagit directement avec l'extrémité C-terminale de l'histone H2A (site d'ubiquitinylation) (Luger et al., 1997b).

L'histone H2Aub pourrait ainsi contribuer à la répression de la transcription en inhibant l'élongation de l'ARN polymérase II et en compactant la structure de la chromatine via l'histone H1. A l'inverse la déubiquitinylation de H2Aub semble activer la transcription des gènes et jouerait un rôle dans l'initiation de la transcription (Zhu et al., 2007)

L'Histone H2B mono-ubiquitinylée (H2Bub), est associée à une transcription active en stimulant notamment la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) (Osley et al., 2006). La régulation de l'activité histone méthyle-transférase par H2Bub est unidirectionnelle et des mutations qui touchent la méthylation de l'histone H3 n'ont pas d'effet sur l'ubiquitinylation de H2B (Sun and Allis, 2002) Le complexe histone méthyle-transférase (HMT) spécifique de H3K4, requiert l'ubiquitinylation de H2B pour di ou tri-méthyle H3K4. Des travaux suggèrent que H2Bub pourrait réguler cette activité histone méthyle-transférase. Par exemple, des expériences réalisées sur la levure montrent que l'ubiquitinylation de H2B est nécessaire pour que le complexe HMT recrute sa sous-unité catalytique. La perte de fonction de l'ubiquitine ligase spécifique de H2B, entraîne une perte de la sous-unité catalytique au niveau du complexe HMT purifié, ce complexe est alors incapable de di- ou tri-méthyle H3K4. L'histone H2Bub joue un rôle crucial dans le recrutement de la sous-unité catalytique du complexe HMT spécifique de H3K4 (Lee et al., 2007).

Des expériences d'élongation de la transcription réalisées *in vitro*, montrent que H2Bub peut assister l'histone chaperonne FACT (Facilitates Chromatin Transcription) et stimuler le passage de l'ARN polymérase II en élongation au travers du nucléosome (Pavri et al., 2006). Le complexe FACT peut déstabiliser la structure du nucléosome en déplaçant un

dimère H2A/H2B de la particule cœur du nucléosome et faciliter la progression de l'ARN polymérase II le long de la chromatine (Laribee et al., 2007). Ces données sont en accord avec des travaux réalisés sur la levure. Ces travaux mettent en avant un rôle de H2Bub dans l'élongation de la transcription et ce rôle serait indépendant de la méthylation de H3K4 (Tanny et al., 2007).

L'ubiquitinylation de l'histone H2B (H2Bub) est intimement liée aux étapes précoces d'initiation et d'élongation de la transcription. Le recrutement de l'ubiquitine ligase de H2B au niveau du promoteur des gènes n'est pas suffisant pour ubiquitinyler H2B et nécessite la présence d'un complexe spécifique qui vient s'associer à l'ARN polymérase II pendant l'initiation de la transcription et l'élongation. Des expériences ont montré que la mutation d'une des sous-unités de ce complexe entraîne l'inhibition de l'ubiquitinylation de H2B. Dans ce cas, l'ubiquitine ligase est bien recrutée au niveau du promoteur mais elle ne peut pas catalyser l'ubiquitinylation. D'autres expériences viennent renforcer le rôle critique joué par les étapes précoces de la transcription sur l'ubiquitinylation de l'histone H2B. Ainsi la kinase qui phosphoryle spécifiquement la lysine 5 du CTD de l'ARN polymérase II joue un rôle crucial dans l'ubiquitinylation de H2B. La perte de fonction de cette kinase élimine la présence de H2Bub (Wyce et al., 2007; Xiao et al., 2005).

L'histone H2Bub est le substrat pour deux ubiquitines protéases spécifiques chez la levure : Ubp8 et Ubp10. L'enzyme Ubp8 est une sous-unité du complexe SAGA (voir III.2.b). Des orthologues d'Ubp8 ont pu être identifiés chez l'homme et la drosophile (Weake et al., 2008). Des expériences réalisées sur la levure ont montré que la déubiquitinylation de H2Bub par la sous-unité Ubp8 est indispensable au recrutement d'une kinase spécifique. Cette kinase vient phosphoryler la sérine 2 du CTD de l'ARN polymérase II. Cette phosphorylation forme un site d'ancrage pour une histone méthyle-transférase dont l'activité est essentielle pour les étapes qui suivent l'élongation (Wyce et al., 2007). De plus, les auteurs montrent que la sous-unité Ubp8 reste associée à l'ARN polymérase II en cours d'élongation, renforçant l'idée que la déubiquitinylation de l'histone H2B joue un rôle crucial pendant la transcription.

3) L'histone H1 :

L'histone H1 est un composant structural de la chromatine qui joue un rôle important dans l'établissement et le maintien de la fibre de chromatine de 30 nm (Ramakrishnan et al., 1993; Robinson and Rhodes, 2006). La chromatine contenant l'histone H1 est plus résistante aux nucléases et montre une forte inhibition de la mobilité des nucléosomes (Hill, 2001). Par conséquent, l'histone H1 est considérée comme l'un des acteurs majeurs responsable de la compaction de la chromatine et s'oppose à l'accessibilité de l'information génétique par les facteurs de transcription et l'ARN polymérase II. Par ailleurs, l'histone H1 semble jouer un rôle dynamique dans l'expression des gènes, participant à la répression ou à l'activation de la transcription.

Au sein des eucaryotes supérieurs, la structure de la protéine H1 est conservée mais il existe de nombreux sous-types de l'histone H1 codés par différents gènes. On compte par exemple au moins 6 sous-types différents chez la souris (5 sous-types spécifiques des cellules somatiques et 1 sous-type présent dans les cellules germinales) et le sous-type somatique H1c est le plus fortement exprimé (Wang et al., 1997). La structure des protéines H1 présente 3 domaines : un domaine globulaire central flanqué de part et d'autre d'un court domaine N-terminal et d'un long domaine C-terminal. Les domaines terminaux divergent en fonction de leurs tailles et de leurs séquences et constituent la caractéristique la plus distincte de chaque sous-type (Wolffe, 1997). Le domaine globulaire est la partie la mieux conservée de la protéine, non seulement entre les différents sous-types mais aussi au cours de l'évolution. Ce domaine joue un rôle important dans le repliement de la fibre de chromatine permettant à l'histone H1 de se positionner de façon asymétrique par rapport au nucléosome (Zhou et al., 1998).

L'histone H1 joue un rôle crucial pendant le développement embryonnaire. La perte de fonction de l'histone H1 chez la drosophile comme la perte de fonction de trois sous-types de H1 chez la souris, sont létales pendant le développement embryonnaire (Fan et al., 2003; Lu et al., 2009). Des études de perte de fonction ont pu être réalisées sur des cellules en culture, et démontrent *in vivo* l'implication de l'histone H1 à la fois dans l'organisation des nucléosomes et dans la régulation de la transcription. Dans des cellules d'embryons de poulets en culture la perte de fonction complète de l'histone H1 met en évidence une

diminution globale de l'espacement des nucléosomes accompagnée d'une augmentation du volume nucléaire. L'observation cyto-chimique des chromosomes en métaphase met en évidence une augmentation des aberrations chromosomiques mais la structure de la chromatine reste normale pendant la mitose. L'analyse de l'expression des gènes révèle que la transcription de nombreux gènes est affectée et ces gènes se retrouvent majoritairement sous-régulés (Hashimoto et al., 2010). L'histone H1 joue un rôle important dans l'organisation de la chromatine des cellules en interphase. Mais, le mécanisme par lequel la perte de l'histone H1 entraîne une altération de l'expression des gènes reste inconnu. L'hypothèse suivante est proposée : la compaction locale des poly-nucléosomes pourrait être affectée par la répulsion électrostatique des groupes phosphates de l'ADN chargés négativement en absence de l'histone H1 qui elle est chargée positivement. La structure altérée de la chromatine peut alors modifier l'expression des gènes en facilitant l'accès aux facteurs de transcription et en activant l'expression des gènes. Cependant, en absence d'histone H1, les gènes se retrouvent sous-régulés avec une diminution globale de l'activité transcriptionnelle suggérant un rôle indirect de l'histone H1 sur l'activation de la transcription. En effet, la perte de l'histone H1 entraîne une augmentation du volume nucléaire qui pourrait avoir pour conséquence de diluer les facteurs de transcription à l'intérieur du noyau et de diminuer l'activité transcriptionnelle.

Une autre étude réalisée dans des cellules cancéreuses humaines confirme et précise ces résultats. Par une approche de perte de fonction inductible, chaque variant de l'histone H1 peut être éteint au sein de la cellule. Les pertes de fonction de H1e et H1b n'ont aucun effet sur l'architecture nucléosomale alors que la perte de fonction de H1c altère l'espacement des nucléosomes suggérant que l'histone H1c joue un rôle spécifique dans l'organisation de la chromatine. De plus, la perte de fonction spécifique de H1c entraîne des défauts dans la progression du cycle cellulaire avec un arrêt des cellules en interphase (phase G1). Les gènes spécifiques de régulation du cycle cellulaire sont alors sous-régulés suggérant un rôle spécifique de l'histone H1c dans l'activation de l'expression des gènes (Sancho et al., 2008).

L'histone H1, plus particulièrement le sous type H1c, joue donc un rôle important dans l'espacement des nucléosomes et la compaction de la chromatine des noyaux en interphase. Elle agirait comme un régulateur global de la transcription en activant l'expression des gènes. Le sous-type H1c est la forme de la protéine H1 qui prédomine dans les cellules




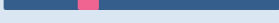
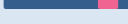
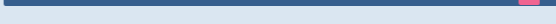


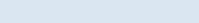
maladies	protéines	localisation	
HD	Huntingtin	C	
DRPLA	Atrophin-1	N	
SCA1	Ataxin-1	N	
SCA2	Ataxin-2	C	
SCA3	Ataxin-3	C/N	
SCA6	α -1Calcium channel subunit	M	
SCA7	Ataxin-7	N	
SCA17	TATA-binding protein	N	
SBMA	Androgen Receptor	N	

Figure 12 : Représentation schématique des différentes protéines à expansion polyglutamine. Les répétitions polyQ sont représentées en rose. C : cytoplasme, N : nucléaire, M : membranaire.

différenciées qui ont fini de se diviser (Wang et al., 1997). Cette caractéristique explique pourquoi seule l'organisation de la chromatine des noyaux en interphase est affectée par la perte de fonction de l'histone H1.

III. L'Ataxie Spinocérébelleuse de type 7 : SCA7

Cette maladie constitue mon modèle d'étude pour comprendre, *in vivo*, l'impact de la structure de la chromatine sur la transcription.

SCA7 est une maladie neurodégénérative appartenant à la famille des maladies à expansion polyglutamine. La protéine mutée qui porte l'expansion polyglutamine dans le cas de SCA7 est une sous-unité du complexe SAGA (Spt, Ada, GCN5, Acetyltransferase coactivator complex), co-activateur de la transcription.

Au sein du laboratoire, nous disposons de souris transgéniques modèles pour cette maladie. Ces souris expriment spécifiquement la protéine mutée dans la rétine et développent un phénotype rétinien sévère avec notamment une décondensation de la chromatine des noyaux de bâtonnets de cellules photoréceptrices. De façon remarquable, l'altération de la structure de la chromatine s'accompagne d'une dérégulation de la transcription des gènes dans ces noyaux et la cascade d'événements à l'origine de ce phénotype reste encore inconnue.

1) Généralités sur les maladies à expansion polyglutamine :

A l'heure actuelle, il existe neuf maladies à expansion polyglutamine distinctes causées par une répétition de trinuécléotides CAG dans la région codante des gènes correspondants aux protéines mutées qui portent une expansion polyglutamine (polyQ). Ces maladies se transmettent de façon autosomique dominante et sont toutes caractérisées par une neurodégénérescence progressive qui débute à l'âge adulte. Ces maladies regroupent la maladie de Huntington (HD), l'Amyotrophie Spinobulbaire (SBMA), l'Atrophie Dentato-Rubro-Pallido-Luysienne (DRPLA) et six Ataxies Spinocérébelleuse de type 1, 2, 3, 6, 7 et 17 (**figure 12**). Ces maladies ont chacune des spécificités mais présentent de nombreuses caractéristiques communes (La Spada and Taylor, 2003).

a) Quelques caractéristiques communes des maladies polyQ:

Le seuil pathologique de l'expansion polyQ commun à toutes ces maladies est autour de 36 triplets CAG. Les gènes impliqués dans les différentes maladies ne présentent aucune homologie de séquence excepté la répétition polyQ. Ces maladies polyQ entraînent une neurodégénérescence progressive survenant chez l'adulte ou plus rarement chez l'enfant et évoluent inévitablement vers la mort du patient. A ce jour, même si de grands progrès ont été accomplis pour comprendre le mécanisme pathologique des maladies à expansion polyglutamine, il n'existe encore aucun traitement (Bauer and Nukina, 2009).

Chacune des ces maladies présente un profil de dégénérescence spécifique et le profil d'expression des gènes responsables de ces maladies, ne permet pas de comprendre cette spécificité. La majorité des gènes responsables de ces maladies sont exprimés de façon ubiquitaire dans le système nerveux central et périphérique ainsi que dans les tissus non-neuronaux. Les niveaux d'expression sont variables d'une région à l'autre, mais il n'y a aucune corrélation avec les sites spécifiquement atteints pendant la maladie (Costa Lima and Pimentel, 2004). L'hypothèse proposée pour expliquer cette caractéristique repose sur des interactions entre la protéine mutée et des partenaires dont l'expression ou l'activité est spécifique de la zone touchée. Ce serait donc ces interactions qui expliqueraient le profil de dégénérescence spécifique pour chaque maladie, mais cette hypothèse n'a pas encore été confirmée.

Pour chacune de ces maladies, il existe une corrélation inverse entre la taille de l'expansion et l'âge de déclaration des symptômes. Les plus grandes expansions polyglutamines sont responsables de cas juvéniles voir infantiles de la maladie. Lors de la transmission de la maladie de parents à enfants il y a une instabilité des triplets répétés CAG, cette instabilité est d'autant plus marquée quand la transmission est d'origine paternelle. Les formes juvéniles de ces maladies sont souvent associées à une transmission par le père (Koshy and Zoghbi, 1997).

Les mécanismes moléculaires de la majorité de ces maladies reposeraient sur un gain de fonction. La maladie se développe car la protéine mutée est capable d'acquérir de nouvelles fonctions et non par une perte de sa fonction normale (Zoghbi and Orr, 2000). Les protéines qui portent l'expansion acquièrent une nouvelle fonction, qui se traduit par

l'acquisition de nouvelles propriétés toxiques (Paulson, 2000) et différentes caractéristiques communes aux maladies à expansion polyQ sont mises en avant pour tenter de comprendre l'étiologie de ces maladies :

La caractéristique morphologique majeure des maladies à expansion polyQ visible en histologie, est la présence d'inclusions intranucléaires. Ces inclusions résultent de l'accumulation en agrégats de protéines polyQ et sont présentes dans les tissus cérébraux de patients atteints. La distribution de ces inclusions nucléaires ne corrèle pas avec la spécificité neuronale de la maladie et l'hypothèse qui suggère que ces inclusions sont une cause de la neurodégénérescence est fortement débattue. Des études réalisées sur des patients ainsi que sur des animaux modèles, ont mis en évidence un recrutement anormal d'un nombre important de protéines différentes dans ces agrégats. Cependant ces études n'ont pas permis de démontrer que c'est la perte de fonction d'une protéine donnée par séquestration dans les agrégats qui est responsable de la toxicité. Des expériences d'immunomarquage ont permis d'identifier ces agrégats nucléaires avec un anticorps dirigé contre les protéines poly-ubiquitinylées. La poly-ubiquitinylation des protéines est un signal pour la dégradation par le protéasome. Ces résultats suggèrent que les protéines polyQ présentes dans les agrégats sont prêtes à être dégradées par le protéasome. Des travaux réalisés sur différents modèles cellulaires et animaux ainsi que sur les cerveaux de patients atteints ont montré que des composants du protéasome ainsi que certaines chaperonnes sont présents dans les inclusions et ceci quelques soient les maladies à expansion polyglutamine. Ces résultats suggèrent que les voies de dégradation des protéines polyQ pourraient être impliquées dans la toxicité induite par les expansions polyQ (Ross and Poirier, 2004). Cependant, le contenu des inclusions en composants du protéasome ne diffère pas significativement d'une région du cerveau à l'autre et ne permet pas d'expliquer la spécificité de l'atteinte neuronale pour chaque maladie.

Un clivage protéolytique de la protéine polyQ est observé dans la majorité des maladies à expansion polyQ (Tarlac and Storey, 2003). Ce clivage est spécifique de la protéine mutée car il ne touche pas la protéine normale. Il pourrait permettre la translocation nucléaire de fragments de la protéine mutée puis la formation d'agrégats polyQ. Ces données de clivage sont obtenues par des expériences de marquages immunohistologiques des agrégats avec des anticorps qui reconnaissent différentes régions des protéines mutées. D'autres expériences ont pu mettre en évidence, pour un certain nombre

de maladies à expansion polyQ, un clivage spécifique des protéines polyQ par un type de caspase donné. Des travaux de mutagénèse dirigée ont permis de générer des protéines polyQ résistantes au clivage protéolytique. L'analyse de neurones en culture après transfection de cette protéine polyQ caspase-résistante, a permis de mettre en évidence une diminution de la formation des agrégats dans les noyaux de ces neurones en culture (Young et al., 2007). Ces travaux viennent confirmer le rôle du clivage protéolytique des protéines polyQ dans la formation des inclusions nucléaires.

Plusieurs observations suggèrent que les protéines polyQ sont plus stables et se dégradent plus difficilement que les protéines normales. Cette stabilité des protéines polyQ pourrait être une étape précoce de la formation des agrégats et de la progression de la maladie. Des études réalisées sur des animaux modèles ont pu démontrer que la différence du niveau protéique entre la protéine mutée et la protéine normale ne repose pas sur une différence de quantité ou de stabilité des ARNs messagers qui reste comparable et constant avec l'âge. Ces résultats suggèrent que les protéines polyQ se stabilisent et s'accumulent dans les neurones avant de former des inclusions nucléaires (Yvert et al., 2001). Il existe une hypothèse qui s'appuie sur la stabilisation des protéines polyQ pour tenter d'expliquer l'origine des dysfonctions neuronales. Cette hypothèse repose sur une accumulation progressive de protéines polyQ ou de fragments de protéines mutées dans les cellules jusqu'à un seuil pathologique critique qui initie la cascade d'événements toxiques. En accord avec cette hypothèse, des modèles murins polyQ transgéniques présentant un faible niveau d'expression du transgène, ne présentent pas de phénotype de dysfonction neuronale. Ces résultats démontrent que la toxicité induite par les expansions polyQ dépend de leur quantité.

Le noyau joue un rôle clé dans les mécanismes de toxicité des maladies à expansion polyQ. La plupart des protéines portant une expansion polyglutamine sont nucléaires. Cependant certaines sont cytoplasmiques et seront relocalisées dans le noyau pendant la progression de la pathologie, indiquant que la localisation nucléaire est primordiale dans ces maladies. La première mise en évidence de l'importance de la localisation nucléaire des protéines polyQ dans la progression de la maladie repose sur des travaux réalisés avec des souris transgéniques. Ces souris expriment une protéine polyQ nucléaire ayant un signal de localisation nucléaire muté. Le produit du transgène est alors cytoplasmique et ces souris ne développent pas de signes neurologiques visibles (Klement et al., 1998). D'autres

expériences ont également pu démontrer l'importance de la localisation nucléaire. Ainsi la comparaison de souris transgéniques qui expriment une protéine polyQ cytoplasmique avec des souris qui expriment la même protéine polyQ nucléaire a permis de mettre en évidence que la même expansion polyQ est beaucoup plus toxique dans un contexte nucléaire que dans un contexte cytoplasmique (Benn et al., 2005). De nombreux efforts sont réalisés pour comprendre les différents événements provoqués par les protéines polyQ dans le noyau et dans ce contexte les dérégulations de la transcription sont particulièrement étudiées.

Les altérations transcriptionnelles induites par les protéines à expansion polyQ pourraient constituer l'événement le plus précoce dans la progression de ces pathologies (Cha, 2007; Sugars and Rubinsztein, 2003). En effet, des travaux réalisés sur différents modèles transgéniques ont mis en évidence des dérégulations transcriptionnelles avec notamment une perte d'expression de gènes importants impliqués dans les fonctions neuronales. Ces résultats ont pu être obtenus par des approches de gènes cibles ou par des approches plus globales d'analyse de transcriptomes (Hughes et al., 2001; Lin et al., 2000). Par exemple, des travaux réalisés sur deux lignées distinctes de souris transgéniques modèles pour la maladie SCA1, ont permis de mettre en évidence une perte d'expression très sévère de 5 gènes spécifiquement exprimés dans les cellules de Purkinje. Les cellules de Purkinje sont les cellules principalement atteintes dans cette maladie mais la dérégulation transcriptionnelle ne touche pas l'expression de tous les gènes spécifiques de ces cellules. Un rôle direct de la protéine polyQ responsable de la maladie sur l'expression des gènes n'a pu être mis en évidence. En effet, des souris mutantes qui présentent une dysfonction sévère des cellules de Purkinje ne présentent aucune altération de la transcription des gènes. Les anomalies transcriptionnelles sont détectables avant la formation d'inclusions nucléaires et avant l'apparition de symptômes neurologiques mais le mécanisme moléculaire sous-jacent reste encore mal connu.

b) Quelques caractéristiques de la maladie SCA7 :

SCA7 est unique parmi les maladies à expansion polyQ car c'est la seule maladie pour laquelle les patients présentent une atteinte spécifique de la rétine et plus particulièrement des photorécepteurs (**figure 13**) (Harding, 1993). SCA7, aussi appelée ADCA de type II (*Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia*) se caractérise par une dégénérescence progressive du cervelet, du tronc cérébral et des voies spinocérébelleuses associée à une

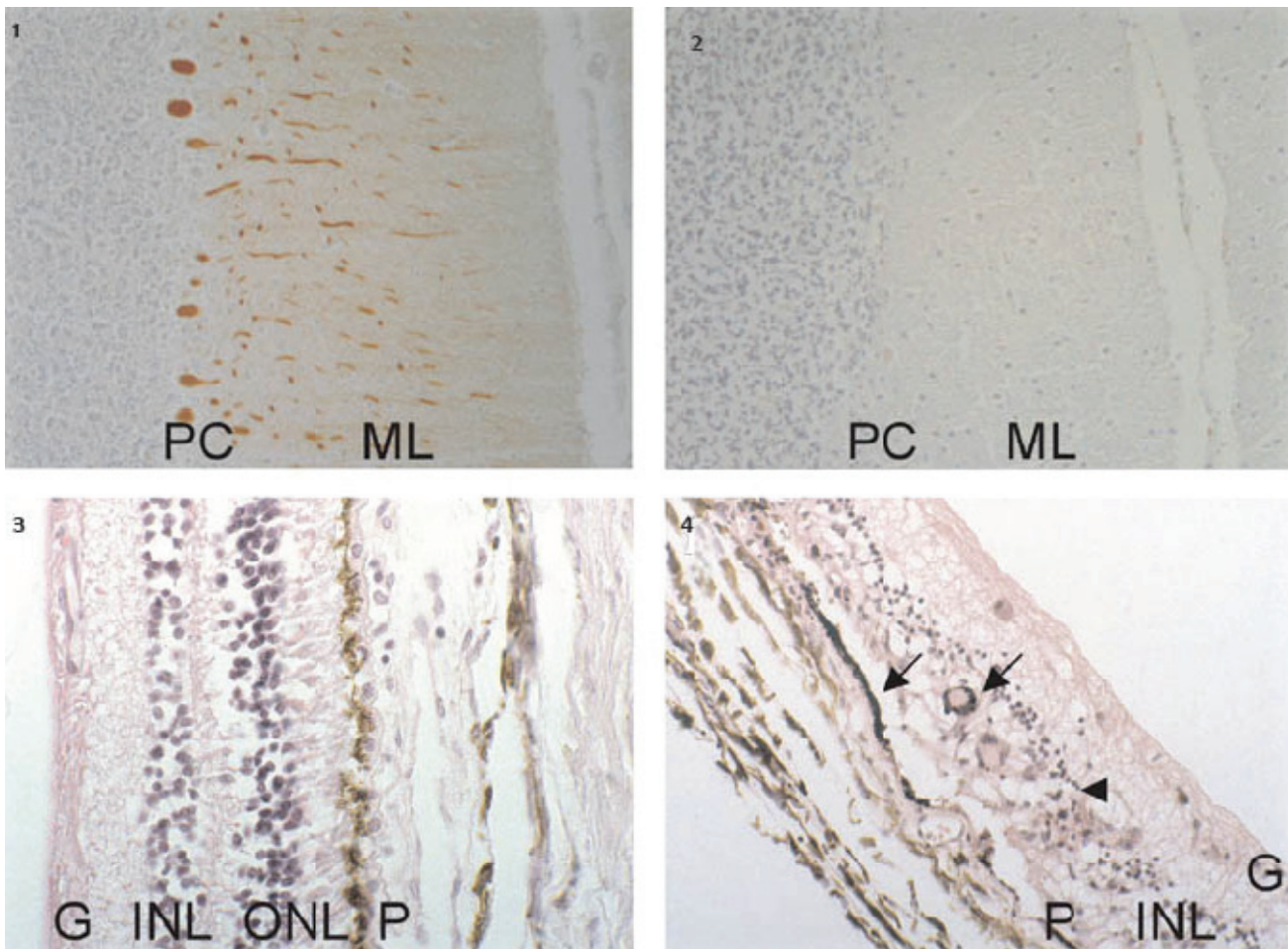


Figure 13: Neuropathologie d'un patient SCA7.

Des coupes histologiques du cortex cérébelleux d'un individu normal (1) ou d'un patient atteint de la maladie SCA7 (2) ont été marquées avec un anticorps dirigé contre la calbicine pour visualiser les cellules de Purkinje. La présence de cet anticorps dans les cellules est révélée à la peroxydase (brun). Dans le cervelet normal, les corps cellulaires des cellules de Purkinje (PC) sont fortement marqués, ainsi que leurs dendrites dans la couche moléculaire (ML). Le cervelet du patient SCA7 montre une perte dramatique des cellules de Purkinje.

Des coupes histologiques de rétines d'un individu normal (3) et d'un patient SCA7 (portant une expansion CAG répétée 55 fois) (4), sont contrastées classiquement. La rétine normale montre une organisation caractéristique avec les différentes couches cellulaires : l'épithélium pigmentaire (P), la couche des noyaux des photorécepteurs (ONL), la couche des neurones amacriques et bipolaires (INL) et les neurones ganglionnaires (G). La rétine du patient SCA7 est très sévèrement endommagée par la dégénérescence quasi-complète des noyaux et des segments des photorécepteurs. L'INL apparaît désorganisée (tête de flèche) et les pigments de mélanine migrent dans l'épaisseur de la rétine atrophiée. (Michalik et al., 2004)

dégénérescence maculaire pigmentaire de la rétine conduisant progressivement à la cécité. La mort neuronale atteint principalement le cervelet avec les cellules de Purkinje, les neurones du noyau denté et les neurones de l'olive inférieure ainsi que la rétine avec les photorécepteurs (Michalik et al., 2004). La rétinopathie des patients SCA7 est une dystrophie de type cônes-bâtonnets (Hamel, 2007).

La prévalence pour la maladie SCA7 est de l'ordre de 0.8 à 3.5 sur 100 000 et l'âge moyen de déclaration des symptômes se situe généralement autour de 30 ans, mais peut varier fortement de quelques mois à plus de 70 ans. Les cas infantiles débutent en dessous de l'âge de 2 ans et le décès des patients a lieu au bout de quelques mois. Ces patients portent des répétitions supérieures à 150 CAG. Les cas juvéniles débutent au dessous de l'âge de 10 ans et le décès des patients a lieu au bout de quelques années. Ces patients portent des répétitions supérieures à 70 CAG. Les patients qui déclarent la maladie de façon précoce ont tendance à présenter les anomalies visuelles avant l'ataxie. Les patients SCA7 juvéniles et infantiles montrent une progression très rapide des symptômes ainsi qu'un phénotype plus large de la déficience neuronale. Dans les cas infantiles, les tissus neuronaux et non-neuronaux sont atteints mais il n'y a quasiment pas de perte cellulaire probablement lié à l'évolution trop rapide de la pathologie (Benton et al., 1998).

L'anticipation clinique est très marquée dans cette maladie. La maladie se déclare 20 ans plus tôt chez les enfants que chez leurs parents. Cette forte anticipation clinique s'explique par une forte instabilité intergénérationnelle de la répétition CAG. Cette répétition est connue pour être la plus instable de toutes les répétitions CAG codantes et augmente lors de chaque transmission (van de Warrenburg et al., 2001). Cependant, l'instabilité de la répétition SCA7 dépend du contexte génomique. Des travaux ont montré l'instabilité de la répétition en comparant des souris SCA7 portant la répétition dans son contexte génomique avec des souris transgéniques qui exprime le cDNA de l'ataxine 7 polyQ. Plusieurs lignées correspondantes à chaque construction ont été analysées et mettent en évidence que la répétition SCA7 n'est instable que dans son contexte génomique (Libby et al., 2003).

L'ataxine 7 qui se retrouve mutée chez les patients SCA7 est une protéine de 892 acides aminés (David et al., 1997). Cette protéine est une sous-unité du complexe co-activateur transcriptionnel SAGA (*Spt, Ada, GCN5, Acetyltransferase coactivator complex*) (Helmlinger et al., 2004b) (voir III.2). L'ataxine 7, présente une expansion polyQ dans sa

partie N-terminale entre les codons 30 et 39. Des répétitions supérieures à 37 triplets CAG conduisent à un phénotype SCA7, alors que les individus normaux ont des répétitions comprises entre 7 et 34 triplets CAG. L'ataxine 7 peut interagir avec d'autres protéines via des domaines de fixation SH3 (Lebre et al., 2001). Cette protéine est nucléaire et porte un signal de localisation nucléaire entre les acides aminés 378 et 394 (Kaytor et al., 1999). L'ataxine 7 est remarquablement conservée entre l'homme et la souris avec 88,7% d'identité (Strom et al., 2002).

Comme dans les autres maladies à expansion polyQ, l'ataxine 7 mutée s'agrège sous forme d'inclusions nucléaires dans les neurones. Ces inclusions nucléaires sont présentes à la fois dans les régions sévèrement affectées telles que le noyau des photorécepteurs ou de l'olive inférieure mais aussi dans les régions épargnées comme le cortex cérébral. Par contre, les inclusions nucléaires ne sont pas visibles dans les cellules de Purkinje du cervelet, même si ces neurones sont sévèrement atteints chez les patients SCA7. La formation des inclusions nucléaires n'est pas nécessaire pour induire la mort neuronale et la dégénérescence dans les maladies à expansion polyQ. Les inclusions nucléaires dans les patients SCA7 ne présentent que des fragments de la partie N-terminale de la protéine. Il existe donc une protéolyse de l'ataxine 7 mutée, suggérant que le clivage protéolytique pourrait faciliter la formation des agrégats. Ce clivage est observé dans tous les modèles transgéniques SCA7 générés et dans toutes les régions du cerveau présentant des inclusions nucléaires (Yvert et al., 2001). De plus, les inclusions nucléaires ne sont pas détectables avec un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de l'ataxine 7 dans le cerveau des patients SCA7 (Zander et al., 2001). Des travaux réalisés sur des cellules en culture confirment le rôle de la protéolyse dans la formation des inclusions nucléaires car l'ataxine 7 peut être clivée par la caspase 7 au niveau de sites spécifiques. Lorsque ces sites de clivage sont mutés, l'ataxine 7 devient résistante à la caspase 7. L'expression de la protéine ataxine 7 polyQ résistante à la caspase 7 dans des cellules en culture, réduit la formation des inclusions nucléaires (Young et al., 2007).

L'ataxine 7 portant l'expansion polyQ s'associe au complexe co-activateur de transcription SAGA et la maladie SCA7 s'accompagne d'anomalies transcriptionnelles reproductibles entre les différents modèles étudiés (Helmlinger et al., 2004b; La Spada et al., 2001; Yoo et al., 2003). L'analyse transcriptomique des différents modèles a mis en évidence une diminution de l'expression des gènes fortement transcrits, avec en particulier la perte des protéines responsables de la transduction du signal lumineux. La maladie SCA7 constitue

un modèle d'étude pour tenter de comprendre comment une protéine polyQ, à l'intérieur d'un complexe de co-activation transcriptionnel, peut altérer l'expression des gènes.

2) Le complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyle transferase) :

L'assemblage ordonné du complexe de pré-initiation (PIC) est un pré-requis indispensable pour la transcription des gènes par l'ARN polymérase II. La présence de co-activateurs ou de co-répresseurs transcriptionnels est nécessaire pour faire le lien entre la machinerie de base et les facteurs de transcription.

Le complexe SAGA est un complexe multi-protéique de co-activation qui facilite l'initiation de la transcription soit par une interaction directe avec les facteurs généraux de transcription ou l'ARN polymérase II, soit indirectement en modifiant la structure de la chromatine. Ce complexe coordonne plusieurs modifications post-traductionnelles des histones avec notamment une activité histone acétyl-transférase (HAT) et une activité de déubiquitinylation des histones. Ce complexe d'environ 2MDa, comporte plus de 20 sous-unités différentes, et il est remarquablement conservé entre la levure, la drosophile et les mammifères.

Le complexe SAGA de levure (ySAGA) comprend l'enzyme GCN5 (*General Control Nonderepressible 5*) qui porte l'activité HAT et l'enzyme Ubp8 (*ubiquitin-specific-processing protease 8*) qui porte l'activité de déubiquitinylation des histones. Ces sous-unités catalytiques se retrouvent dans un grand complexe constitué de protéines de la famille Ada (*adaptator*) et Spt (*suppressor of ty element*) accompagnées de diverses protéines TAFs qui sont des facteurs associés à la protéine TBP (*Tata-Binding Protein*) (Baker and Grant, 2007). Ce complexe ySAGA partage un haut degré de similarité avec les complexes humains TFTC/STAGA/PCAF renommés complexe SAGA humain (hSAGA) pour plus de simplicité. En effet, les complexes ySAGA et hSAGA partagent la même composition en sous-unité. On retrouve chez l'homme l'activité HAT portée par la sous-unité GCN5 ainsi que l'activité de déubiquitinylation des histones portée par la sous-unité USP22 (*ubiquitin-specific-peptidase 22*) qui est l'homologue d'Ubp8 (Nagy and Tora, 2007).

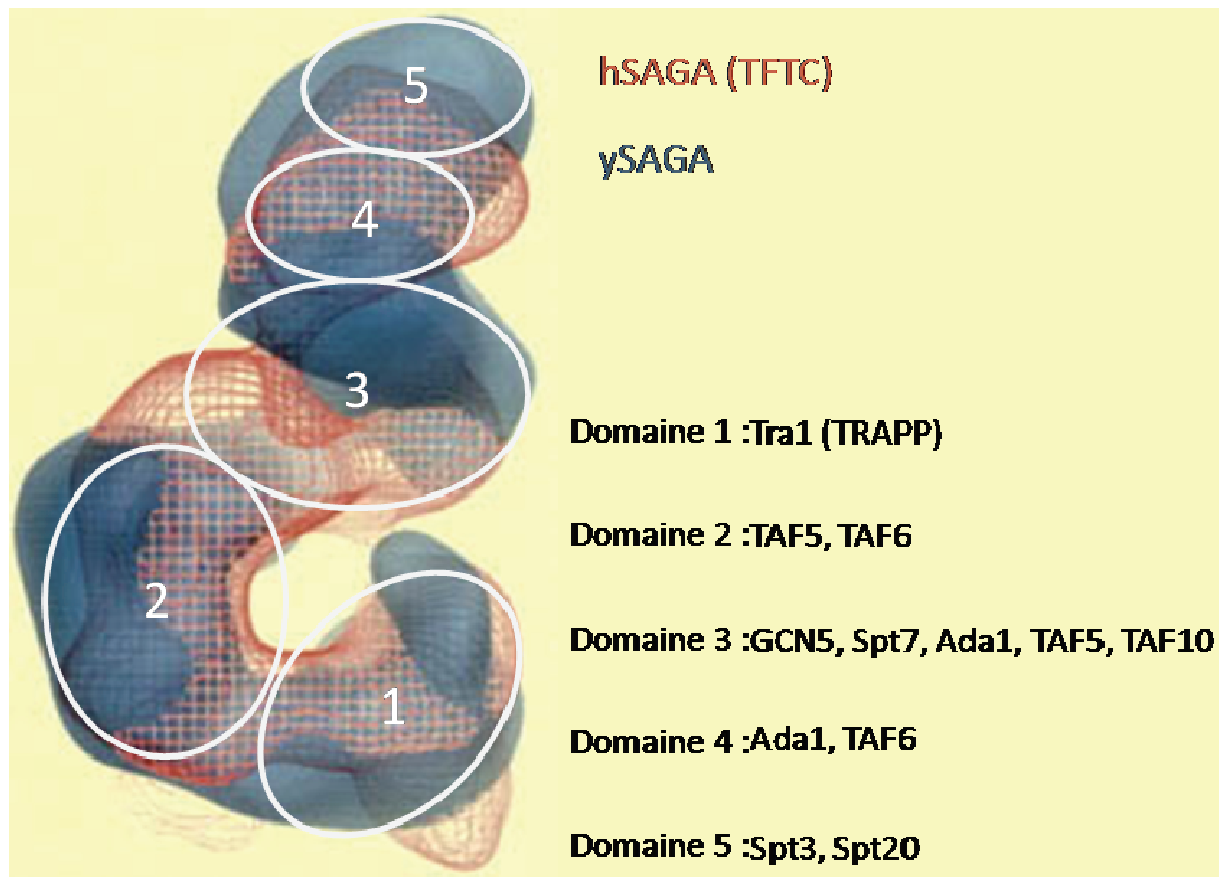


Figure 14: Structure tridimensionnelle des complexes ySAGA et hSAGA.

La structure 3-D des complexes est résolue par microscopie électronique avec une résolution de 30 Å. La superposition des complexes hSAGA (rouge) et ySAGA (bleu), met en évidence 5 domaines globulaires (cercles blancs). Les différentes sous-unités présentes dans ces domaines ont pu être identifiées par immunomarquages. Le positionnement de l'ATXN7 dans le complexe n'est pas encore déterminé (d'après (Nagy and Tora, 2007)).

a) La structure tridimensionnelle des complexes γ SAGA et hSAGA :

Les travaux réalisés par Patrick Schultz au sein du laboratoire, ont permis de déterminer la structure tridimensionnelle des complexes γ SAGA et hSAGA (TFTC) (Brand et al., 1999; Wu et al., 2004) (**figure 14**). Pour ce faire des particules différemment orientées sont contrastées par coloration négative puis observées au microscope électronique. La reconstruction des images donne une structure 3-D à 30 Å de résolution qui révèle une forme allongée des complexes avec une taille de 160 Å. Ces 2 complexes consistent en 5 sous-domaines de 70 à 100 Å de diamètre séparés par des canaux accessibles aux solvants. La superposition des structures des complexes γ SAGA/hSAGA indique un haut degré de conservation structurale en taille et en forme du complexe SAGA en accord avec une composition similaire en sous-unités (Timmers and Tora, 2005). Les différents domaines de SAGA sont cartographiés par immuno-localisation des différentes sous-unités en microscopie électronique. Le domaine I contient la sous-unité Tra1/TRRAP qui semble constituer la surface d'interaction avec les activateurs transcriptionnels. Les domaines II, III et IV contiennent différents TAFs ainsi que Taf5/TAF5L connue pour jouer un rôle architectural dans la structure des complexes. Dans le domaine III, sont présentes les 2 sous-unités possédant un bromodomaine chez la levure : GCN5 et Spt7 et chez l'humain : GCN5 et SPT7L, mais dans le complexe hSAGA seule la sous-unité GCN5 présente un bromodomaine. Les résultats issus d'études biochimiques et d'interactions génétiques suggèrent que les sous-unités Ada2/ADA2b et Ada3/ADA3 pourraient co-localiser dans le domaine III. Le domaine III, n'est pas seulement un domaine central architectural mais contient aussi l'activité HAT. Le domaine V a une structure 3-D variable et semble être le domaine le plus flexible contenant les sous-unités Spt3/SPT3, Spt20/SPT20 et probablement Spt8 dont l'homologue humain n'est pas encore déterminé. Ce domaine, définit le module d'interaction avec la protéine TBP (Sermwittayawong and Tan, 2006). Les complexes γ SAGA et hSAGA partagent de fortes similarités en composition de leurs sous-unités, en structure et en fonction. Cependant, l'architecture exacte des complexes demeure encore incomplète, notamment les sous-unités Ubp8/USP22, Sus1/ENY2, Sgf11/ATXN7L3 et Sgf73/ATXN7 connues pour jouer un rôle important de déubiquitinylation des histones mais dont la localisation précise à l'intérieur du complexe reste à déterminer.

b) Les activités catalytiques du complexe SAGA :

L'organisation de la chromatine joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes et les modifications post-traductionnelles des histones sont étroitement corrélées à un état transcriptionnel donné. Le complexe SAGA présente deux activités catalytiques distinctes qui lui permettent de modifier la chromatine et de jouer un rôle crucial dans la régulation de la transcription. Des analyses à l'échelle du génome réalisées chez la levure par immuno-précipitation de la chromatine et par transcriptomique, suggèrent que 10% des gènes sont spécifiquement régulés par SAGA, et sont préférentiellement des gènes induits en réponse aux stress environnementaux (Huisinga and Pugh, 2004; Lee et al., 2000).

L'activité HAT de la sous-unité GCN5 :

La protéine GCN5 est la première enzyme portant une activité histone acétyltransférase à avoir été identifiée (Brownell et al., 1996). Cette enzyme est hautement conservée au cours de l'évolution à la fois au niveau de sa structure mais aussi au niveau de sa fonction spécifique (Candau and Berger, 1996). Des études génétiques montrent que cette enzyme est indispensable pour le développement de l'embryon de souris. La perte de fonction de GCN5 entraîne la létalité embryonnaire. A 8.5 jours de vie embryonnaire, les embryons sont petits et présentent des défauts importants du mésoderme pré-somatique. Ces défauts sont associés à une augmentation de l'apoptose des cellules mais ne sont pas la conséquence d'une dérégulation généralisée de la transcription des gènes (Xu et al., 2000). Par ailleurs, les embryons de souris qui expriment une sous-unité GCN5 inactive (incapable d'acétyler les histones), survivent plus longtemps que les embryons dépourvus de GCN5 et ne montrent pas d'augmentation de l'apoptose de leurs cellules (Bu et al., 2007). Ces données suggèrent que GCN5 possède des fonctions importantes pendant l'embryogénèse qui sont indépendantes de son activité HAT.

In vitro, l'enzyme GCN5 recombinante de levure n'est pas capable d'acétyler les nucléosomes mais au contraire assure l'acétylation des histones recombinantes libres, préférentiellement l'extrémité N-terminale de l'histone H3. Une fois incorporée dans le complexe γ SAGA, la sous-unité GCN5 peut alors acétyler les nucléosomes (Grant et al., 1997). L'incorporation de la sous-unité GCN5 dans le complexe SAGA permet également d'élargir la spécificité de substrat de l'enzyme, assurant l'acétylation des lysines 9, 14, 18, 23

de l'histone H3 ainsi que l'acétylation des histones H4 et H2B (Guelman et al., 2006). La sous-unité GCN5 est indispensable au complexe SAGA pour assurer l'acétylation de sites spécifiques de la chromatine mais il est très probable que GCN5 puisse aussi acétyler d'autres substrats (Sterner and Berger, 2000).

L'acétylation des histones est impliquée dans différents mécanismes qui jouent un rôle important lors de l'initiation de la transcription. Des expériences réalisées chez la levure ont montré que l'acétylation des histones par la sous-unité GCN5 déplace les nucléosomes au niveau de la région promotrice des gènes pendant l'activation de la transcription (Barbaric et al., 2001; Filetici et al., 1998). De plus les histones acétylées aident au recrutement de l'ARN polymérase II et des co-activateurs de transcription aux niveaux des promoteurs des gènes (Geng and Laurent, 2004; Qiu et al., 2004).

L'acétylation des histones semble aussi jouer un rôle lors de l'élongation de la transcription. Chez la levure, les histones localisées dans les séquences codantes des gènes présentent un niveau d'acétylation basal assez élevé. La perte de fonction de la sous-unité GCN5 s'accompagne d'une hypoacétylation des histones de la région codante et d'une inhibition de la transcription (Kristjuhan et al., 2002). De plus, la présence de l'ARN polymérase est très sévèrement réduite au niveau des séquences codantes des gènes lorsque la sous-unité GCN5 est absente, suggérant un rôle de SAGA dans l'élongation de la transcription (Govind et al., 2005). Des travaux plus récents réalisés chez la levure viennent renforcer ce rôle du complexe SAGA. Ces résultats mettent en évidence une association du complexe avec les séquences codantes des gènes pendant la transcription. Cette association dépend de la phosphorylation de la sérine 5 du CTD de l'ARN polymérase II. Ces données suggèrent que le complexe SAGA pourrait interagir directement avec l'ARN polymérase II pendant l'élongation de la transcription (Govind et al., 2007).

Le complexe SAGA, par l'intermédiaire de sa sous-unité GCN5, accomplit d'importantes fonctions. GCN5 par son activité catalytique, augmente le niveau d'acétylation de l'histone H3 et stimule la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 au niveau des séquences codantes des gènes transcrits. L'activité HAT de GCN5 entraîne l'expulsion des nucléosomes au niveau des gènes transcrits et favorise la processivité de l'ARN polymérase II (Govind et al., 2007). L'ensemble de ces données suggère un mécanisme par lequel la présence du complexe SAGA au niveau des séquences transcrites facilite le remodelage de la chromatine

favorisant ainsi l'accessibilité pour la machinerie d'élongation de la transcription (Rodriguez-Navarro, 2009).

- L'activité de déubiquitylation des histones :

Différentes études ont mis en évidence que la lysine 123 située dans la partie C-terminale de l'histone H2B est ubiquitylée et environ 2% des histones H2B sont ubiquitylées dans les cellules de mammifères. Cette ubiquitylation est notamment indispensable à la méthylation de l'histone H3 et donc requise pour une expression optimale des gènes (Weake and Workman, 2008).

Les premiers résultats mettant en évidence le rôle de déubiquitylation des histones par le complexe SAGA sont obtenus chez la levure (Henry et al., 2003). Ces travaux montrent que la protéine Ubp8 est responsable de la déubiquitylation de l'histone H2B *in vivo* et *in vitro* lorsque l'enzyme est associée au complexe SAGA. Cette enzyme est présente au niveau du promoteur des gènes lors de l'activation de la transcription et la déubiquitylation de l'histone H2B régule la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (Daniel et al., 2004; Henry et al., 2003). Des expériences de mutagenèse ont permis d'identifier un domaine en doigt de Zinc porté par l'enzyme Ubp8 jouant un rôle critique pour l'association de la sous-unité avec le complexe SAGA. De plus, le domaine en doigt de zinc d'Ubp8 est nécessaire pour son activité enzymatique. Les auteurs de ces travaux ont pu aussi identifier une nouvelle sous-unité du complexe SAGA : la protéine Sgf11. Cette nouvelle sous-unité de 11KDa est indispensable pour l'association de l'enzyme Ubp8 avec le complexe SAGA et pour l'activité de déubiquitylation de l'histone H2B.

Différentes approches montrent que les fonctions de Ubp8 et Sgf11 sont reliées entre-elles et peuvent être distinctes du complexe SAGA. Les résultats obtenus indiquent que Ubp8 et Sgf11 constituent un nouveau module à l'intérieur du complexe SAGA. Ce module correspond au module de déubiquitylation des histones (DUBm) (Ingvarsdottir et al., 2005; Lee et al., 2005). Des résultats obtenus chez la levure viennent compléter les informations concernant la composition du DUBm. En effet, la petite sous-unité Sus1 du complexe SAGA forme un complexe trimérique stable avec les sous-unités Ubp8 et Sgf11. La sous-unité Sus1 est aussi indispensable pour la déubiquitylation de l'histone H2B et la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3. Cette sous-unité est connue pour jouer un rôle important dans l'export nucléaire des ARNs messagers. De façon surprenante, la perte de fonction de la

sous-unité Sgf11 entraîne des défauts d'export des messagers comparables aux défauts observés dans les levures qui ont perdu la sous-unité Sus1. Ces résultats suggèrent que le DUBm pourrait constituer un lien entre la transcription des gènes dépendants de SAGA et l'export nucléaire de leurs messagers (Kohler et al., 2006).

Plus récemment, des travaux réalisés sur des cellules humaines ont permis d'identifier trois nouvelles sous-unités du complexe hSAGA. Ces sous-unités sont USP22, ATXN7L3 et ENY2 qui sont respectivement les orthologues humain des sous-unités Ubp8, Sgf11 et Sus1 chez la levure. *In vitro*, ces trois protéines forment un module à l'intérieur du complexe hSAGA qui lui permet de déubiquitinyler la lysine 123 de l'histone H2B et la lysine 119 de l'histone H2A (Zhao et al., 2008). De la même façon, des expériences réalisées chez la drosophile ont permis d'identifier la protéine Nonstop qui est l'homologue de l'enzyme Ubp8 de levure. Cette protéine présente une activité de déubiquitinylation des histones et peut substituer l'activité d'Ubp8 chez la levure. La protéine Nonstop fait partie intégrante du complexe SAGA de la drosophile (dSAGA), au sein duquel se trouve aussi la sous-unité Sgf11 et e(y)2 qui sont respectivement les homologues des protéines Sgf11 et Sus1 de levure. La perte de fonction de la protéine Nonstop chez la drosophile entraîne des défauts de connectivité neuronale au niveau des photorécepteurs. La perte de fonction de la sous-unité Sgf11 est responsable de défauts similaires. Ces résultats suggèrent que la sous-unité Nonstop associée au complexe dSAGA joue un rôle essentiel dans la régulation des connectivités neuronales dans le système visuel de la drosophile (Weake et al., 2008).

L'activité de déubiquitinylation des histones portée par le complexe SAGA relève de l'action spécifique d'un sous-module de déubiquitinylation. Des travaux réalisés chez la levure ont permis de montrer que la sous-unité Sgf73 du complexe γ SAGA assure l'association du complexe avec le DUBm (Ubp8-Sgf11-Sus1). En effet, des expériences de copurification montrent que les complexes SAGA dépourvus de la sous-unité Sgf73 perdent aussi les sous-unités Ubp8 et Sus1. La perte de fonction de la sous-unité Sgf73 conduit à une augmentation globale du niveau de H2B ubiquitinylée et cette augmentation est similaire à celle observée dans les levures dépourvues de la sous-unité Ubp8. Sgf73 est donc nécessaire pour l'activité enzymatique de la sous-unité Ubp8 *in vivo*. Cette sous-unité joue un rôle clé dans la composition du DUBm permettant d'ancrer la sous-unité catalytique Ubp8 fonctionnelle au complexe SAGA (Kohler et al., 2008). Des expériences menées dans des cellules humaines ont permis de mettre en évidence 2 sous-unités du complexe hSAGA

capables d'interagir avec le DUBm : TAF5L et ATXN7. Ces sous-unités participent à l'association du DUBm avec le complexe hSAGA. La protéine ATXN7 est l'homologue de la sous-unité Sgf73 du complexe SAGA de levure (Zhao et al., 2008).

Ces différentes expériences suggèrent que le sous-module de déubiquitinylation associé au complexe SAGA, pourrait aussi avoir un rôle alternatif indépendant de SAGA. Cette hypothèse est démontrée par différentes observations. La perte de la sous-unité Spt20 du complexe γ SAGA entraîne une sévère altération de l'intégrité du complexe γ SAGA dans les levures. Cependant, l'accumulation d'histone H2B ubiquitinylée observée dans ces cellules est moins importante que l'accumulation d'histone H2B ubiquitinylée observée dans les cellules dépourvues d'Ubp8. Ceci suggère qu'une activité résiduelle du sous-module de déubiquitinylation pourrait exister dans les cellules déficientes en complexe γ SAGA (Henry et al., 2003). Des expériences de co-purification du complexe γ SAGA réalisées dans des conditions de concentrations élevées en sels, montrent une dissociation d'une partie des sous-unités du complexe alors que l'association des sous-unités Ubp8-Sus1-Sgf11-Sgf73 est maintenue (Kohler et al., 2008). De plus, des expériences réalisées dans des cellules humaines mettent en évidence le recrutement du complexe hSAGA au niveau du promoteur des gènes induits par un stress. Cependant, des analyses de la cinétique de fixation du complexe hSAGA et du DUBm permettent de mettre en évidence des différences de recrutement, suggérant qu'une forme libre du DUBm existe dans ces cellules (Nagy et al., 2009). Pour l'heure, seules des preuves indirectes nous permettent de suggérer l'existence d'un DUBm indépendant du complexe SAGA. Le DUBm seul est incapable d'ubiquitinyler les histones *in vitro* et nécessite la présence du complexe SAGA ce qui suggère que de nouveaux partenaires capables de s'associer au DUBm restent encore à identifier.

Le DUBm joue aussi un rôle crucial pour le couplage de la transcription des gènes et l'export nucléaire des ARNs messagers. Dans la levure, la sous-unité Sgf73 permet le recrutement stable au niveau du complexe γ SAGA de composants du complexe d'export des ARNs messagers et la perte de fonction de Sgf73 entraîne des défauts d'export des messagers vers l'extérieur du noyau (Kohler et al., 2008).

La sous-unité Sus1 du complexe γ SAGA participe également à l'export des ARNs messagers et assure le repositionnement des gènes actifs à la périphérie nucléaire (Cabal et al., 2006). Sus1 est à la fois une sous-unité du complexe γ SAGA mais aussi une sous-unité du complexe d'export des ARNs messagers (Rodriguez-Navarro et al., 2004). Des expériences

d'immuno-précipitation de la chromatine de levure démontrent que la sous-unité Sus1 est associée aux séquences régulatrices situées en amont ainsi qu'aux régions codantes des gènes. Cette sous-unité en association avec ces différents complexes joue ainsi un rôle pendant l'initiation de la transcription mais aussi pendant l'élongation. Des expériences de perte de fonction montrent que l'absence de la sous-unité Ubp8 du complexe SAGA empêche l'association de Sus1 aux séquences régulatrices et la perte de fonction de sous-unités du complexe d'export des messagers empêche partiellement l'association de Sus1 avec les séquences codantes des gènes.

La sous-unité Sgf73 du complexe SAGA est nécessaire pour l'association de Sus1 avec le complexe SAGA mais aussi avec le complexe d'export des ARNs messagers. La perte de fonction de Sgf73 réduit dramatiquement l'association de Sus1 avec les séquences codantes et les séquences régulatrices des gènes. La sous-unité Sus1 joue un rôle-clé de coordination de la transcription des gènes, avec l'export des messagers, en travaillant à l'interface entre le complexe SAGA et le complexe d'export des ARNs messagers (Pascual-Garcia et al., 2008).

Une preuve supplémentaire du rôle du complexe SAGA dans l'export nucléaire des ARNs messagers est apportée par la sous-unité Sgf11. En effet, chez la levure, la perte de fonction de la sous-unité Sgf11 augmente les défauts d'export des ARNs messagers observés dans les levures dépourvues de la sous-unité Sus1 (Kohler et al., 2006). Le complexe SAGA avec son DUBm constitue un lien physique entre les activateurs fixés aux séquences promotrices et la machinerie d'export des ARNs messagers, mais le mécanisme moléculaire sous-jacent reste encore mal connu.

Le complexe SAGA associé à son DUBm joue un rôle important dans de nombreux mécanismes *in vivo*. Des expériences réalisées chez la drosophile ont pu mettre en évidence que le complexe dSAGA, via notamment sa sous-unité Nonstop, joue un rôle dans le transport axonal le long des terminaisons nerveuses des photorécepteurs (Weake et al., 2008). Différentes études réalisées sur des cellules humaines suggèrent que le complexe hSAGA joue aussi un rôle dans les mécanismes de tumorigénèse chez l'homme. En particulier, la sous-unité USP22 peut être recrutée au niveau de gènes spécifiques par des activateurs oncogéniques pour réguler la transcription. La perte de fonction d'USP22 dans les cellules humaines, compromet les fonctions des activateurs oncogéniques et entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Ces résultats établissent un lien biochimique direct

entre les fonctions du complexe hSAGA et les mécanismes cancéreux chez l'homme (Zhang et al., 2008). Enfin, des travaux réalisés dans les cellules humaines et les cellules de souris, ont permis de mettre en évidence que la sous-unité Usp22 associée au complexe hSAGA joue un rôle crucial dans le maintien et le renouvellement des télomères dans la cellule et que la sous-unité GCN5 peut aussi jouer un rôle dans l'association du DUBm avec le complexe hSAGA (Atanassov et al., 2009).

Enfin, pour simplifier, les principales activités catalytiques du complexe hSAGA sont résumées dans **le tableau 1**.

Sous-unités du complexe hSAGA	Activités catalytiques	Substrats	Rôles dans la cellule
GCN5	HAT	H3 / H4 / H2B	Initiation / élongation de la transcription
USP22 ATXN7L3 ENY2	DUB	H2BK123 H2AK119	Couplage entre la transcription et l'export des ARN messagers

Tableau 1 : Les principales activités catalytiques du complexe hSAGA

c) L'influence de l'ATXN7 polyQ au niveau du complexe SAGA :

Les défauts de l'activité transcriptionnelle sont une caractéristique commune des maladies à expansion polyglutamine. Des analyses transcriptomiques, réalisées sur des souris transgéniques modèles pour la maladie SCA7, ont mis en évidence la perte de l'expression d'un nombre important de gènes notamment les gènes impliqués dans les fonctions de phototransduction du signal lumineux (Abou-Sleymane et al., 2006).

Des études réalisées chez la levure et dans les cellules humaines, démontrent que l'ATXN7 polyQ est bien incorporée dans le complexe SAGA et que cette sous-unité mutée pourrait inhiber l'activité HAT du complexe. Des travaux réalisés dans des cellules de levures montrent que la sous-unité Sgf73 qui est l'homologue de l'ATXN7 humaine, est indispensable à l'intégrité du complexe γ SAGA et l'absence de Sgf73 peut être compensée par la sous-unité ATXN7. L'incorporation de l'ATXN7 polyQ dans le complexe SAGA de levure

assure la formation d'un complexe γ SAGA non fonctionnel, dépourvu des sous-unités jouant un rôle critique pour l'activité HAT. *In vitro*, ce complexe γ SAGA polyQ purifié ne peut acétyler ni les histones libres, ni les histones nucléosomiques (McMahon et al., 2005). Des expériences réalisées sur des cellules humaines en culture qui expriment de façon stable l'ATXN7 polyQ, montrent que cette sous-unité polyQ est bien incorporée au complexe hSAGA mais que l'association avec d'autres sous-unités du complexe est diminuée. L'incorporation de l'ATXN7 polyQ diminue de façon très importante la capacité de la sous-unité GCN5 d'acétyler l'histone H3, suggérant que l'incorporation de l'ATXN7 polyQ vient inhiber l'activité HAT du complexe hSAGA (McMahon et al., 2005).

Des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine réalisées sur des rétines de souris transgéniques modèles pour la maladie SCA7, mettent en évidence une hypo-acétylation des histones H3 dans les régions promotrices des gènes régulés par le facteur de transcription CRX (*cone-rod-homeobox*). Le facteur de transcription CRX est un activateur spécifique des gènes des photorécepteurs connu pour interagir avec le complexe hSAGA. L'immuno-précipitation de la chromatine des rétines SCA7, par un anticorps dirigé contre le facteur de transcription CRX, révèle une diminution importante du niveau d'acétylation de l'histone H3. Ces résultats suggèrent que l'ATXN7 polyQ une fois incorporée dans le complexe SAGA empêche la formation d'un complexe HAT fonctionnel (Palhan et al., 2005).

Enfin, une étude réalisée sur des souris transgéniques modèles pour la maladie SCA7 s'est intéressée à la composition du complexe SAGA *in vivo* et à son activité HAT en présence de l'ATXN7 polyQ (Helmlinger et al., 2006a). Des expériences d'immuno-précipitations, réalisées sur des extraits totaux de rétine, permettent de purifier toutes les sous-unités du complexe SAGA et montrent que l'incorporation de l'ATXN7 polyQ dans le complexe SAGA ne modifie pas la composition du complexe. Les complexes HAT ainsi purifiés ont pu être testés *in vitro* en présence d'histones libres où d'histones nucléosomiques. Le complexe SAGA polyQ issu des souris SCA7 présente une activité HAT normale, acétylant préférentiellement l'histone H3 et les profils d'acétylation du complexe SAGA polyQ et SAGA normal sont identiques. Ce résultat suggère que l'ATXN7 polyQ ne modifie pas l'activité HAT de la sous-unité GCN5 *in vitro*. Cependant, *in vivo*, dans les souris transgéniques SCA7 une partie des gènes se retrouve transcriptionnellement sous-régulée. Par des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine, les auteurs ont quantifié le recrutement du complexe SAGA au niveau des gènes spécifiquement sous-régulés. Leurs résultats montrent

une augmentation du recrutement du complexe SAGA polyQ au niveau des gènes sous-régulés mais qu'il n'y a aucune modification du recrutement du complexe SAGA polyQ au niveau des gènes régulés spécifiquement par le facteur de transcription CRX. Le niveau d'acétylation des lysines 9 et 14 de l'histone H3 des régions promotrices des gènes sous-régulés a été quantifié et met en évidence de façon surprenante, une hyperacétylation de l'histone H3 au niveau des régions promotrices des gènes spécifiquement sous-régulés. Par contre, le profil d'acétylation de l'histone H3 n'est pas modifié au niveau du promoteur des gènes régulés par le facteur de transcription CRX. L'incorporation de l'ATXN7 polyQ ne modifie pas la composition du complexe SAGA et n'affecte pas l'activité HAT de la sous-unité GCN5. Cependant, les travaux de Helmlinger montrent que le recrutement de SAGA est dérégulé sur de larges régions génomiques entraînant une hyperacétylation de l'histone H3 associée à une dérégulation de la transcription (Helmlinger et al., 2006a).

L'ensemble de ces données démontre que l'ATXN7 polyQ vient s'associer au complexe SAGA mais le rôle de cette sous-unité polyQ sur le complexe reste encore controversé et semble être dépendant du modèle d'étude choisi. Des expériences complémentaires doivent être réalisées pour venir conforter l'une ou l'autre hypothèse. Une partie de mon projet de recherche a pour but de mieux comprendre l'influence de l'ATXN7 polyQ *in vivo* afin de déterminer l'origine du phénotype rétinien SCA7.

IV. La rétine et les photorécepteurs :

La rétine de souris, et plus particulièrement les noyaux des bâtonnets, constituent mon modèle d'étude pour corrélérer *in vivo* l'organisation de la chromatine avec l'activité transcriptionnelle. Cette étude a notamment pour but de comprendre le phénotype rétinien induit par l'ATXN7 polyQ.

1) La rétine:

La rétine fait partie intégrante du système nerveux central. La rétine de souris adulte se divise en rétine neurale et en épithélium pigmentaire. L'épithélium pigmentaire est constitué des cellules épithéliales contenant la mélanine. La rétine neurale est constituée de

six différents types de neurones et d'un type de cellule gliale, les cellules de Müller. De part sa structure et son organisation, la rétine est un tissu particulièrement propice aux analyses histologiques et biochimiques.

a) Organisation générale :

Chaque type cellulaire présente une localisation distincte et précise faisant de la rétine un tissu hautement organisé sous forme de couches cellulaires. De façon générale, les couches fortement contrastées contiennent les corps cellulaires alors que les couches plexiformes peu contrastées contiennent les axones et les dendrites. La rétine est constituée de trois couches de noyaux séparées par deux couches synaptiques (**figure 15**).

La couche de noyaux externes est composée des photorécepteurs qui sont les neurones sensibles à la lumière. Il y a deux types de photorécepteurs : - Les cônes, sont responsables de la vision diurne, de l'acuité visuelle et de la visualisation des formes, des couleurs et des contrastes. – Les bâtonnets sont responsables de la vision nocturne. Chez les vertébrés, la majorité des photorécepteurs sont des bâtonnets représentant plus de 70% des cellules totales de la rétine (Jeon et al., 1998). Les cônes et les bâtonnets sont présents dans la rétine à l'exception de la macula qui est composée uniquement de cônes. La densité des cônes dans la macula varie en fonction des différentes espèces. Chez la souris, la macula n'existe pas et plus de 97% des photorécepteurs présents dans la rétine sont des bâtonnets.

Les cellules photoréceptrices ont une structure particulière constituée d'un corps cellulaire présentant les segments internes (IS) et externes (OS) ainsi qu'un petit noyau (<5µm). L'ensemble des noyaux des photorécepteurs forme la couche nucléaire externe (ONL). Les photorécepteurs sont aussi constitués d'une terminaison axonale et l'ensemble des axones des photorécepteurs forme la couche plexiforme externe (OPL). Cette couche comprend aussi les dendrites de deux types d'interneurones, les cellules horizontales et les cellules bipolaires. Les cellules horizontales participent au traitement du signal et les cellules bipolaires assurent la transmission du signal. Les noyaux des cellules bipolaires forment la couche nucléaire interne (INL) alors que les terminaisons axonales de ces cellules se trouvent dans la couche plexiforme interne (IPL). Dans l'IPL, les axones des cellules bipolaires rencontrent les dendrites des cellules amacrines qui sont des cellules de types interneurones mais aussi les dendrites des cellules ganglionnaires. Ces dernières cellules, constituent la

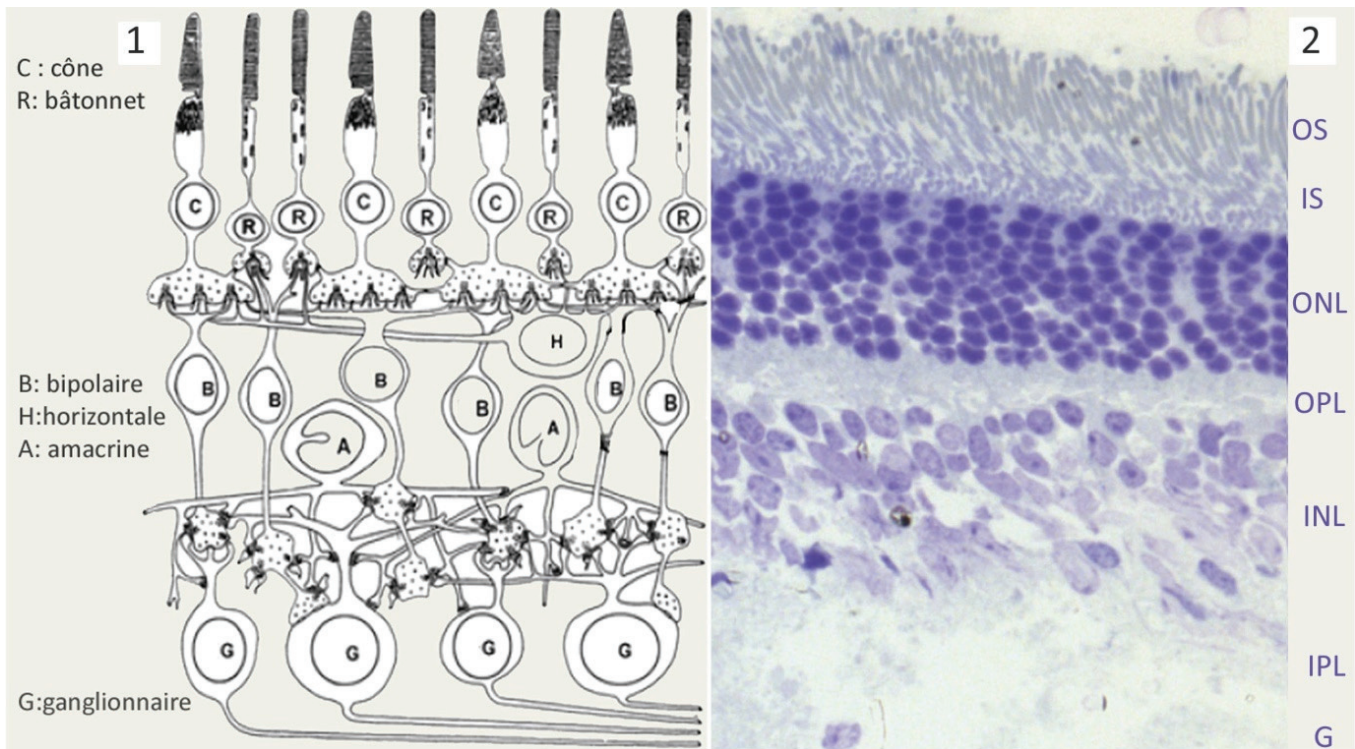


Figure 15: Organisation de la rétine de souris.

- 1) Représentation schématique des différents types cellulaires présents dans la rétine (buser and Imbert, 1987).
- 2) Sur une coupe semi-fine de rétine de souris contrastée au bleu de toluidine, préparée au laboratoire (Kizilyaprak), on peut voir les différents types cellulaires organisés en couches linéaires horizontales :
 - Les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) présentent leurs segments externes (OS : outer segments) et internes (IS : inner segments), leurs noyaux (ONL : outer nuclear layer) et leur synapses dans la couche plexiforme externe (OPL : outer plexiform layer).
 - Les interneurons (cellules horizontales, bipolaires et amacrines) présentent leurs dendrite dans l'OPL, leurs noyaux (INL : inner nuclear layer) et leur synapse dans la couche plexiforme interne (IPL). - Les cellules ganglionnaires (G) se retrouvent au contact du cristallin.

couche ganglionnaire, les axones de ces cellules forment le nerf optique assurant la transmission des signaux au cortex visuel dans le cerveau.

b) La cascade de phototransduction :

La phototransduction est un mécanisme par lequel la lumière est convertie en activité électrique dans les photorécepteurs et consiste en une série d'événements impliquant de nombreuses enzymes (**figure 16**).

La lumière interagit avec les photopigments, les molécules sensibles à la lumière. Cette interaction active l'opsine et la rhodopsine respectivement dans les cônes et les bâtonnets, elle est suivie de l'activation des transducines et enfin des phosphodiesterases. Les phosphodiesterases hydrolysent la GMPc (guanosine 3'-5' monophosphate cyclique) en GMP. Le canal sodium est maintenu ouvert par la GMPc assurant une dépolarisation de la cellule par l'entrée de Na⁺, mais une fois hydrolysée, la GMP quitte le canal sodium qui se referme et entraîne une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Le neurotransmetteur glutamate est relâché par les terminaisons synaptiques des photorécepteurs, pour venir activer les cellules bipolaires post-synaptiques. Le signal est ensuite envoyé aux neurones situés en aval. Les cascades d'amplification déclenchées par cette hyperpolarisation de la membrane plasmique entraînent une amplification importante du signal qui permet à un seul photon de déclencher une réponse du bâtonnet (Buser and Imbert, 1987). La phototransduction est stoppée après phosphorylation de la rhodopsine par la rhodopsine kinase puis la fixation de l'arrestine. La guanylate cyclase catalyse la conversion du GTP en GMPc permettant de ré-ouvrir le canal sodium et d'assurer la dépolarisation de la membrane plasmique (Chen, 2005).

La cascade de phototransduction est un mécanisme finement régulé très sensible aux dysfonctionnements. Des mutations au niveau des effecteurs sont responsables de différentes rétinopathies. Une liste de gènes responsables de rétinopathies est disponible sur le site internet RetNet : <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/>.

c) Le développement de la rétine :

Les différents types cellulaires qui constituent la rétine sont générés dans un ordre bien défini. Les cellules ganglionnaires apparaissent en premier alors que les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules de Müller sont produites plus tardivement (**figure 17**).

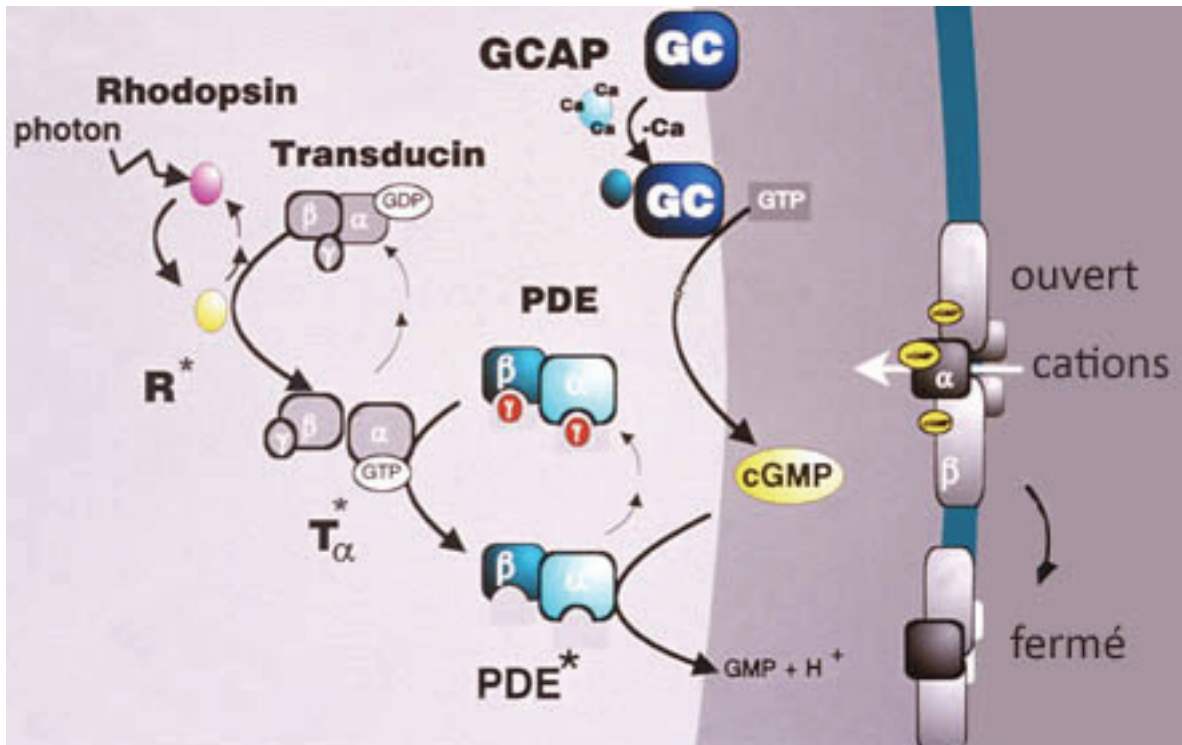


Figure 16: Cascade de phototransduction chez les vertébrés.

Le photon vient activer la rhodopsine, ce qui déclenche la double cascade transducine/phosphodiesterase (PDE) dans laquelle la GMPc est impliquée ; elle quitte le canal sodium, qui se ferme (hyperpolarisation de la membrane plasmique) pour se transformer en GMP. (GC : guanylate cyclase, GCAP : protéine activatrice de la guanylate cyclase), (Polans et al., 1996).

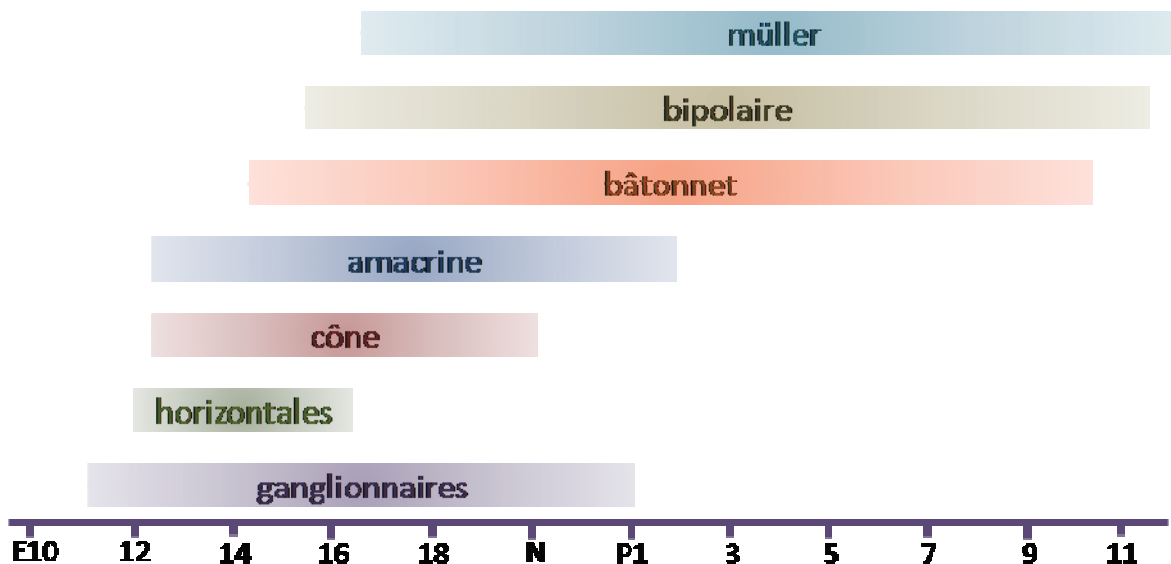


Figure 17: Développement ordonné des différents types cellulaires dans la rétine de souris.

Les cellules ganglionnaires apparaissent en premier et les cellules gliales en dernier (E10 : dixième jour de vie embryonnaire, N : naissance, P1 : premier jour après la naissance). D'après (Hatakeyama and Kageyama, 2004).

(Cepko et al., 1996). Le schéma général du développement de la rétine se fait par une sortie du cycle cellulaire des cellules progénitrices multipotentes prolifératives pour donner les cellules précurseurs post-mitotiques de la rétine. Ces dernières devront ensuite se différencier pour générer un des différents types cellulaires de la rétine. Le contrôle de la différenciation et de la prolifération des cellules progénitrices est crucial pour assurer la production de tous les types cellulaires en proportion adéquate dans la rétine adulte (Dyer and Cepko, 2001). Le développement de la rétine suit un modèle de « compétence » dans lequel des cellules progénitrices multipotentes gagnent et perdent la capacité intrinsèque de produire un sous ensemble de cellules post-mitotique pendant leur développement. Pendant leur prolifération, les cellules progénitrices passent par des vagues successives de compétences intrinsèques, avant d'initier la différenciation terminale d'un type cellulaire donné. (Livesey and Cepko, 2001). Au contraire, le développement du cerveau repose sur un modèle de « restriction progressive » dans lequel les cellules progénitrices sont déterminées très précocement vers un type neuronal donné. Dans la rétine, la spécification et la proportion d'un type cellulaire particulier sont aussi influencées par des facteurs extrinsèques (Belliveau and Cepko, 1999).

2) Le photorécepteur de type bâtonnet :

a) Le développement des bâtonnets :

Les bâtonnets constituent la majorité des cellules de la rétine. La différenciation de ces cellules démarre en période prénatale, au quatorzième jour de vie embryonnaire et s'achève en période postnatale environ dix jours après la naissance. Le schéma général du développement des bâtonnets est illustré en **figure 18**.

- Des cellules progénitrices aux bâtonnets immatures :

Les progéniteurs multipotents des cellules de bâtonnets expriment différents facteurs de transcription importants pour la différenciation. Parmi les facteurs qui agissent négativement sur la différenciation en bâtonnets, il y a les facteurs de transcription à homéobox : Rax, Rax6+, Pax6 et Chx10 ou les facteurs de transcription de type basique hélix-loop-hélix (bHLH) tel que HES1 ou bien encore le récepteur transmembranaire Notch1.

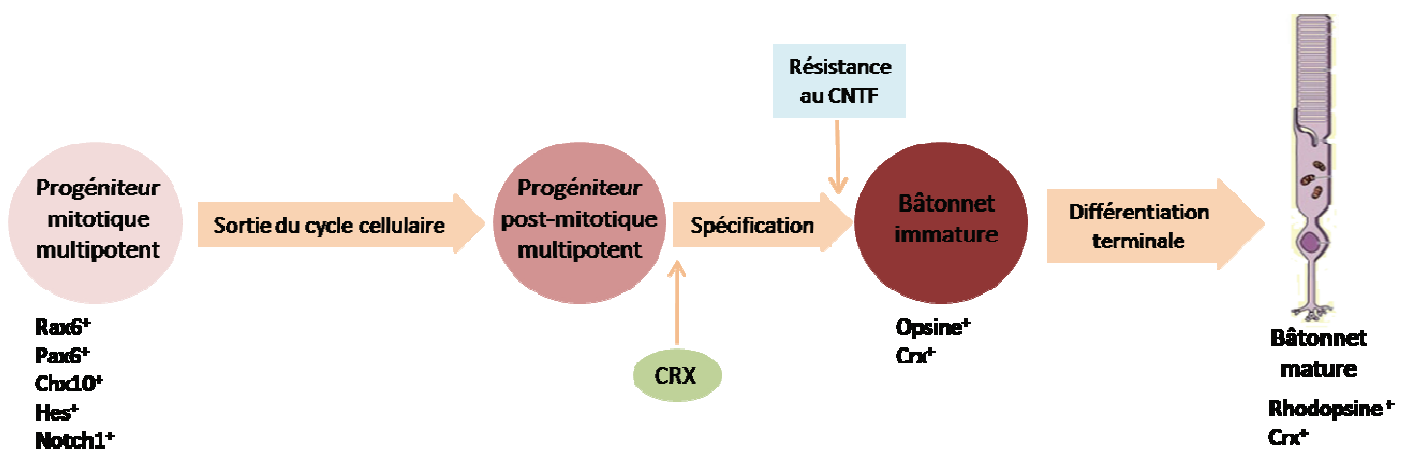


Figure 18 : Développement des photorécepteurs de types bâtonnets.

Les différentes étapes et les principaux facteurs de transcription donnant naissance au x bâtonnets matures. D'après (Morrow et al., 1998).

L'expression de ces gènes sera perdue dans les cellules de bâtonnets au cours de leur différenciation à partir des précurseurs post-mitotiques (Morrow et al., 1998).

La régulation positive est assurée par la taurine, un acide aminé structurellement similaire aux neurotransmetteurs glycine et GABA. Lorsque la taurine est ajoutée aux progéniteurs mitotiques, ces derniers ont tendance à sortir du cycle cellulaire et la taurine ajoutée aux cellules post-mitotiques augmente le nombre de bâtonnets (Young and Cepko, 2004).

La régulation négative de la différenciation des cellules de bâtonnets est induite par la cascade Notch-Hes. L'expression de Notch dans les cellules progénitrices de bâtonnets mitotiques bloque la différenciation en bâtonnets matures (Bao and Cepko, 1997). Au contraire, la perte de fonction de Notch1 dans les progéniteurs postnataux, résulte en une production exclusive de bâtonnets (Jadhav et al., 2006). De même, la dérégulation de l'expression de Hes1 dans la rétine embryonnaire maintient les progéniteurs mitotiques et inhibe la différenciation neuronale alors que la perte de fonction de Hes1 entraîne une expression précoce de la rhodopsine dans les cellules de bâtonnets (Tomita et al., 1996). Enfin, la dérégulation de l'expression de Hes5 dans les explants embryonnaires de rétine stimule la production des cellules gliales et inhibe la neurogénèse (Hojo et al., 2000).

La différenciation des bâtonnets peut aussi être régulée par la voie de signalisation des cytokines. L'addition de facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) aux progéniteurs mitotiques ou aux cellules post-mitotiques destinées à exprimer la rhodopsine et à devenir des bâtonnets, bloque l'expression de l'opsine. Ces cellules ne pourront pas exprimer la rhodopsine. L'addition de CNTF permet aux cellules progénitrices d'initier un autre programme de différenciation comme, par exemple, devenir des cellules bipolaires. De façon surprenante les progéniteurs des bâtonnets deviennent résistants au CNTF dès qu'ils commencent à exprimer l'opsine (Ezzeddine et al., 1997). Une autre cytokine, le facteur d'inhibition de la leucémie (LIF), bloque l'expression des facteurs de transcription spécifiques de la différenciation des bâtonnets et inhibe la différenciation des bâtonnets (Graham et al., 2005). La voie de signalisation des cytokines assure donc une régulation négative du développement des bâtonnets dans la rétine. Cette régulation passe par l'activation du transducteur de signal et activateur de la transcription (STAT) (Zhang et al., 2004). La cascade de signalisation STAT, activée dans la rétine, est connue pour jouer un rôle important dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la survie des cellules. En

effet, l'inactivation du facteur de transcription STAT3, de la famille des protéines STAT, est nécessaire pour l'expression des marqueurs spécifiques des cellules de bâtonnets (Ozawa et al., 2004) et l'activation de STAT3 joue un rôle dans la prolifération des progéniteurs (Rhee et al., 2004).

- La différenciation terminale des bâtonnets :

Une fois que la spécification en cellules de bâtonnets est achevée, les bâtonnets immatures commencent leur différenciation terminale. La différenciation permet aux bâtonnets d'exprimer les composants nécessaires à la cascade de phototransduction mais aussi d'acquérir leur forme caractéristique, notamment une organisation spécifique de la chromatine. Trois facteurs de transcription contrôlent la différenciation des photorécepteurs et assurent leur maintien dans un état différencié et fonctionnel. Ces trois facteurs sont, le facteur de transcription à homéobox CRX (Furukawa et al., 1997), le facteur de transcription Nrl (*neural retina leucine zipper*) qui contient un motif basic-leucine zipper (bZIP) (Swaroop et al., 1992) et le récepteur nucléaire orphelin Nr2e3 (Kobayashi et al., 1999). Les mutations de ces gènes sont responsables de différentes rétinopathies humaines. Ces facteurs de transcription régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la cascade de phototransduction comme par exemple le gène de la rhodopsine. Les facteurs CRX et Nrl reconnaissent des sites de liaison spécifiques dans la région promotrice du gène de la rhodopsine. Ce gène est exprimé très spécifiquement et très fortement dans les bâtonnets. Une seule cellule de bâtonnet peut contenir 10^9 molécules de rhodopsine. Après trois cycles d'activation par les photons, cette protéine est rapidement dégradée. Un complexe multi-protéique nommé « enhanceosome » assure une régulation transcriptionnelle hautement contrôlée, permettant aux cellules de bâtonnets d'atteindre et de réguler de tels niveaux d'expression de leurs gènes (Chau et al., 2000).

b) La structure nucléaire des bâtonnets :

Les microscopies, photonique et électronique, ont permis de mettre en évidence l'architecture particulière des cellules de bâtonnets en particulier les bâtonnets des animaux nocturnes (Carter-Dawson and LaVail, 1979). Au microscope photonique, sur une coupe semi-fine de rétine contrastée au bleu de toluidine on peut voir que le noyau des bâtonnets est plus petit et plus dense comparé aux noyaux des autres neurones. Ils ont une taille,

inférieure à 5µm, et ont une forme assez arrondie. Au microscope électronique, sur des coupes ultra-fines de rétine, on peut voir que les noyaux de bâtonnets ont une architecture unique avec deux domaines nucléaires distincts, un grand territoire central d'hétérochromatine entouré d'une fine couche d'euchromatine périphérique (**figure 19**).

L'établissement de ces domaines nucléaires est directement corrélé à la différenciation des cellules de bâtonnets. Au cours de la spécification des bâtonnets apparaissent plusieurs territoires d'hétérochromatine dispersés dans le noyau. Au moment de la maturation finale des cellules de bâtonnets et du pic d'expression de la rhodopsine, les territoires d'hétérochromatine fusionnent pour donner un grand domaine d'hétérochromatine au centre du noyau (Cepko et al., 1996).

Une étude récente menée par Solovei et ses collaborateurs permet de relier l'architecture particulière des noyaux des bâtonnets des animaux nocturnes avec leur capacité à voir la nuit. Les auteurs concluent que l'organisation nucléaire du bâtonnet est « inversée » par rapport à un noyau témoin. En effet, dans un noyau de cellules HeLa (figure 7), l'hétérochromatine a tendance à s'associer à l'enveloppe nucléaire et au nucléole, alors que l'euchromatine occupe la majeure partie du centre du noyau. Dans le noyau de bâtonnet, cette répartition de la chromatine se retrouve inversée et c'est l'hétérochromatine qui occupe la majeure partie du centre du noyau. Cependant, seules les cellules de bâtonnets d'animaux nocturnes auraient une architecture nucléaire « inversée », permettant d'accroître la sensibilité de détection de la lumière.

Par des expériences de FISH (*fluorescent in situ hybridization*), les auteurs ont pu localiser des gènes actifs en périphérie des noyaux et des séquences d'ADN inactives au niveau du territoire d'hétérochromatine (Solovei et al., 2009). Ces expériences suggèrent que le noyau de bâtonnet est hautement organisé avec une activité transcriptionnelle confinée dans la fine couche d'euchromatine périphérique.

L'organisation particulière de la chromatine dans les noyaux de bâtonnets, avec un large domaine de chromatine condensée entouré d'un fin bord de chromatine décondensée, constitue mon modèle d'étude pour corrélérer *in vivo* par microscopie électronique la structure de la chromatine et l'activité transcriptionnelle (voir publication).

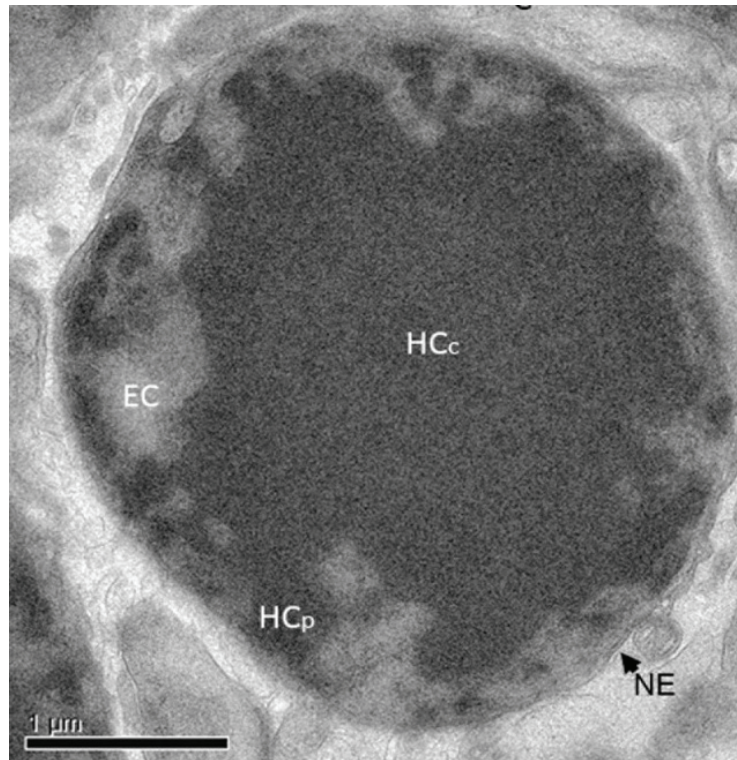


Figure 19 : Organisation nucléaire du noyau de bâtonnet en microscopie électronique.

Coupe ultra-fine de rétine de souris contrastée à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (Kizilyaprak), montrant un noyau de bâtonnet avec ses domaines caractéristiques. - Au centre : un large domaine d'hétérochromatine (HCc). - A la périphérie : un domaine étroit d'euchromatine (EC) pénétré d'hétérochromatine (HCp) venant au contact de l'enveloppe nucléaire (NE).

3) Présentation du modèle murin pour l'étude la maladie SCA7 :

Pour étudier la maladie génétique SCA7, je dispose au laboratoire de souris transgéniques issues de la lignée R7E (*Rod sca7 Expanded*). Cette lignée murine présente un ciblage neuronal spécifique, avec une surexpression de l'ATXN7 mutée dans les cellules photoréceptrices de type bâtonnet. Cette lignée possède un fort niveau d'expression engendré par le promoteur du gène rhodopsine et permet de modéliser l'atteinte rétinienne de la maladie SCA7. Les souris transgéniques modèles pour la maladie génétique SCA7 ont été générées par transgénèse par le Docteur Gaël Yvert au sein de l'institut (Yvert et al., 2000).

Les constructions R7E sont sous le contrôle de la région régulatrice du gène *rhodopsine* humain et contiennent la phase codante du gène SCA7 humain entier avec une expansion répétée de 90 triplets CAG. Les lignées sont amplifiées dans un contexte murin C57BL/6 et les progénitures sont génotypées. L'expression de l'ATXN7 est testée par immunofluorescence, aucun signal n'est détecté sur les sections de rétines non transgéniques, suggérant une expression faible de l'ATXN7 endogène. L'expression de l'ATXN7 observée sur des sections de rétines R7E est limitée aux cellules de bâtonnets. Enfin, l'analyse par western blot révèle une protéine ATXN7 polyQ de 150 kDa présente dans les extraits nucléaires d'animaux R7E (Yvert et al., 2000).

L'ATXN7 polyQ forme progressivement des inclusions nucléaires dans les rétines des souris transgéniques. A 13 jours dans les rétines R7E, l'ATXN7 est distribuée de façon homogène dans le noyau des bâtonnets. A des stades plus tardifs, l'ATXN7 se retrouve concentrée dans des inclusions nucléaires qui semblent se localiser à la périphérie des noyaux. Des expériences d'immunomarquage réalisées avec 2 anticorps polyclonaux dirigés contre 2 parties distinctes de la protéine (N- et C-terminales) (**figure 20**) ont permis de mettre en évidence que seul l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale de la protéine permet de marquer les inclusions nucléaires à des stades avancés de la maladie. Des expériences de western blot réalisées sur des extraits nucléaires de souris R7E âgées de 21 jours révèlent une protéine ATXN7 clivée. L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe un clivage protéolytique de l'ATXN7 polyQ et que seuls les fragments N-terminaux de la protéine clivée s'accumulent dans les inclusions nucléaires (Yvert et al., 2000).

1) Distribution des anticorps anti-ATXN-7



2) Immuno-localisation de l'ATXN7

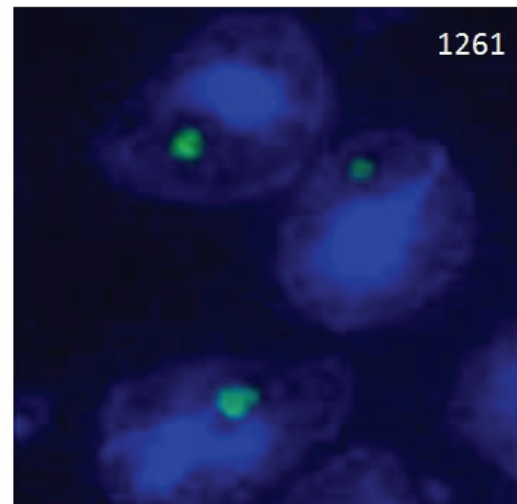


Figure 20: Immuno-détection de l'ataxine 7.

1) L'ATXN-7 est une protéine nucléaire de 892 acides aminés qui présente 3 domaines (I, II et III), un signal de localisation nucléaire (NLS) et une expansion polyQ (Q) à son extrémité N-terminale. Les positions des épitopes et la distribution des anticorps polyclonaux dirigés contre la partie N-terminale et C-terminale de la protéine ataxine-7 sont précisées et correspondent respectivement aux anticorps 1261 et 1598. 2) Immuno-marquage des agrégats d'ATXN7 polyQ, dans les noyaux de bâtonnets, avec l'anticorps 1261, réalisé sur une cryo-coupe ultra-fine de rétine de souris transgénique SCA7 âgées de 13 semaines (Kizilyaprak).

L'état fonctionnel des rétines R7E a pu être examiné par électro-rétinographie (ERG). Les souris transgéniques comparées aux souris sauvages ont une onde-A réduite. L'onde A correspond spécifiquement à l'activité électrique des photorécepteurs. Cette anomalie est détectée sur des souris âgées de 4 semaines et semble se stabiliser vers 5-7 mois. Après 1 an, les rétines R7E perdent leur activité électrophysiologique avec un ERG complètement plat (**figure 21**) et les souris deviennent aveugles. La neurodégénérescence des rétines de souris R7E a pu être étudiée par histochimie montrant des changements pathologiques divers. Les premiers signes pathologiques sont clairement visibles à 1 mois. L'épaisseur des segments internes et externes des photorécepteurs est réduite à différents endroits dans la rétine, ce qui donne à cette dernière un aspect « ondulé ». A 3 mois l'aspect « ondulé » de la couche des noyaux externes de la rétine est plus prononcé et les segments restent intacts seulement sur d'infimes parties de la rétine. A 13 mois les segments internes et externes des photorécepteurs ont complètement disparu (**figure 21**).

Des observations en microscopie électronique de cellules de bâtonnets de souris SCA7 ont permis de mettre en évidence une modification de l'organisation de la chromatine, comparée à celle issue de souris normales (**figure 22**). En effet, l'expression de l'ATXN7 polyQ entraîne une décondensation dramatique du territoire central d'hétérochromatine (Helmlinger et al., 2006a). Enfin, l'étude du transcriptome des souris R7E modèle pour la maladie SCA7 montre que l'expression d'une faible proportion (1 à 2%) de gène est modifiée. L'expression des gènes fortement transcrits est altérée en priorité avec en particulier une perte d'expression des protéines de la transduction du signal lumineux notamment de la rhodopsine. Il faut également noter que la toxicité induite par l'ATXN7 polyQ est irréversible et la pathologie continue de progresser en dépit d'une perte progressive d'expression du transgène qui débute au cours de la 3^{ème} semaine. Cette perte d'expression s'explique par une répression très forte du promoteur rhodopsine par l'ATXN7 polyQ (Helmlinger et al., 2004a).

Les souris R7E modèles pour la maladie génétique SCA7 présentent un phénotype sévère mais restreint à la rétine parce que le gène muté n'est exprimé que dans ce tissu. Le comportement des animaux n'est pas affecté et l'espérance de vie est normale. Ce modèle représente donc une opportunité unique pour étudier *in vivo* l'effet à long terme de la toxicité des expansions polyQ au sein d'une population neuronale donnée. De plus, la

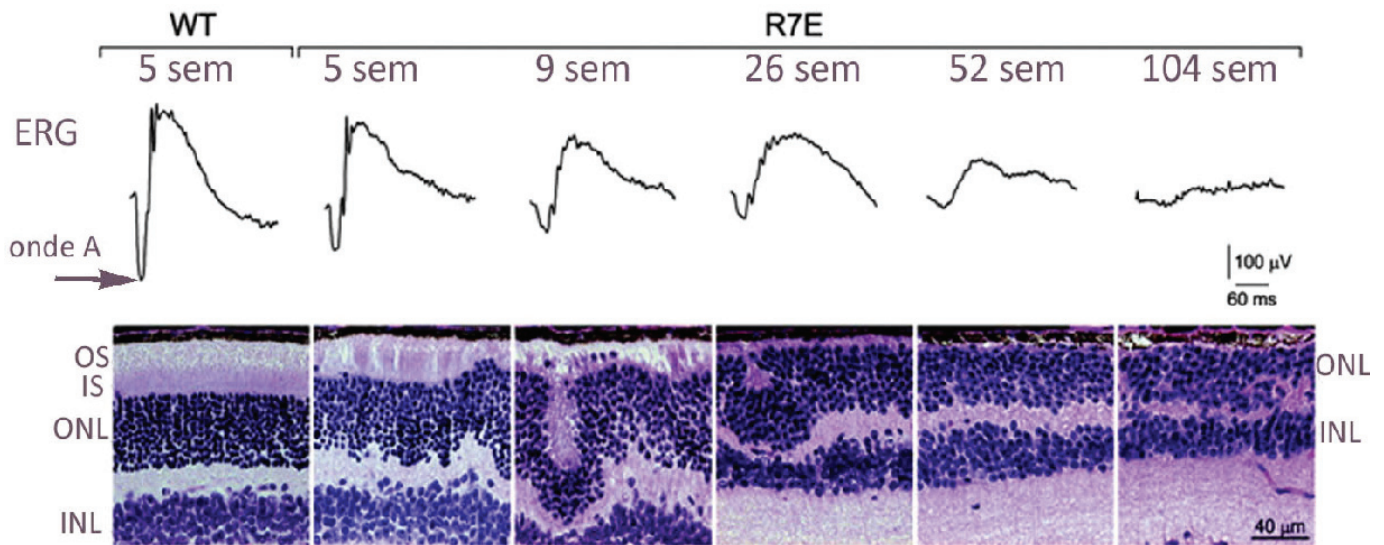


Figure 21: Altérations progressives des photorécepteurs de type bâtonnets dans les rétines de souris modèles pour la maladie SCA7.

(A) L'analyse au cours du temps (entre 5 et 104 semaines) de l'activité électrique (ERG) des rétines de souris SCA7 montre une diminution progressive de l'activité des bâtonnets (onde A) jusqu'à une absence totale de réponse de la rétine (ERG plat à 104 semaines). (B) La diminution de l'activité électrique est concomitante avec une diminution progressive de l'épaisseur de la couche des segments externes (OS) et internes (IS) visible sur les coupes de rétines SCA7 contrastées au bleu de toluidine (Helmlinger et al., 2004a).

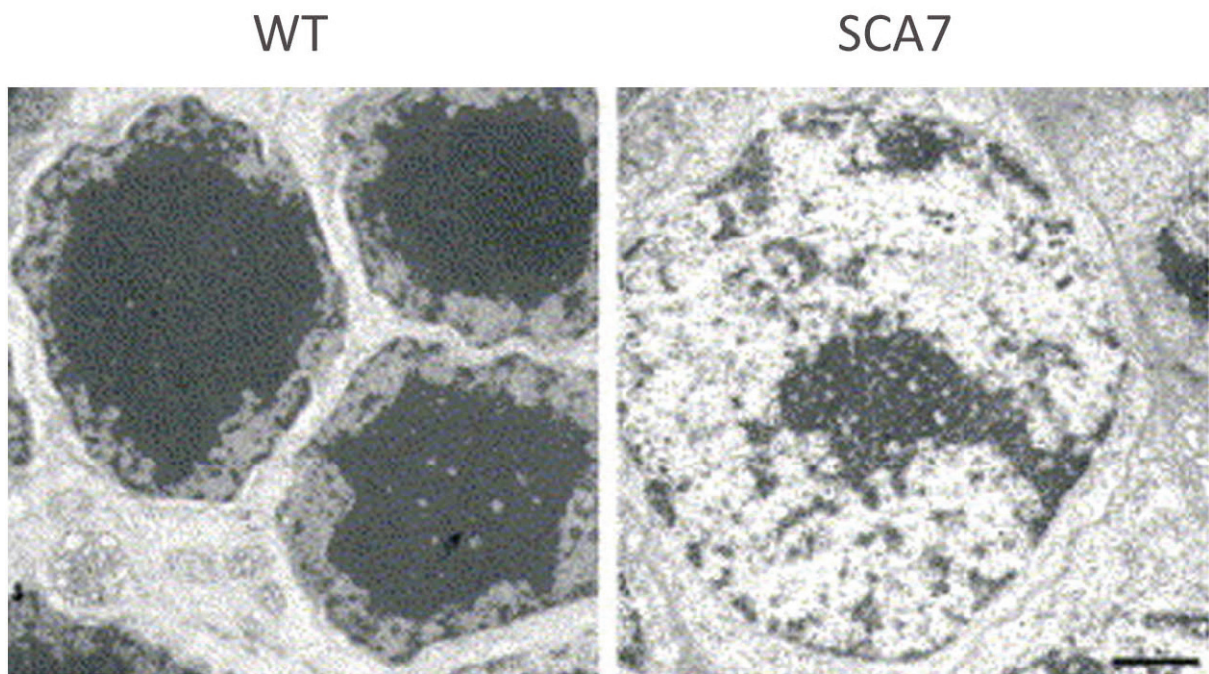


Figure 22: Désorganisation de la structure de la chromatine dans les noyaux de bâtonnets SCA7.

Des coupes ultra-fine de rétine de souris sauvage (WT) et SCA7 observées au microscope électronique mettent en évidence une très forte décondensation de la chromatine dans les noyaux des bâtonnets SCA7. La barre d'échelle représente 1 μm (Helmlinger et al., 2006b).

chromatine des noyaux des bâtonnets apparait fortement décondensée. Ce phénotype nucléaire est associé à une dérégulation transcriptionnelle. Le noyau de bâtonnet de souris SCA7 constitue un modèle unique pour étudier *in vivo* à la résolution de la microscopie électronique, l'influence des modifications de structures de la chromatine sur la transcription.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

L'organisation structurale de la chromatine est étroitement liée à la régulation de l'expression des gènes et à l'activité transcriptionnelle dans les noyaux de cellules eucaryotes. Cependant, aucune relation directe n'a pu être établie *in vivo* à un niveau ultrastructural, entre le degré de compaction de la chromatine et son état transcriptionnel. **Le but de mon projet de recherche est de corrélérer *in vivo* l'arrangement tridimensionnel des nucléosomes avec l'activité transcriptionnelle de la chromatine.**

Pour ce faire, nous avons choisi comme modèle d'étude le noyau des bâtonnets de rétine de souris. Dans le noyau des bâtonnets de souris normales, l'organisation de la chromatine est très caractéristique. Le territoire d'hétérochromatine qui occupe toute la région centrale du noyau, est entouré par une fine couche périphérique d'euchromatine. Nous disposons au laboratoire d'une lignée murine modèle pour la maladie génétique SCA7. La maladie SCA7, est une maladie à expansion polyglutamine qui touche la rétine et l'ATXN7 qui porte l'expansion polyglutamine (polyQ), est une sous-unité du complexe de co-activation de transcription SAGA. Ce complexe est connu pour réguler la transcription en modifiant les histones par ses activités histone acétyl-transférase (HAT) et histone déubiquitinyllase (DUB).

Les souris modèles qui expriment spécifiquement l'ATXN7 polyQ dans le noyau des bâtonnets présentent un phénotype rétinien sévère avec une perte progressive de l'activité électrophysiologique des bâtonnets, des défauts histologiques importants et une altération de l'activité transcriptionnelle. Les gènes spécifiquement exprimés dans les cellules de bâtonnets se retrouvent transcriptionnellement sous-régulés. De façon très intéressante, les défauts transcriptionnels s'accompagnent d'une désorganisation massive de la chromatine. Dans le noyau des bâtonnets de rétines de souris SCA7, le domaine d'hétérochromatine apparaît fortement décondensé. Une des hypothèses proposées pour expliquer le phénotype observé, repose sur une altération de l'activité enzymatique HAT du complexe SAGA après incorporation de l'ATXN7 polyQ.

Ce modèle, nous permet d'étudier *in vivo* les conséquences de l'expression de l'ATXN7 polyQ sur les modifications post-traductionnelles des histones et l'organisation de la

chromatine dans le but de comprendre le phénotype observé dans les noyaux de bâtonnets de rétines de souris SCA7.

La première partie de mon projet de recherche est centré sur l'étude de la chromatine du noyau des bâtonnets de souris sauvages, afin de corrélérer *in vivo* l'organisation tridimensionnelle des nucléosomes avec les modifications post-traductionnelles des histones et l'activité transcriptionnelle. Pour ce faire, j'ai étudié l'organisation tridimensionnelle de la chromatine dans différents compartiments nucléaires en utilisant des techniques de tomographie électronique. Puis j'ai localisé, dans ces noyaux, les molécules d'ARN polymérase II ainsi que les modifications post traductionnelles des histones par des techniques d'immunomarquage en microscopie électronique.

La deuxième partie de mon travail est basée sur une étude comparative entre les noyaux de bâtonnets normaux et les noyaux de bâtonnets SCA7, dans le but de mieux comprendre l'origine du phénotype SCA7. Par des méthodes de microscopie électronique, j'ai étudié l'ultrastructure des noyaux des bâtonnets de rétines de souris SCA7. Puis, j'ai localisé les modifications post-traductionnelles des histones avec des techniques d'immunomarquage en microscopie électronique. Des expériences de protéomique m'ont permis de comparer le niveau d'expression des histones entre les noyaux normaux et les noyaux SCA7. Enfin, des données transcriptomiques, issues de rétines de souris SCA7 et sauvages, obtenues précédemment au sein de l'institut ont été analysées par bio-informatique. La liste des gènes dont l'expression est dérégulée dans les noyaux des bâtonnets de rétines de souris SCA7, a été analysée dans le but d'identifier de potentiels candidats responsables du phénotype SCA7.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Le matériel biologique :

1) La lignée murine :

La lignée de souris transgénique R7E a été générée au sein de l'IGBMC par le Docteur G. Yvert (Yvert et al., 2001; Yvert et al., 2000). Ces lignées sont entretenues par croisement avec des souris C57BL/6J. Les souris C57BL/6J constituent également la source de tissus sauvages. Les souris adultes sont sacrifiées par dislocation cervicale et les rétines sont extraites et disséquées dans du tampon ACSF (*Artificial Cerebrospinal Fluid*) (126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 18 mM NaHCO₃, 11 mM Glucose, pH 7.4, équilibré avec 95% O₂ et 5% CO₂) préalablement refroidi sur la glace.

2) Le géotypage :

a) Préparation de l'ADN génomique :

Pour déterminer le géotype, l'ADN génomique est préparé à partir d'une biopsie de queues de souris âgées de deux semaines.

Les queues de souriceaux sont digérées par la protéinase K (100µg/ml) dans 500µl de tampon de digestion (100mM Tris pH 8.5, 200mM NaCl, 1.5mM EDTA, 0.2% SDS) pendant 12 heures à 55°C. Après une centrifugation de 10 min à 20800 *g* et une précipitation de l'ADN dans l'éthanol à 70%, l'ADN est repris dans 200µl de tampon Tris-EDTA (10/1 ; pH8).

b) Réaction de polymérisation en chaine (PCR) :

Le gène de l'*ataxine 7* sauvage et le transgène mutant sont amplifiés par PCR. Pour ce faire, 2µl (~200ng) d'ADN génomique sont mélangés à 48 µl d'une solution contenant : les dNTP à une concentration de 0.2mM chacun, le tampon de PCR 1X (10mM Tris-HCl pH 8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl et 0.1 % Triton X-100), les amorces à une concentration de 0.5µM

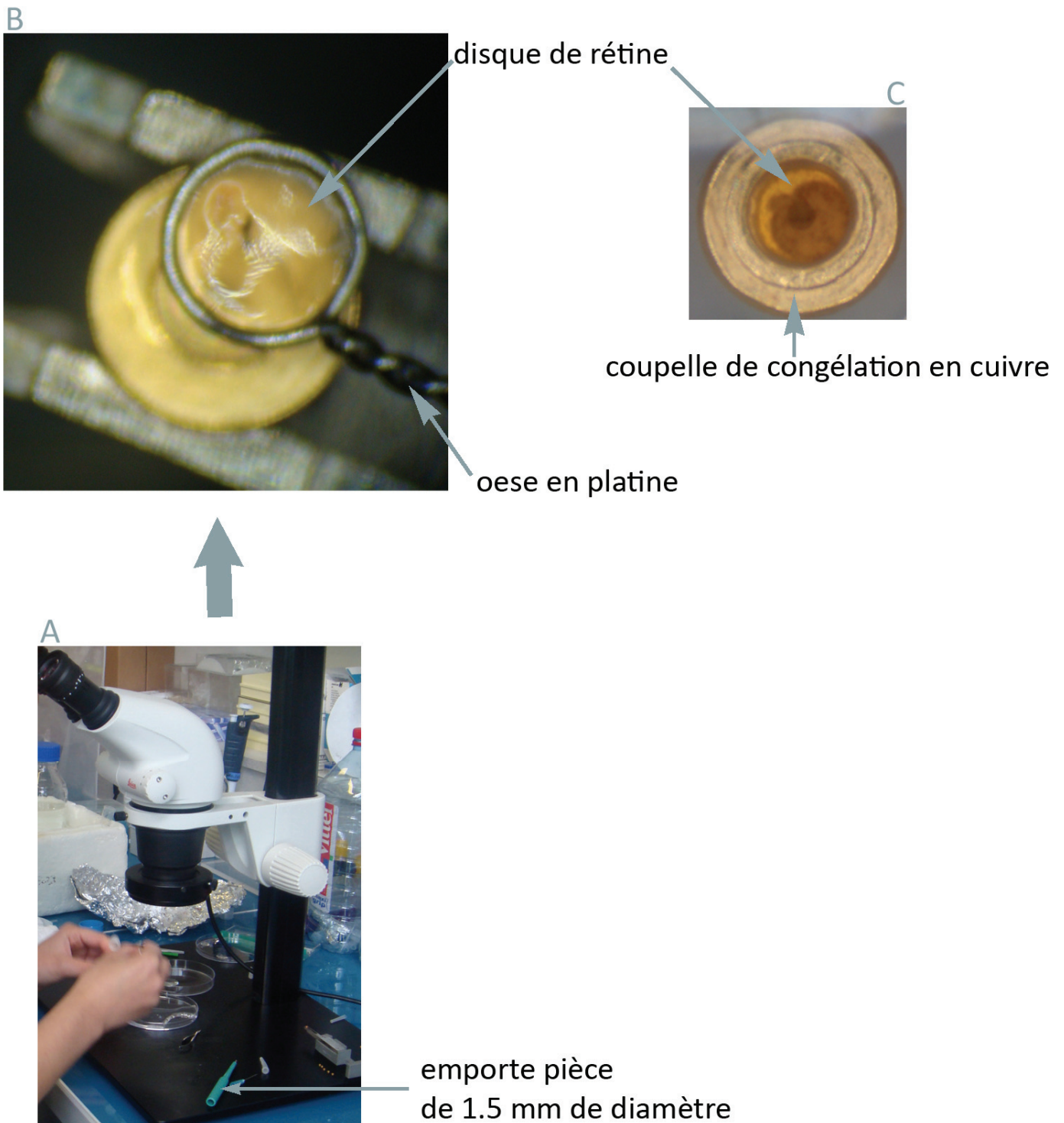


Figure 23 : Biopsie des rétines.

A) La biopsie est réalisée sous la loupe binoculaire à l'aide de l'emporte pièce à usage unique (Miltex).

B) Le disque de rétine ainsi obtenu se manipule facilement à l'aide de l'oese montée sur manche (maison).

C) Le disque de rétine vient parfaitement se loger dans la coupelle de congélation en cuivre (Leica).

chacune (XT76 : 3'AGGCGATGAC AAAGAAGAG et XT77 : 5'AGGGGATGAG GATGAAGAG) et l'ADN polymérase Taq (*invitrogen*) à une concentration de 0.02U/ μ l.

La réaction de PCR est réalisée selon les conditions suivantes : 95°C 2 min, (94°C 10 min, 58°C 10 min, 72°C 30 min) 35 cycles, 72°C 5 min. L'analyse des produits de PCR se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 2% contenant 1ng/ml de bromure d'ethidium dans du tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA).

II. Les techniques de microscopie électronique :

1) Préparation des échantillons pour la microscopie électronique:

Pour préserver au maximum la morphologie des cellules et préparer un tissu aussi proche que possible de son état physiologique, nous avons choisi de congeler les rétines par haute pression (EMPACT2 Leica Microsystems, Vienne). Cette étape permet de cryo-fixer le tissu en glace amorphe ou vitreuse, on parle de vitrification de l'échantillon. Les échantillons sont ensuite cryo-substitués (AFS2, Leica Microsystems) et l'eau des tissus est remplacée progressivement par un solvant organique. Les échantillons sont ensuite réchauffés lentement et enrobés dans une résine en vue d'être sectionnés à température ambiante par ultramicrotomie. Chacune des étapes de préparation des échantillons a dû être optimisée pour l'étude spécifique de la rétine en microscopie électronique.

C'est Fernandez-Moran en 1960 qui a introduit les préceptes de l'ensemble de ces techniques de cryo-préparation des échantillons biologiques (Fernandez-Moran, 1960).

a) La biopsie des rétines :

La biopsie est réalisée à l'aide d'un emporte pièce stérile à usage unique de 1.5 mm de diamètre (Miltex). Le diamètre de l'emporte pièce a l'avantage de correspondre au diamètre de la coupelle de congélation. L'emporte pièce à usage unique assure une découpe nette et précise du tissu pour chaque biopsie. Il scelle également le tissu de manière à ce qu'aucune cellule ne puisse s'échapper et que le tissu reste intact. Le disque de tissu est ensuite

facilement manipulable à l'aide d'une pince montée sur manche (maison) toujours pour préserver au maximum l'échantillon (**figure 23**).

b) Optimisation de la congélation haute pression des rétines:

La vitrification de l'échantillon est une étape délicate avec un risque important de formation de cristaux de glace dans l'échantillon. La formation des cristaux de glace touche préférentiellement les tissus riches en eau comme le tissu nerveux et la rétine. Pour réduire au maximum les dommages liés à la congélation, il est donc nécessaire de traiter les échantillons avec des cryoprotectants, avant leur congélation. La tendance de l'eau à former des cristaux de glace diminue en fonction de la concentration en soluté et peut être supprimée avec des solutés à haute concentration. En général la plupart des solutés agissent comme cryoprotectants.

Pour déterminer les meilleures conditions de cryoprotection, j'ai réalisé une étude systématique combinant deux cryoprotectants : le dextran (Sigma # D1662) et la BSA (Sigma # A4503) à différentes concentrations. Ces deux cryoprotectants de haut poids moléculaire sont extracellulaires et sont connus pour ne pas pénétrer dans les cellules limitant ainsi les risques de toxicité pour les cellules.

Les solutions de cryoprotectant testées sont répertoriées dans le **tableau 2**. Chaque solution finale de cryoprotectants est préparée extemporanément à partir d'un mélange volume à volume de deux solutions mères concentrées deux fois. Les solutions mères sont préparées d'avance. Les poudres de cryoprotectants préalablement pesées sont dissoutes directement dans le tampon de dissection (ACSF) et stockées dans la glace.

Solutions mères de cryoprotectants	Solutions finales de cryoprotectants
1 = BSA 20%	1 = BSA 20%
2 = dextran 10%	1 + 2 = BSA 10% + dextran 5%
3 = dextran 20%	1 + 3 = BSA 10% + dextran 10%
4 = dextran 40%	1 + 4 = BSA 10% + dextran 20%

Tableau 2: Les différentes solutions de cryoprotectants testées sur la rétine.

Les solutions finales de cryoprotectants sont obtenues par un mélange volume à volume de solutions mères concentrées deux fois.

L'infiltration de la solution de cryoprotectants dans la rétine se fait juste avant l'étape de congélation haute pression. Le disque de tissu est placé quelques secondes dans la goutte de cryoprotectants puis rapidement transféré sur la coupelle de congélation en cuivre, à l'aide de l'oese. L'excès de solution est absorbé délicatement à l'aide d'un papier filtre et l'échantillon est congelé dans la machine de congélation haute pression EMPACT2 (Leica Microsystems, Vienne) à l'aide du système de chargement automatique (*auto-loader*).

L'efficacité de cryoprotection des différentes solutions est déterminée après observation aux microscopes optiques et électroniques des échantillons traités. Une fois enrobé dans la résine, chaque échantillon est coupé. Les coupes semi-fines (500 nm) contrastées au bleu de toluidine sont observées au microscope photonique. Cette première observation nous donne une approximation de la proportion des noyaux dont la structure est préservée. Le noyau des photorécepteurs présente un large domaine d'hétérochromatine central visible en optique après coloration au bleu de toluidine. Les noyaux qui présentent un territoire d'hétérochromatine fortement et uniformément contrasté ont une forte chance de voir leur morphologie préservée. L'observation de coupes ultrafines (100 nm) au microscope électronique nous permet d'évaluer en détail, pour les différentes conditions de cryoprotectants testées, la préservation morphologique de chaque cellule (**figure 24**).

Pour les différentes solutions de cryoprotectants testées, la morphologie des segments (internes et externes) des photorécepteurs est préservée et les noyaux en contact direct avec les segments sont peu endommagés. Cependant, la proportion de noyaux endommagés peut varier de façon importante, le noyau étant le premier organite de la cellule à être endommagé si la cryo-fixation est incomplète:

- Le traitement du tissu avec de la BSA seule n'est pas suffisant, et plus de la moitié des noyaux sont endommagés par la formation de cristaux de glace apparus après la cryo-fixation des échantillons, pendant la substitution car la température de substitution est proche de la température de dévitrification. Cette atteinte morphologique, observée en microscopie électronique est communément appelée « fantômes de cristaux de glace » (*ice ghosts*).

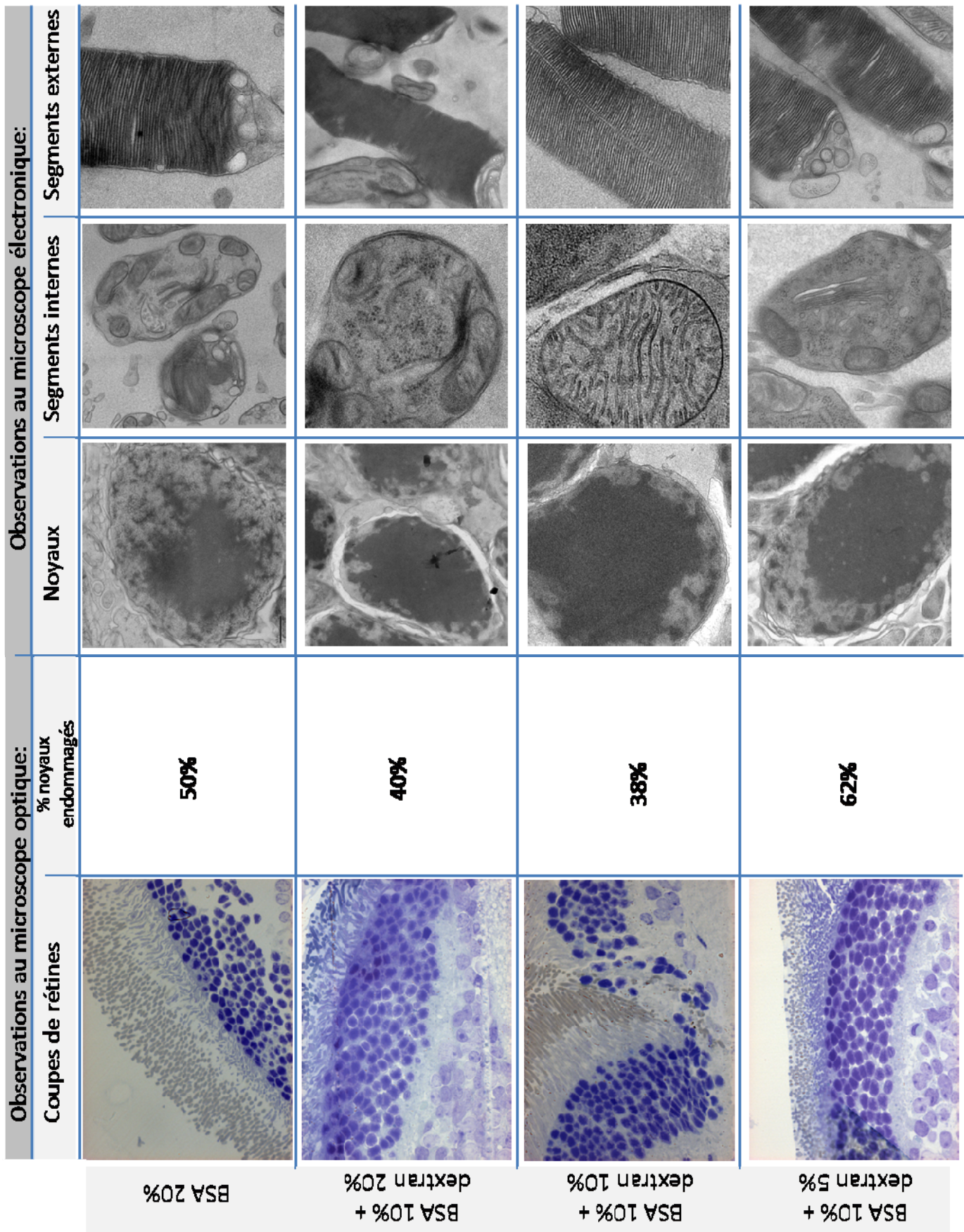


Figure 24 : Observation aux microscopes optique et électronique de rétines cryo-fixées à haute pression, préalablement traitées avec différentes solutions de cryoprotectants.

- Le traitement avec une solution de BSA à 10 % + dextran à 5% ne permet pas d'améliorer la congélation et une large majorité des noyaux est endommagé.

- Le traitement avec une solution de BSA à 10 % + dextran à 20% permet de réduire significativement les dommages liés à la congélation, la proportion de noyaux endommagés est inférieure à 40%. Cependant, l'utilisation de dextran à 20%, entraîne un gonflement important des noyaux et la formation d'un halo blanc est visible autour de la majorité des noyaux en microscopie électronique montrant une possible toxicité du dextran vis-à-vis des noyaux.

- Le traitement du tissu avec une solution de BSA à 10% + dextran à 10% assure la préservation morphologique d'une large majorité des noyaux et l'utilisation du dextran à 10% n'entraîne pas de gonflement des noyaux. Cette combinaison optimale de cryoprotectants pour la cryo-fixation de la rétine se rapproche des conditions mises au point au cours des expériences de Wilson lors de la cryo-fixation de rétines de grenouilles (Wilson et al., 1998).

La toxicité par stress osmotique liée à la déshydratation cellulaire est le risque majeur pendant l'exposition aux cryoprotectants. Ce risque est lié au fait que les solutions de BSA/dextran s'évaporent et sèchent très rapidement en augmentant leur concentration. C'est pour cela, que les solutions sont préparées extemporanément pour chaque échantillon. Pour chaque solution de cryoprotectant testée, la toxicité cellulaire est évaluée par des expériences d'électrophysiologie de la rétine. L'activité électrique des neurones de la rétine est mesurée en présence des différentes solutions de cryoprotectants. Les expériences d'électrophysiologie sont réalisées dans le laboratoire du Docteur Michel Roux au sein de l'IGBMC. L'électrophysiologie consiste à mesurer le courant présent dans les photorécepteurs pendant la dépolarisation des cellules. Les enregistrements de courant ne sont pas continus mais réalisés toutes les 15ms sur une période de 100ms. Dans le cas de notre étude, la conductance potassique est mesurée. Les photorécepteurs sont techniquement difficiles à atteindre avec l'électrode munie d'une micropipette de verre et les mesures sont réalisées sur les cellules amacrines et bipolaires.

Lors des enregistrements, la rétine est perfusée avec les différentes solutions de cryoprotectants (**tableau 2**) et le courant moyen est mesuré en fonction du temps (**figure 25**). Pour chaque condition testée, les cryoprotectants n'entraînent pas de choc osmotique sur les cellules, et le temps de survie d'au moins neuf minutes pour chaque condition est suffisamment long, pour nous permettre une congélation haute pression de cellules vivantes.

c) Cryo-substitution et enrobage en résine :

Après l'étape de congélation haute pression, les échantillons sont placés dans l'automate de substitution (AFS2, Leica Microsystems) pour être cryo-substitués. Au cours de cette étape, les échantillons sont maintenus à très basse température pour éviter la décongélation et la formation de cristaux de glace et l'eau des tissus est progressivement substituée par un solvant organique. C'est Steinbrecht, en 1980, qui a mis au point la première technique de cryo-substitutions des échantillons (Steinbrecht, 1980).

Les différentes étapes de la cryo-substitution sont répertoriées dans le **tableau 3**.

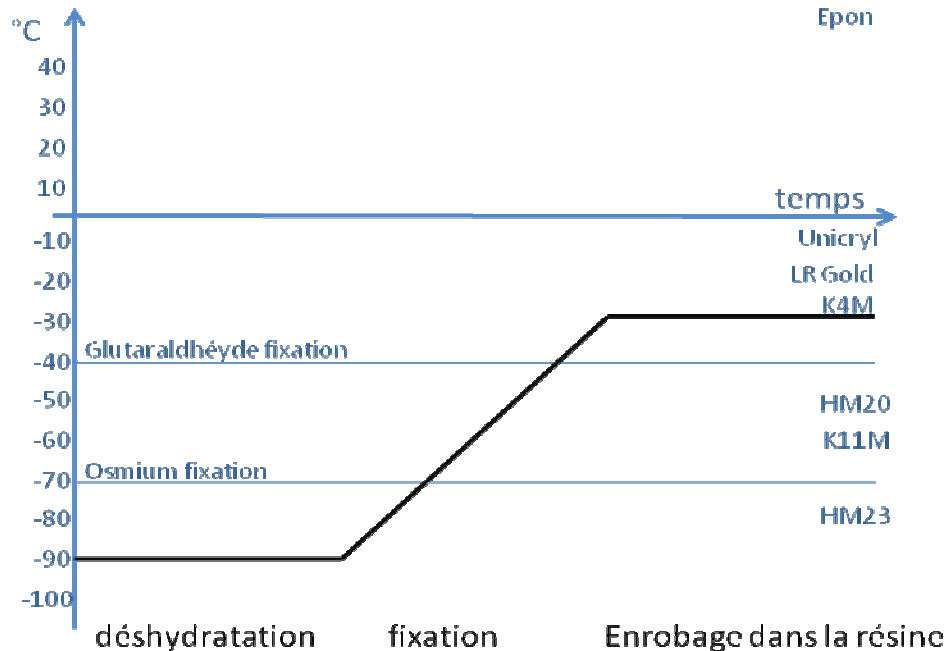


Tableau 3 : Représentation schématique des différentes étapes de cryo-substitution des échantillons (d'après (Humbel, 2007)).

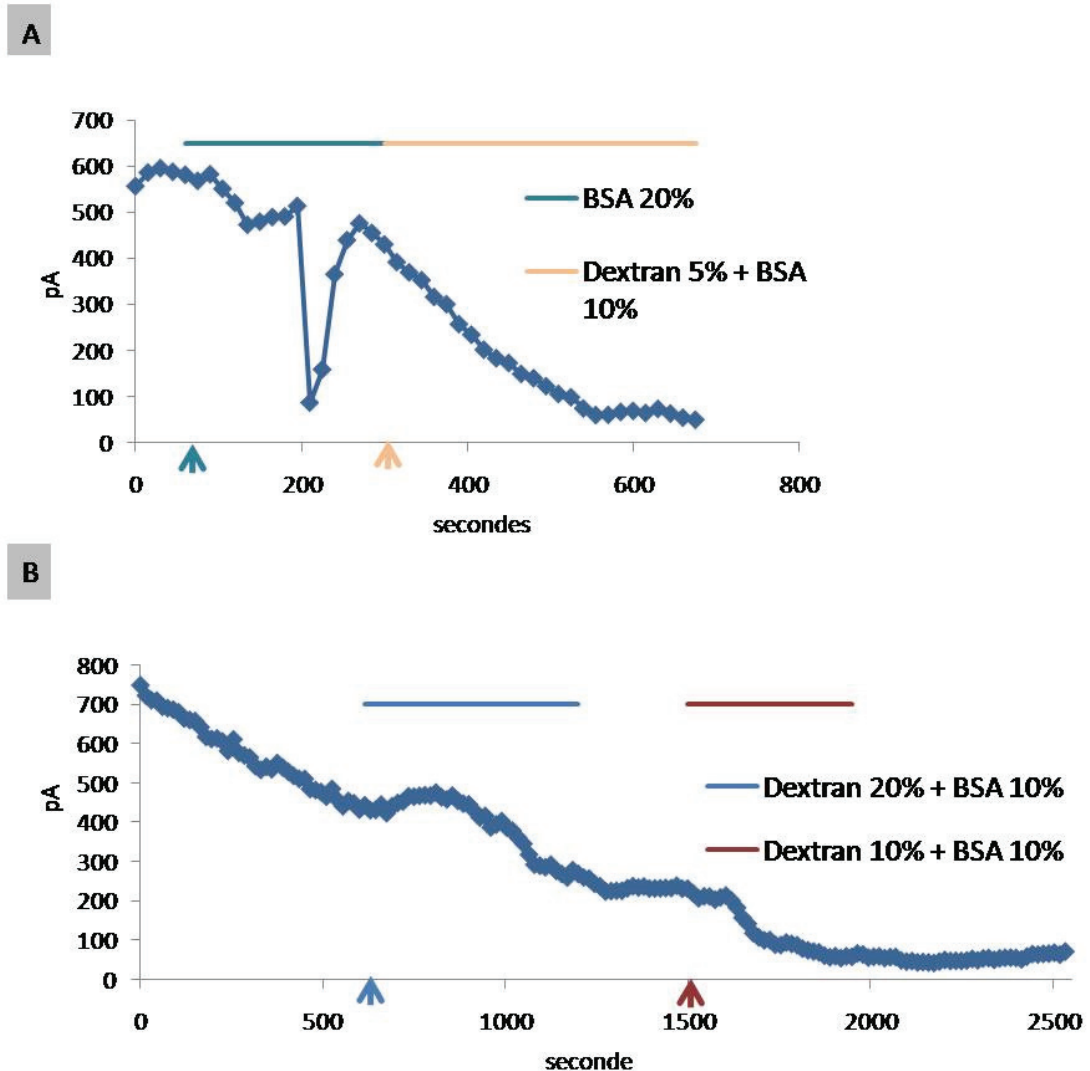


Figure 25 : Courant moyen mesuré en fonction du temps au niveau de deux neurones de la rétine (A et B) en présence de différentes solutions de cryoprotectants.

A) Activité électrophysiologique d'un premier neurone. Autour de la 70^{ème} seconde d'enregistrement la rétine est perfusée avec une solution de BSA à 20% pendant 4 minutes, puis la solution de BSA est remplacée par une solution de dextran 5% +BSA 10 % pendant 7 minutes. B) Activité électrophysiologique d'un deuxième neurone. Autour de la 10^{ème} minute d'enregistrement, la rétine est perfusée avec une solution de dextran 20% +BSA 10 % pendant 10 minutes, puis à la 25^{ème} minute d'enregistrement la rétine est perfusée avec une autre solution de dextran 10 % + BSA 10% pendant 8 minutes.

Les échantillons sont placés à -90°C pendant au moins 48 heures en présence d'une solution organique d'acétone anhydre contenant 2% de tétr oxyde d'osmium (OsO_4).

Le tétr oxyde d'osmium permet de contraster et fixer les membranes lipidiques dans les cellules en interagissant avec les liaisons Carbone-Carbone des lipides insaturés lorsque la température est autour de -70°C .

Les échantillons subissent ensuite 2 étapes successives de réchauffement progressif :

- 1) de -90°C à -60°C ($1^{\circ}\text{C}/\text{h}$) puis stabilisation des échantillons à -60°C pendant 8 à 12 heures.
- 2) de -60°C à -30°C ($1^{\circ}\text{C}/\text{h}$) puis stabilisation des échantillons à -30°C pendant 8 à 12 heures.

Les échantillons sont ensuite lavés 5 fois 10 minutes à -30°C dans l'acétone pur avant d'être infiltrés par la résine.

L'étape d'infiltration se fait progressivement avec des concentrations croissantes d'épon dans l'acétone (1 :2, 1 :1, 2 :1). Les échantillons sont placés 2 heures en présence de chaque solution d'épon avant d'être mis dans une solution d'épon pure, 2 à 3 heures, en remontant la température pour éviter que l'épon ne durcisse. La dernière étape est réalisée à température ambiante.

La polymérisation de la résine est réalisée dans une étuve à 60°C pendant 24 heures.

2) Ultramicrotomie à température ambiante:

Après polymérisation de la résine, les échantillons sont sectionnés à l'ultramicrotome (Leica Microsystems, Vienne), puis les coupes sont récupérées sur des grilles ou sur lames. Elles sont ensuite contrastées pour être observées aux microscopes optiques et électroniques.

Pour l'observation au microscope optique, des coupes semi-fines de rétine (500 nm) sont collectées sur une lame (superfrost plus, Menzel-Gläser). Les coupes étalées par chauffage à 60°C sur plaque, sont contrastées au bleu de toluidine avant d'être montées entre lame et lamelle.

Pour l'observation au microscope électronique, des coupes ultrafines (70 à 100nm) sont collectées sur des grilles en cuivre 200 mesh (Agar scientific # G2450C). Les coupes sont contrastées pendant 5 minutes sur une goutte d'acétate d'uranyl 2% dans l'eau, déposée sur du parafilm (hydrophobe). Les grilles sont ensuite lavées 3 fois 5 minutes dans des gouttes d'eau avant d'être placées 2 minutes sur une goutte d'une solution contenant 2% de citrate

de plomb (Ultrastain 2, Leica). Les grilles sont lavées 3 fois 5 minutes dans différentes gouttes d'eau puis séchées avant d'être observées.

3) La tomographie électronique cellulaire :

C'est Radon qui en 1917 a déposé les préceptes de la tomographie par le principe de la projection, puis, à partir des années 1980, Koster et Baumeister ont développé la technique de tomographie électronique. Cette technique permet d'obtenir des informations tridimensionnelles des molécules présentes à l'intérieur des cellules de nos échantillons. Elle repose sur l'acquisition d'images en projection 2D de notre échantillon à différents angles d'inclinaison du porte objet. La reconstruction du volume de l'objet se fait par rétroprojection de l'ensemble de la série d'images inclinées (**figure 26**) (Baumeister et al., 1999; Koster et al., 1997; Lucic et al., 2005). Les différentes étapes d'acquisition d'un tomogramme sont illustrées sur la **figure 27**.

De façon préalable, les grilles sont mises en présence quelques minutes d'une solution aqueuse d'or colloïdal de 10 nm de diamètre (PAG-10, UMC Utrecht, Netherland). Les particules d'or déposées sur une face de la grille seront utilisées comme marqueur fiduciel pour l'alignement des images.

La grille est ensuite placée dans un microscope électronique équipé d'un canon à émission de champs fonctionnant à 200kV (Tecnai F20, FEI). L'acquisition des images digitales est réalisée sur une caméra CCD 2k (Gatan, Inc, Pleasanton, USA). Les images sont acquises à un grandissement de 29 000 x en mode champ clair. La grille est inclinée de -65° à $+65^\circ$ avec une incrémentation de 1° entre chaque acquisition donnant un total de 131 images. Les images sont collectées automatiquement à chaque angle d'inclinaison à l'aide du logiciel Xplore 3D (FEI compagnie).

Les images de la série inclinée sont ensuite pré-alignées en utilisant la corrélation croisée et la reconstruction 3D est réalisée par la méthode de rétroprojection pondérée ou par la méthode de SIRT (*Simultaneous Iterative Reconstruction Technique*). L'alignement et la reconstruction sont exécutés soit à l'aide du logiciel Inspect 3D (FEI compagnie), soit avec le logiciel IMOD (<http://bio3d.colorado.edu/imod/>).

Une fois le volume 3D reconstruit, un filtre à bande passante (passe-bas) de $1/10\text{nm}^{-1}$ est appliqué sur le tomogramme et l'interprétation de surface est réalisée par seuillage des

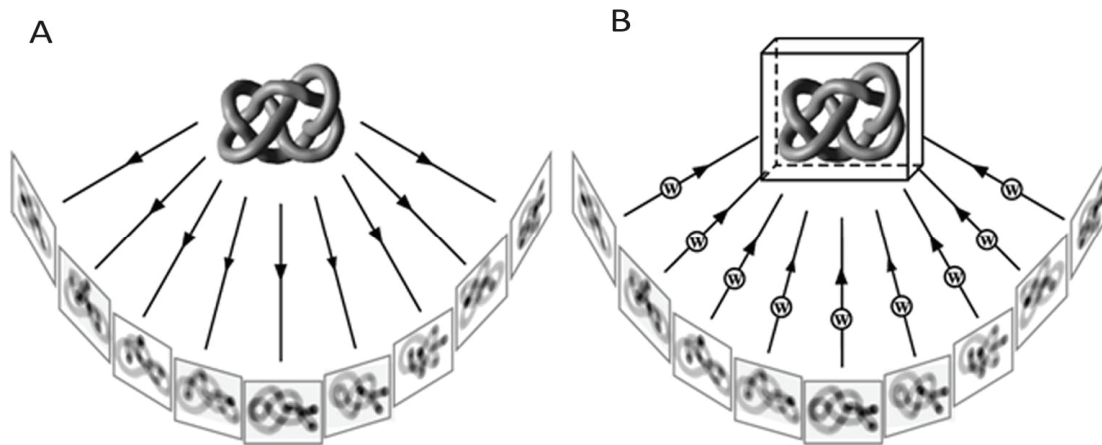


Figure 26 : Principe de la tomographie.

A) Les projections 2D de l'objet sont acquises à différents angles par inclinaison du porte objet.

B) La reconstruction 3D de l'objet est obtenue par rétroprojection des images 2D (d'après (Baumeister et al., 1999)).

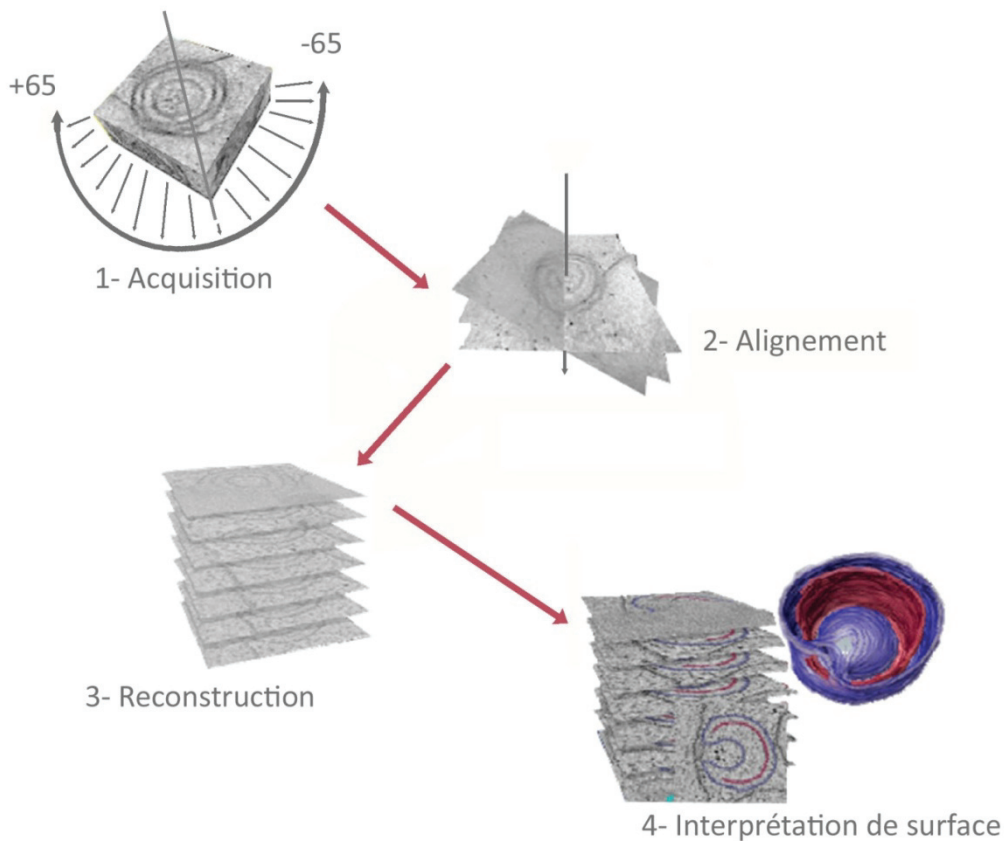


Figure 27 : Les différentes étapes de la tomographie électronique cellulaire.

1) L'acquisition de la série d'images par inclinaison du porte objet de +65° à -65° est réalisée avec le logiciel Xplore 3D (FEI compagnie). 2) L'alignement des images et 3) La reconstruction du volume, sont effectuées avec le logiciel Inspect 3D (FEI, compagnie) 4) L'interprétation de surface par seuillage des niveaux de gris est réalisée avec le logiciel Chimera (Geerts et al., 2008).

niveaux de gris en utilisant le logiciel Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>). Une recherche de pic de haute intensité permet de localiser dans le volume les particules denses aux électrons séparées par une distance minimale de 12nm. Enfin, pour la modélisation, une sphère de 12nm de diamètre a été placée au niveau de chaque pic trouvé.

4) La méthode stéréologique :

Cette méthode permet d'estimer des fractions volumiques à partir d'images de projection 2D (Griffiths 1993). Cette méthode a été utilisée pour déterminer la portion du volume nucléaire occupée par les différents compartiments de chromatine. Pour ce faire le noyau de bâtonnet est considéré comme une sphère constituée de différents compartiments concentriques. Les compartiments concentriques allant de l'intérieur vers l'extérieur du noyau sont : le cœur d'hétérochromatine, l'euchromatine et l'hétérochromatine associée à la membrane nucléaire.

Pour estimer le volume d'un noyau de bâtonnet, la surface de 20 noyaux a été mesurée. Les mesures de surface forment un pic qui correspond à la surface moyenne d'un noyau lorsque ce dernier est sectionné en son centre. A partir des données de surface, le volume moyen d'un noyau de bâtonnet a pu être calculé.

Pour estimer la fraction du volume occupée par un compartiment donné, la méthode stéréologique considère que le volume occupé par un compartiment est proportionnel à la surface occupée par ce même compartiment. La surface des différents compartiments de chromatine est déterminée par seuillage des intensités sur des images filtrées avec le logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La surface du compartiment central d'hétérochromatine est utilisée pour déterminer le rayon moyen du compartiment d'hétérochromatine et calculer le volume occupé par l'hétérochromatine dans le noyau. L'hétérochromatine est considérée comme associée à l'enveloppe nucléaire lorsqu'elle est présente dans une bande concentrique située à 150 nm de l'enveloppe nucléaire. Le volume de la bande concentrique est calculé et multiplié par la fraction de la surface occupée par l'hétérochromatine pour obtenir le volume d'hétérochromatine associé à la membrane nucléaire.

III. Les techniques d’immunocytochimie :

1) Préparation des échantillons :

Les échantillons de rétines dédiés à l’immunocytochimie sont préparés par cryosection (technique de Tokuyasu (Tokuyasu, 1973)).

Après dissection des rétines sous la loupe binoculaire, de petits blocs de tissu d’environ 1mm³ sont découpés. Les blocs de rétine sont fixés chimiquement pendant 1 heure sous agitation à température ambiante, dans une solution contenant 2.5 % de formaldéhyde (EMS # 15680) et 0.1% de glutaraldéhyde (EMS # 16200) dans du PBS 0.1M phosphate, 150mM sels, pH7.4.

Les blocs de rétine sont ensuite rincés 3 à 4 fois avec une solution contenant 50 mM de glycine (Sigma # 74834) dilué dans le PBS pour neutraliser les groupements aldéhydes libres.

Les échantillons sont cryoprotégés par imprégnation dans une solution de sucrose 2.3M (Backer # 0334) dilué dans du PBS, pendant au moins 2 heures à 4°C sous agitation.

Chaque bloc de rétine cryoprotégé, est monté sur un porte objet (en forme de clou) à 4°C pour éviter le dessèchement de l’échantillon. L’excès de sucrose est absorbé à l’aide d’un papier filtre. L’échantillon est rapidement congelé sur le clou par immersion dans l’azote liquide. Il est également possible de le placer directement dans la cuve de l’ultramicrotome préalablement refroidie à -130°C.

Les échantillons ainsi préparés peuvent être stockés dans l’azote liquide et conservés des mois voire des années avant d’être sectionnés.

2) Cryo-ultramicrotomie :

Les échantillons congelés sont coupés au cryo-ultramicrotome (ultracut UC6, Leica Microsystems, Vienne). L’échantillon est tout d’abord « trimé » ou « dégrossi » à -90°C, avec un couteau « cryotrim » en diamant (Diatome, Suisse), pour que la surface à sectionner forme un carré d’environ 1 mm de côté.

Des coupes semi-fines (500 nm) sont récupérées, contrastées au bleu de toluidine et observées au microscope photonique notamment pour se repérer dans le tissu et être certain que l’on retrouve bien les cellules d’intérêts dans les sections.

Les coupes ultrafines (100 nm) sont réalisées à -130°C, avec un couteau en diamant (Diatome, Suisse) et récupérées à l’aide d’une « perfect loop » (Diatome, Suisse) dans une goutte de sucrose 2.3M.

Les coupes enrobées, toujours hydratées sont ensuite réchauffées à température ambiante, puis placées soit : - sur une grille en nickel recouverte de Formwar et de Carbone pour réaliser des immunomarquages, révélés à l’or colloïdal, pour la microscopie électronique, soit : - sur une lame (superfrost plus, Menzel-Gläser) de microscope photonique pour contraster les coupes au bleu de toluidine ou détecter les protéines par immuno-florescence.

3) Immunomarquages :

Les immunomarquages révélés à l’or colloïdal, sont réalisés dans l’automate d’immunomarquage IGL (*immuno-gold labelling*, Leica-Microsystem). Les immunomarquages révélés par des fluorochromes, sont réalisés à la main, en parallèle. La procédure d’immunomarquage, que ce soit pour la photonique ou pour l’électronique, reste rigoureusement la même, seul le système de détection est différent. De façon générale, chaque anticorps primaire est préalablement testé en microscopie optique avant de réaliser les immunomarquages pour la microscopie électronique.

Les groupements aldéhydes libres résiduels sur les coupes sont bloqués par 2 lavages successifs de 5 minutes chacun, dans une solution contenant 50 mM de glycine dilué dans du PBS.

Les sites aspécifiques sont ensuite bloqués pendant 10 minutes par une solution contenant 1% de BSA dans du PBS 1 X, puis les sections sont lavées 2 fois 2 minutes dans une solution contenant 0.1% de BSA acétylée (Aurion BSA-c™ 900.022) diluée dans du PBS 1X.

Les sections sont incubées 20 minutes en présence de l’anticorps primaire préalablement dilué dans une solution de PBS contenant 1% de BSA. L’ensemble des anticorps primaires utilisés sont décrits dans **le tableau 4**.

Anticorps primaires	Production	Origine/Ref	Dilution
Anti-H3K9 acétylé	Polyclonal de lapin	Millipore 07-352	1/200
Anti-H3K9K14 acétylé	Polyclonal de lapin	Millipore 06-599	1/200
Anti-H3K14 acétylé	Polyclonal de lapin	Millipore 07-353	1/200
Anti-H4K8 acétylé	Polyclonal de lapin	Abcam ab15823	1/200
Anti-H4 acétylé	Polyclonal de lapin	Millipore 06-866	1/200
Anti-H3K9 triméthylé	Polyclonal de lapin	Diagenode 056-050	1/200
Anti-H3K27 triméthylé	Polyclonal de lapin	Millipore 07-449	1/200
Anti-H4K20 triméthylé	Polyclonal de lapin	Abcam Ab9053	1/200
Anti-H3K4 monométhylé	Polyclonal de lapin	Abcam Ab8895	1/200
Anti-H3K4 triméthylé	Polyclonal de lapin	Diagenode	1/200
Anti-RNA pol II	Monoclonal de souris	Maison 1PB7C2	1/10000
Anti-RNA pol II cloneH5	Monoclonal de souris	Covance MMS-129R	1/100
Anti-H3 CT pan A3S	Monoclonal de souris	Millipore 05-928	1/200
Anti-histone H2B	Monoclonal de souris	Maison LG11-2	1/200

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires.

Les sections sont ensuite lavées 4 fois 2 minutes, dans une solution contenant 0.1% de BSA-c™ (Aurion) dans du PBS 1X.

La solution de BSA acétylée est utilisée pour éliminer le bruit de fond lié aux phénomènes de charges donc les sections sont incubées 20 minutes en présence de l’anticorps secondaire préalablement dilué dans une solution de PBS contenant 0.1% de BSA-c™. L’ensemble des anticorps secondaires utilisés est décrit dans **le tableau 5**.

Anticorps secondaires	Production	Origine/Ref	Dilution
Anti-IgG (H+L) de lapin couplé à l’or ultra-small	chèvre	Aurion 800.022	1/25
Anti-Ig (G+M) de souris couplé à l’or ultra-small	chèvre	Aurion 800.044	1/25
Protéine A couplé à l’or 10 nm (PAG)	chèvre	Utrecht university A-Gold-10	1/70
Anti-IgG (H+L) de lapin couplé à l’alexa 488	chèvre	Invitrogen A11008	1/500
Anti-Ig (H+L) de souris couplée à l’alexa 488	chèvre	Invitrogen A11001	1/500

Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires.

Les sections sont ensuite lavées 4 fois 5 minutes, dans une solution contenant 0.1% de BSA[™] (Aurion) diluée dans du PBS 1X, puis lavées 4 fois 2 minutes dans une solution de PBS 1X.

Pour stabiliser le complexe anticorps-antigènes, il est nécessaire de fixer chimiquement les coupes pendant 5 minutes en présence d’une solution de 0.5% de glutaraldéhyde diluée dans du PBS. Les coupes sont ensuite lavées 2 fois 2 minutes dans le PBS 1X et 5 fois 1 minute dans l’eau milliQ. Les sections sont toujours dans un stade hydratées et ne doivent pas sécher.

Après l’immunomarquage, les sections sur lame qui seront observées au microscope optique sont contrastées au DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole) (1 µg/ml, Sigma) pendant 5 minutes puis lavées 3 fois 2 minutes dans du PBS 1X, avant d’être montées entre lame et lamelle à l’aide d’Aqua-Polymont (Polysciences # 18606-20). Les lames sont ensuite observées au microscope épifluorescent Leica DM400B équipé d’une caméra Cool Snap HQ (Roper).

Les immunomarquages révélés à l’or colloïdal ultra-small doivent subir une amplification à l’argent pour que les particules d’or sub-nanométriques puissent être visibles au microscope électronique. Pour augmenter la taille des particules d’or, les grilles sont placées 30 minutes dans une solution d’amplification à l’argent R-Gent[™] (Aurion). Cette étape a pour but de déposer des molécules d’argent autour des colloïdes pour obtenir des particules denses aux électrons dont la taille est en moyenne de 10 nm de diamètre. La réaction d’amplification à l’argent dépend du temps de la réaction, de la quantité des réactifs utilisés et de la température. Les grilles sont ensuite rincées abondamment (5 fois 5 minutes dans l’eau milliQ).

Les coupes sont enfin contrastées et enrobées dans une solution contenant 4 volumes de méthyle cellulose (Sigma-Aldrich # M-6385) à 2% dans le PBS et 1 volume d’acétate d’uranyle à 2 % dans l’eau pendant 5 minutes sur la glace. A basse température, le méthyle cellulose reste fluide évitant d’avoir une couche de méthyle cellulose trop épaisse autour des coupes. De plus, l’excès de méthyle cellulose est absorbé délicatement sur un papier filtre pour obtenir un film d’enrobage très fin autour des coupes. Chaque grille est ensuite placée dans une oese montée sur manche, pour être séchée à l’air, et les grilles sont

désolidarisées de l’oese avant d’être observées au microscope électronique à transmission Philips CM 120 fonctionnant à 100 kV à l’aide d’une caméra CCD 2k (Gatan Inc, Pleasanton, USA).

4) Optimisation de l’immuno-détection des protéines nucléaires :

Dans le but d’augmenter au maximum la sensibilité de détection des protéines nucléaires, j’ai testé deux immuno-réactifs différents : la protéine A couplée à des particules d’or de 10 nm de diamètre (PAG : Protein A Gold) et des anticorps secondaires spécifiques couplés aux particules d’or sub-nanométriques (Ultra-small) (Aurion).

Les immuno-réactifs sont rigoureusement utilisés dans les mêmes conditions d’immunomarquage (décrites ci-dessus). La sensibilité de détection et la densité de marquage sont beaucoup plus importantes lorsque les anticorps primaires sont révélés à l’or Ultra-small comparé à l’utilisation de la PAG (**figure 28**). La détection des histones modifiées avec l’Ultra-small permet de mettre en évidence des profils de distribution spécifique de ces protéines dans les noyaux. Ce niveau de résolution du marquage est perdu si je révèle les mêmes protéines avec la PAG.

De plus, la densité de marquage des histones dans les noyaux, dépend fortement de l’utilisation de la BSA acétylée (BSA-c™, Aurion) dans les solutions d’incubation et de lavage.

L’utilisation de BSA-c est recommandée pour diminuer le bruit de fond et les marquages non-spécifiques liés aux interactions hydrophiles entre les immuno-réactifs chargés négativement et les charges positives présentent à la surface de l’échantillon. En effet, la BSA une fois acétylée, est chargée négativement, elle rentre alors en compétition avec les particules d’or colloïdal pour se fixer sur les sites non spécifiques poly-cationiques présents dans l’échantillon.

La surface des noyaux est fortement chargée négativement, il y a donc peu ou pas de bruit de fond lié aux interactions hydrophiles. Cependant, l’utilisation de la BSA normale à la place de la BSA acétylée, diminue de façon drastique l’efficacité de détection des protéines (**figure 29**). Et bien que les histones soient des protéines nucléaires chargées positivement qui devraient normalement attirer les particules d’or colloïdal conjuguées, il n’y a que très

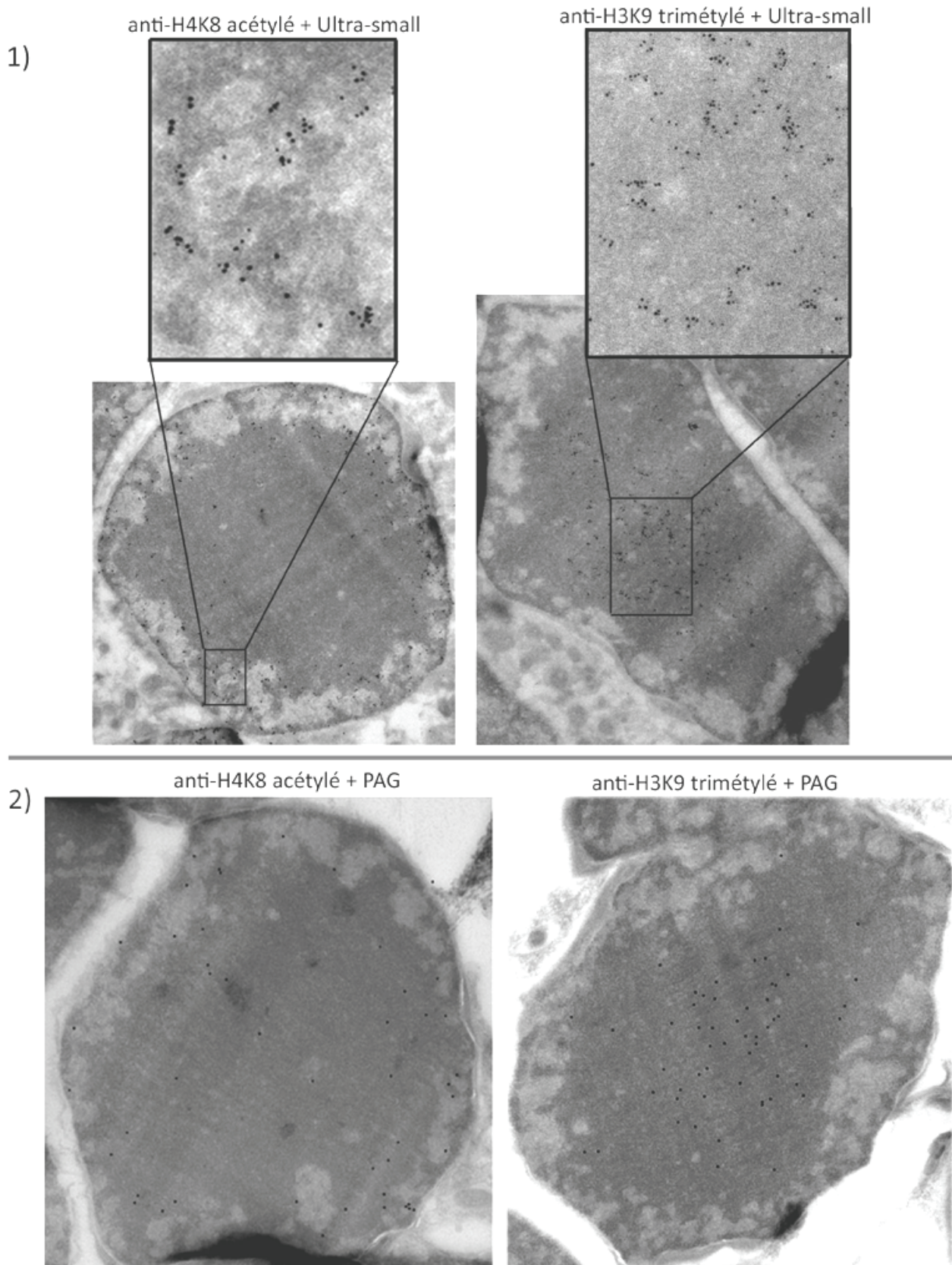


Figure 28 : Immuno-détection des histones modifiées dans les noyaux de bâtonnets.

1) Les anticorps primaires (anti-H4K8 acétylé et anti-K3K9 triméthylé) sont révélés avec un anticorps secondaire spécifique couplé à l’or sub-nanométrique (Ultra-small).

2) Les mêmes anticorps primaires sont immuno-marqués dans les mêmes conditions expérimentales qu’en 1) mais révélés avec la protéine A couplée aux particules d’or de 10nm de diamètre (PAG).

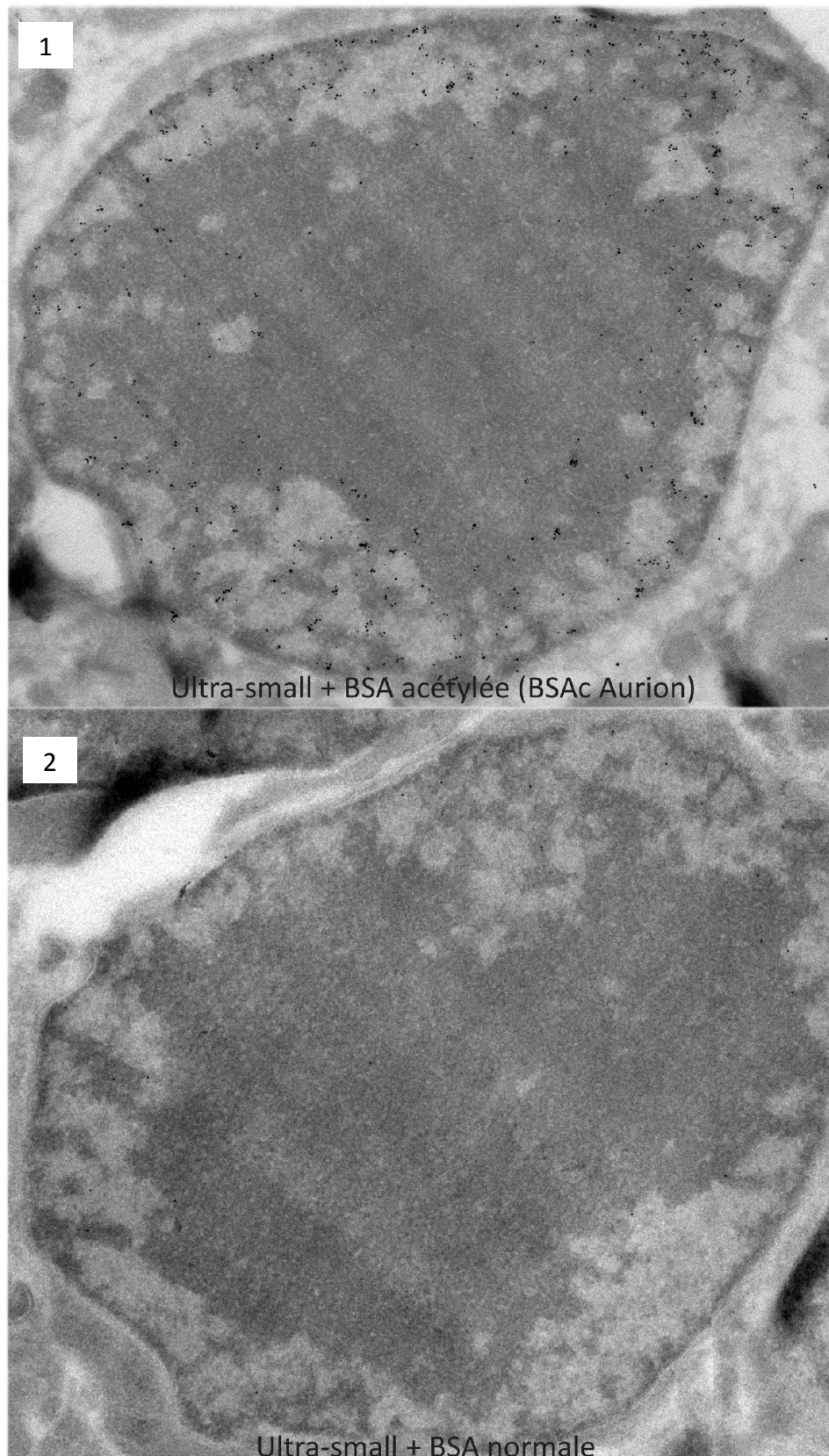


Figure 29 : Immuno-détection de l'histone H4 acétylée.

L'immunomarquage est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales en présence de BSA acétylée (1) ou de BSA normale (2).

peu de marquage en absence de BSA acétylée.

L’utilisation de la BSA acétylée (BSA-c™, Aurion) est donc fortement recommandée pour l’immuno-détection des histones et autre protéines nucléaires présentes à la surface des noyaux chargés négativement.

5) Quantification des particules d’or :

Pour chaque expérience d’immunomarquage, le nombre de particules d’or par μm^2 est déterminé sur une vingtaine de noyaux.

Pour ce faire, les régions d’intérêts sont délimitées et leur surface est mesurée à l’aide du logiciel ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Les images sont ensuite filtrées avec un filtre à bande passante et le comptage des particules se fait de façon automatique en utilisant un algorithme de recherche des pics de hautes intensités (Imaging Science, Berlin Germany).

IV. Les techniques de biochimie :

1) Extraction acide des histones de rétine:

Les histones sont des protéines basiques extraites des rétines par une méthode d’extraction acide. Cette extraction permet de récupérer la majorité des protéines basiques présentes dans notre tissu.

Après dissection, chaque rétine est broyée dans un tube Eppendorf et 600 μl de tampon de lyse (10mM HEPES, 1.5mM MgCl_2 , 10mM KCl, 1.5mM PMSF et 0.5mM DTT) sont ajoutés dans chaque tube. Le tampon de lyse est supplémenté en sodium butyrate (5mM) qui est un inhibiteur des enzymes histone-déacétylases.

Le lysat de rétine est homogénéisé au vortex puis dans chaque tube, 150 μl d’une solution d’acide chlorhydrique 1N sont ajoutés. Les rétines sont incubées dans cette solution pendant 30 minutes sur la glace.

Les tubes sont ensuite centrifugés à 11 000 g, pendant 10 minutes à 4°C.

Le surnageant qui contient les histones est dialysé 2 fois 1 heure à 4 °C contre une solution d’acide chlorhydrique 0.1 N aqueuse, puis toute la nuit contre l’eau.

Les protéines extraites sont ensuite dosées suivant la technique de Bradford par un dosage d'une solution de protéines extraites/Protein Assay (Biorad) 1 :1000 en prenant la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 280 nm.

Les solutions protéiques extraites des rétines sont stockées à -80°C avant utilisation.

2) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et Western Blot :

Le gel de polyacrylamide est composé de deux parties :

- Le haut étant un gel de concentration (12.5 mM Tris-HCl pH 6.8 à 25°C ; 0.1% SDS ; 4.38% acrylamide ; 0.04% bis-acrylamide ; 0.05% persulfate d'ammonium ; 0.1% TEMED) qui amène toutes les protéines au même niveau pendant la migration.

- Le bas étant le gel de séparation à proprement parlé, à 15% de polyacrylamide (0.375mM Tris-HCl pH 8.8 à 25°C ; 0.1% SDS ; 14.59% acrylamide; 0.41% bis-acrylamide ; 0.0625% persulfate d'ammonium ; 0.1% TEMED) qui sépare les protéines selon leur taille.

Les échantillons protéiques extraits des rétines sont dénaturés 5 minutes à 100°C dans une solution de dépôt (25mM Tris-HCl pH 6.8 à 25°C ; 10% glycérol ; 1% SDS ; 0.05% bleu de bromophénol) avant d'être chargés sur le gel (~1µg de protéine par puits). La migration s'effectue en présence de tampon de migration (25mM Tris-HCl ; 192mM Glycine ; 1% SDS) à 200 Volts et 70 mA.

Les protéines dans le gel sont ensuite soit fixées et colorées au bleu de Coomassie soit transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert se fait à 200 Volts et 150 mA pendant 45 minutes dans du tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine).

Pour bloquer les sites de fixation non-spécifiques, la membrane de nitrocellulose est incubée 2 heures dans une solution contenant 5% de BSA et 0.1% de tween20 dans du PBS 1X.

La membrane de nitrocellulose bloquée est incubée la nuit à 4°C avec la solution d'anticorps primaires dirigés contre les histones (anti-H3K9 acétylée, anti-H3K9K14 acétylée, anti-H3K14 acétylée et anti-H2B voir **tableau 3**). Les anticorps primaires sont dilués au millième dans une solution contenant 1% de BSA dans du PBS 1X. Après 5 lavages successifs de 5 minutes dans du détergent (0.1% de Tween20 dans du PBS 1X), la membrane de nitrocellulose est incubée pendant 1 heure à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire de chèvre couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories). L'anticorps secondaire est dilué au 1/20000 dans une solution contenant 1%

de BSA dans du PBS 1X. La membrane est ensuite lavée pendant 20 minutes dans 4 bains successifs dans une solution de 0.1% de Tween20 diluée dans du PBS 1X.

Les protéines marquées sont révélées par chimioluminescence en présence du substrat de la peroxydase (Kit ECL, Amersham). La révélation est faite soit sur un film autoradiographique (Kodak) soit directement par le système ChemiDoc XRS (BIORAD) équipé d'une chambre noire et d'une caméra CCD.

Les bandes sont quantifiées avec le logiciel Quantity One (BIORAD).

3) Analyse de protéine par spectrométrie de masse :

Les protéines séparées selon leur taille après migration sur gel de polyacrylamide peuvent être analysées par spectrométrie de masse.

Les opérations suivantes sont réalisées dans une pièce « blanche ». La bande d'intérêt est découpée puis placée dans un tube Eppendorf, lavée de façon successive par deux solutions alternées, (volume à évaluer de façon à largement immerger les bandes) : première solution 25 mM carbonate d'ammonium, puis agitation 5 min sur un vortex à plateau, puis deuxième solution acétonitrile, puis agitation 5 min sur un vortex à plateau. Ces deux étapes de lavage sont répétées 3 fois. Le reste d'acétonitrile du dernier lavage est éliminé par évaporateur rotatif (speedvac) pendant 10 min. La bande est ensuite placée dans une solution de réduction (10 mM DTT dans 25 mM carbonate d'ammonium) pendant 1h à 57°C. La solution de réduction est ensuite remplacée par une solution d'alkylation (55 mM Iodoacétamide dans 25 mM carbonate d'ammonium) pour une nouvelle incubation d'une heure à température ambiante et à l'obscurité.

Après cela, la bande est soumise de nouveau à trois cycles de lavages identiques aux précédents, puis séchée dans un évaporateur rotatif pendant 10 min. La solution de digestion (trypsine à 12,5 ng/μl dans 25 mM carbonate d'ammonium), est enfin ajoutée sur la bande, de façon à réhydrater complètement le gel et le recouvrir, sans pour autant être en excès. L'état de réhydratation doit être vérifié 20 min après l'ajout de la solution de digestion. La digestion est réalisée pendant la nuit à 37°C.

Les peptides résultant de la digestion enzymatique sont extraits du gel par ajout d'acétonitrile de façon à atteindre une concentration sur le gel de 30% puis par sonication pendant 15 min. Le surnageant est récupéré puis remplacé par une solution à 60% d'acétonitrile pour une seconde extraction de 15 min par sonication. Les deux fractions sont

regroupées et concentrées dans un évaporateur rotatif avant d'être analysées en MALDI-TOF.

Tout le travail de préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse ainsi que leur analyse a été réalisé par Frank Ruffenach du service de spectrométrie de masse de l'institut.

V. Analyse bioinformatique :

Les données transcriptomiques sur les rétines de souris normales et SCA7, utilisées au cours de mon travail de thèse sont issues des travaux réalisés au sein de l'institut, par le Docteur Gretta Abou-Sleymane dans l'équipe du Professeur Jean-Louis Mandel (Abou-Sleymane et al., 2006).

Au cours de mon doctorat, ces données ont été soumises à une nouvelle analyse bioinformatique (compte tenu du développement de nouveaux logiciels d'analyse) dans le but de mettre en évidence des gènes différemment exprimés dans les rétines de souris SCA7 par rapport aux rétines de souris normales. Une nouvelle liste de gènes a ainsi pu être générée présentée dans **le tableau 5** en annexe.

L'ensemble de l'analyse bioinformatique est réalisé au sein de l'institut par le Docteur Wolfgang Raffelsberger en combinant une analyse par l'algorithme GCRMA (*Guanine Cytosine Robust Multi-Array Analysis*) (Wu Zhijin et al., 2004) et une analyse dChip (*DNA-Chip Analyser*) (Cheng and Hung, 2003).

RESULTATS

RESULTATS

I. Première partie :

**Etude *in vivo* de l'organisation
structurale de la chromatine des
photorécepteurs de souris corrélée
aux modifications des histones et à
l'activité transcriptionnelle.**

La première partie de mon travail de thèse concerne l'organisation structurale de la chromatine des noyaux de bâtonnets dans la rétine de souris normale. Le but de cette étude est de corrélérer *in vivo* l'organisation structurale de la chromatine avec la distribution des modifications post-traductionnelles des histones et l'activité transcriptionnelle.

Pour réaliser cette étude, j'ai utilisé des méthodes de pointe de cryo-préparation des échantillons pour la microscopie électronique. J'ai optimisé ces méthodes pour l'étude spécifique des noyaux de bâtonnets de la rétine de souris afin d'obtenir une préservation optimale, proche de l'état natif, de la structure de la chromatine. J'ai ainsi pu déterminer la structure tridimensionnelle de la chromatine dans différents territoires nucléaires par des expériences de tomographie électronique et, j'ai localisé les modifications post-traductionnelles des histones et les molécules d'ARN polymérase II dans les noyaux de bâtonnets par des expériences d'immunomarquage à l'or colloïdal.

Mon modèle d'étude est le noyau de photorécepteur de type bâtonnet. Ce noyau présente une organisation très particulière de la chromatine avec, au centre, un grand territoire d'hétérochromatine hautement compacté entouré d'un mince territoire d'euchromatine périphérique.

Mes résultats ont permis de mettre en évidence dans ces noyaux deux niveaux distincts d'organisation du territoire d'hétérochromatine. Un premier domaine central d'hétérochromatine avec une texture homogène où les fibres individuelles de chromatine condensée ne sont pas détectées et aucun signal n'est révélé sur la transformée de Fourier. Ce territoire d'hétérochromatine centrale pourrait correspondre à la chromatine sous forme d'un cristal liquide dans lequel les fibres de chromatines condensées interagissent les unes avec les autres pour former « une mer de nucléosome ». Le deuxième domaine d'hétérochromatine périphérique avec une texture granuleuse, révèle un signal fort de $1/30 \text{ nm}^{-1}$ sur la transformée de Fourier. Ce signal pourrait correspondre à l'organisation de la chromatine condensée en fibre individuelles de 30 nm de diamètre. La détection d'un signal à 30 nm n'a jamais été observée auparavant en microscopie électronique et dépend certainement du haut niveau de compaction présent dans ces noyaux.

Les expériences d'immunomarquage à l'or colloïdal ont permis de diviser le territoire d'hétérochromatine en trois compartiments concentriques caractérisés chacun par une combinaison spécifique de modifications post-traductionnelles des histones. De façon

surprenante, le domaine d'hétérochromatine le plus externe est fortement condensé mais particulièrement riche en histones acétylés. Dans ce cas précis, l'acétylation des histones qui est communément associée à une chromatine décondensée transcriptionnellement active n'est pas suffisante pour décondenser la chromatine.

Le territoire d'euchromatine présente également différents degrés de compaction de la chromatine avec des zones de chromatine condensée et des fibres de chromatine complètement décondensées. Les expériences de tomographie électronique ont permis de mettre en évidence des fibres de chromatine complètement décondensées de 10 nm de diamètre dans lesquelles les nucléosomes individuels ont pu être détectés. Ce compartiment riche en histones acétylés comprend les sites actifs de transcription. Les expériences d'immunomarquage ont permis de mettre en évidence dans ce compartiment les molécules d'ARN polymérase active qui sont préférentiellement localisées à une distance de 30 nm du bord de l'hétérochromatine fortement condensée et hyper-acétylée. Ces résultats suggèrent que l'interface entre l'euchromatine et l'hétérochromatine joue un rôle important pour l'organisation de la transcription dans les noyaux.

L'ensemble de ces résultats offre un point de vue original de l'organisation structurale de la chromatine *in vivo*. La cartographie précise, à la résolution du nucléosome, des modifications d'histones et des sites actifs de transcription a pu être corrélée *in cellulo* à l'organisation tridimensionnelle de la chromatine. Ces résultats démontrent que l'acétylation des nucléosomes n'est pas suffisante pour décondenser la chromatine et suggère l'importance d'autres facteurs tels que l'histone H1 pour assurer cette décondensation. Ces résultats sont publiés dans le journal PLoS ONE <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0011039>.

TITLE :

IN VIVO CHROMATIN ORGANIZATION OF MOUSE ROD PHOTORECEPTORS
CORRELATES WITH HISTONE MODIFICATIONS

KEY WORDS :

Histone post transcriptional modifications, cryo electron microscopy, electron tomography,
photoreceptors, immunolabelling, chromatin structure

AUTHORS :

Caroline Kizilyaprak¹, Danièle Spehner¹, Didier Devys² and Patrick
Schultz^{1,3}

ADDRESSES :

1. Department of Structural Biology and Genomics,
 2. Department of Functional Genomics
- IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire)
INSERM, U964 ; CNRS / Université de Strasbourg, UMR7104
1, rue Laurent Fries, BP10142
67404 Illkirch, France
3. Corresponding author e-mail : patrick.schultz@igbmc.u-strasbg.fr

Abstract

Background: The folding of the genetic information into chromatin plays important regulatory roles in many nuclear processes and particularly in gene transcription. Post translational histone modifications are associated with specific chromatin condensation states and with distinct transcriptional activities. The peculiar chromatin organization of the rod photoreceptor nuclei, with a large central domain of condensed chromatin surrounded by a thin border of extended chromatin was used as a model to correlate *in vivo* chromatin structure, histone modifications and transcriptional activity.

Methodology: We investigated the functional relationships between chromatin compaction, the distribution of histone modifications and the location of RNA polymerase II in intact murine rod photoreceptors using cryo-preparation methods, electron tomography and immunogold labeling. Our results show that the characteristic central heterochromatin of rod nuclei is organized into concentric domains characterized by a progressive loosening of the chromatin architecture from inside towards outside and by specific combinations of silencing histone marks. The peripheral heterochromatin is formed by closely packed 30nm fibers as revealed by a characteristic optical diffraction signal. Unexpectedly, the still highly condensed most external heterochromatin domain contains acetylated histones, which are usually associated with active transcription and decondensed chromatin. Histone acetylation is thus not sufficient *in vivo* for complete chromatin decondensation. The euchromatin domain contains several degrees of chromatin compaction and the histone tails are hyperacetylated, enriched in H3K4 monomethylation and hypo trimethylated on H3K9, H3K27 and H4K20. The transcriptionally active RNA polymerases II molecules are confined in the euchromatin domain and are preferentially located at the vicinity of the interface with heterochromatin.

Conclusions: Our results show that transcription is located in the most decondensed and highly acetylated chromatin regions, but since acetylation is found associated with compact chromatin it is not sufficient to decondense chromatin *in vivo*. We also show that a combination of histone marks defines distinct concentric heterochromatin domains.

Introduction

Gene expression is regulated at the transcriptional level by a variety of trans-acting factors that bind to specific promoter elements to elicit transcription initiation in response to intra- and extra-cellular signals. Only a fraction of the genome is competent for factor binding and the way DNA is wrapped into chromatin regulates its accessibility thus participating actively in the regulation of gene expression (Wu et al., 2006). In eukaryotes, DNA is packaged through a hierarchy of folding events. In the first level 146 bp of DNA are wrapped in a negative supercoil around an octamer of four pairs of the core histones H2A, H2B, H3 and H4 to form the core nucleosome whose structure is defined at the atomic level (Luger et al., 1997a). The fundamental repeated element of chromatin, the nucleosome, is composed of the core particle, linker DNA whose species-dependant average length varies between 11 to 94 bp and the linker histone H1. In low ionic strength purified chromatin appears as an extended 11 nm fiber formed by a linear beads-on-a-string nucleosomal array that compacts into 30 nm fibers in physiological ionic strength and in the presence of histone H1 (Bassett et al., 2009; Oudet et al., 1975; Thoma and Koller, 1977). *In vitro* reconstituted or purified 30 nm fibers are flexible and organized into imperfect helical structures (Woodcock et al., 1993). Direct electron microscopy imaging of nuclear sections described highly compact electron dense heterochromatin (HC) compartments and more extended euchromatin (EC) territories but has provided little information on the organisation of chromatin beyond the nucleosomal level and in particular has not confirmed the 30 nm fibers as the fundamental secondary structure of chromatin in intact nuclei (Horowitz-Scherer and Woodcock, 2006) (Bouchet-Marquis et al., 2006).

This structural definition partially overlaps the biochemical and functional description of chromatin, which is separated into EC and HC on the basis of nuclease accessibility, histone modifications and transcriptional activity (Schneider and Grosschedl, 2007). Transcribed genes are found associated with accessible and more readily digested EC whereas nuclease resistant HC is believed to be more compact and associated with transcriptional repressed states (Weintraub and Groudine, 1976; Yaniv and Cereghini, 1986), (Bellard et al., 1978). The structural origin of this increased accessibility is not fully understood and was recently challenged by the finding that coding sequences in general are more nuclease sensitive regardless of their transcriptional activity (Gilbert et al., 2004).

Moreover, specific post translational modifications of the core histones are associated with characteristic transcriptional states of the genome a finding which has led to the histone code concept (Jenuwein and Allis, 2001). Lysine acetylation almost always correlates with active transcription and is believed to act by neutralizing the repulsive charge interaction between DNA and the histone tails (Liu et al., 2005) and by recruiting specific chromatin associated proteins such as the nucleosome remodeling complex SWI/SNF (Hassan et al., 2002), histone acetyl transferases (Zeng and Zhou, 2002) or the general transcription factor TFIID (Mujtaba et al., 2007). Lysine methylation is associated with distinct transcriptional states depending on which residue is modified (Berger, 2007). Methylation of histone H3 lysine 4 (H3K4) or lysine 36 (H3K36) is related to transcribed chromatin whereas H3K9, H3K27 and H4K20 trimethylation generally correlate with transcriptional repression. Methylated H3K9 and H3K27 are bound by HP1 and Polycomb, respectively, which mediate chromatin compaction (Margueron et al., 2005).

Sedimentation studies on recombinant nucleosomal arrays were performed to explore the link between chromatin condensation and histone modifications and showed that acetylation of H4K16 inhibits the formation of 30 nm fibers (Shogren-Knaak et al., 2006). This observation is consistent with the concept that acetylation of the N-terminal tails of core histones may affect inter-nucleosomal interactions. However direct electron microscopic inspection of reconstituted chromatin fragments reveals that core histone acetylation is not sufficient to generate an open chromatin structure and that histone H1 plays a key role in this process (Robinson et al., 2008). A correlation between chromatin compaction and histone tail modifications has not been demonstrated *in vivo* at the ultrastructural level.

The aim of this study was to correlate the packing of chromatin, the transcriptional activity and the distribution of histone tail modifications in sections of cell nuclei. Here murine rod photoreceptors were investigated by electron tomography and immunolabelling to study these correlations. Mouse rod cells have an extremely dense HC domain located at the centre of the nucleus and a small EC territory placed at its periphery, close to the nuclear envelope (Carter-Dawson and LaVail, 1979). These highly differentiated cells have packaged most of their DNA into HC but still express all house-keeping genes and undergo robust

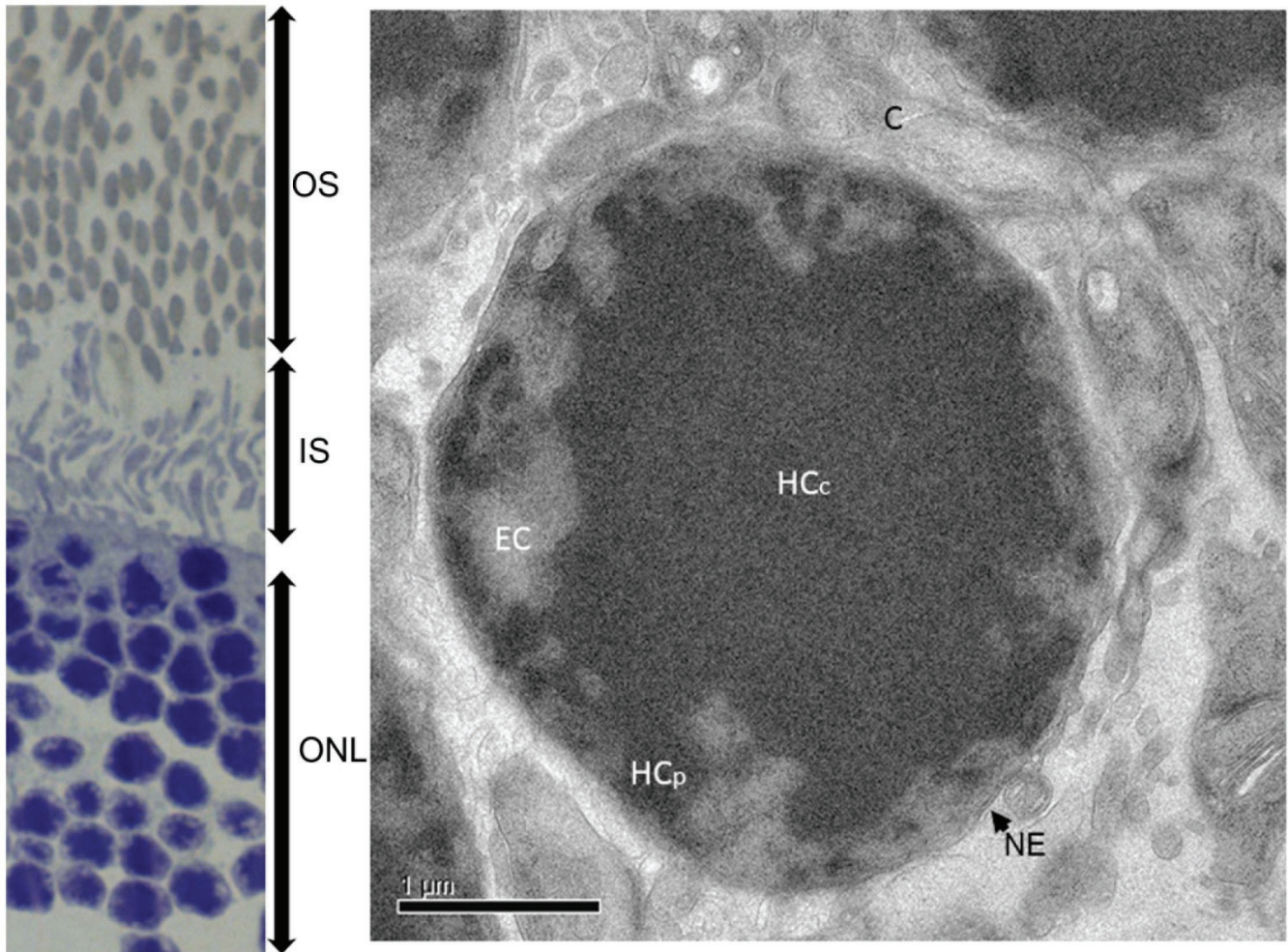


Figure 30 : Ultrastructure of the rod photoreceptor nuclei.

(A) General organization of the photoreceptor within the retina viewed by light microscopy after toluidin blue staining. ONL: Outer nuclear layer, IS: inner segments, OS: outer segments. (B) Overall view of high pressure frozen, cryo substituted rod photoreceptor nucleus observed by electron microscopy. C: Cytoplasm, EC: euchromatin, HCc: central Heterochromatin, HCp: nuclear envelope associated heterochromatin, NM nuclear envelope.

transcription of specific genes involved in the visual signal transduction pathway (Blackshaw et al., 2001) (Abou-Sleymane et al., 2006). Our findings show that nucleosomes are hyperacetylated, show higher levels of monomethylation on H3K4 and are hypomethylated on H3K9, H3K27 and H4K20 in euchromatin, and that fully extended and partially condensed chromatin fibres are associated with these modifications. The RNA polymerase II molecules are detected only in the EC territory and frequently at a fixed distance from the EC/HC interface which plays a role in the organization of transcription units. The HC compartment contains tightly packed chromatin which is organized into 30nm fibers at the periphery and into an amorphous phase in the central part. Heterochromatin nucleosomes are generally hypoacetylated and hypermethylated on H3K9, H3K27 and H4K20 however a densely packed HC territory was found hyperacetylated at the EC/HC interface thus challenging the view that acetylation is associated with an open chromatin structure. Moreover the distribution of the H4K20 and H3K9 trimethylation marks in the HC domain were different than the H3K27 mark thus defining a core and a peripheral HC compartment.

Results

1-Chromatin territories in photoreceptor nuclei.

Retinas of freshly sacrificed mice were dissected according to an optimized protocol that preserves the electrophysiological activity of the tissue and were instantly cryo-immobilized by high pressure freezing to prevent chemical fixation and changes in physicochemical conditions that could reorganize the cellular ultrastructure. The retinas were then freeze-substituted, epon embedded and sectioned at room temperature. Toluidin blue stained sections displayed the multilayered structure of the retina in which the nucleus, inner segment and outer segment of the photoreceptor were recognized (**Figure 30A**). After post staining with uranyl acetate and lead citrate, 100 nm thick retina sections observed by transmission electron microscopy revealed the characteristic appearance of rod nuclei which show a large electron dense HC domain located in their center (**Figure 30B**). Most nuclei had a nearly round shape with a maximal radius of $1.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ giving a volume of $29 \pm 7 \mu\text{m}^3$. Chromatin appeared arranged in concentric layers; the center of the nucleus being

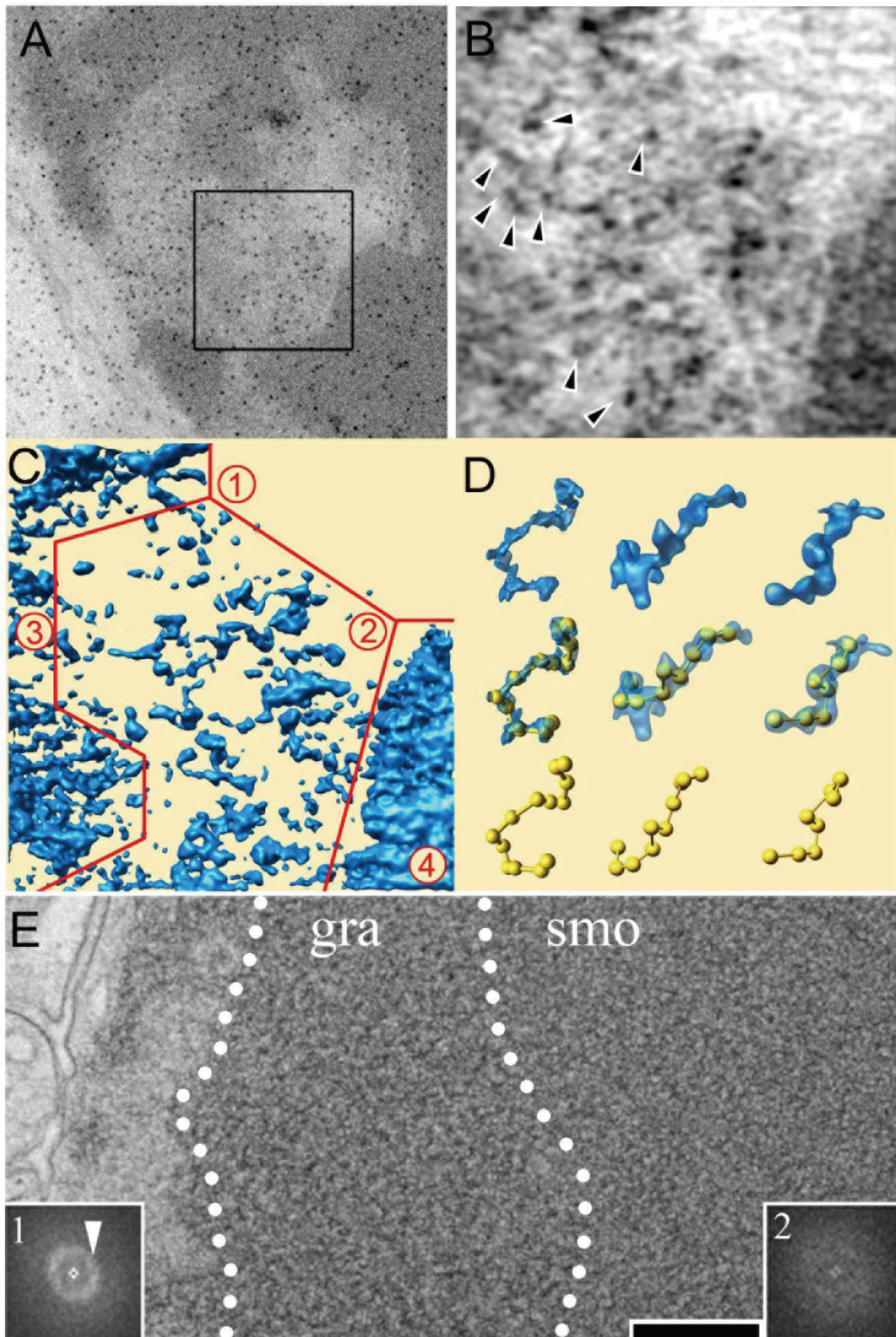


Figure 31: Electron tomography of rod photoreceptor nuclei.

(A) Overall view of the nuclear domain in which the electron tomogram was recorded (boxed area). The dark gold beads are fiducial markers used for aligning the tilted views on a common origin (B) Four nm thick section through the tomogram showing dark electron dense particles (arrows). (C) Surface representation of the tomogram in which 4 distinct chromatin domains were delineated. (D) Extraction of characteristic 11 nm fibers from different tomograms and beads on a string representation. (E) Overall view of the heterochromatin domain showing a distinct transition between a granular (gra) and a smooth (smo) compartment. These compartments are characterized by their optical diffraction pattern shown in insert 1 and 2 for the granular and smooth territory respectively. Bar represents 300nm in (A), 100 nm in (B-C), 54 nm in (D) and 230 nm in (E).

composed exclusively of HC whereas a 500-600 nm wide rim adjacent to the nuclear membrane contained a mixture of HC and less dense EC. A fraction of HC was found in close contact with the nuclear membrane thus forming a thin rim that was connected through HC bridges to the central HC. In contrast to other cell types, the EC compartment was markedly reduced in size and was confined to the nuclear periphery close to the nuclear membrane. Stereological measurements performed on 20 different nuclei showed that the HC compartment represents 71% of the surface when the nucleus is sectioned through its centre which, assuming spherical symmetry corresponds to about $17 \mu\text{m}^3$. The thin layer of HC in close contact to the nuclear membrane (within 150 nm from the nuclear membrane) was estimated to $3 \mu\text{m}^3$ or 15% of the entire HC compartment. The EC compartment contacts the nuclear membrane and projects into the central HC through multiple invaginations thus forming cavities with an extended HC/EC interface. The staining of the EC compartment showed substantial variations indicating that variable degrees of chromatin condensation coexist in this area.

2- Nucleosome distribution in chromatin territories.

To gain a better insight into the 3-D organisation of chromatin a 370 nm wide square area of a representative EC cavity was recorded under different viewing directions and its volume was reconstructed by electron tomography (**Figure 31A-B**). Digital sections through the reconstructed tomogram clearly revealed isolated electron dense particles whose size corresponds to isolated nucleosomes (black particles marked by arrows in **Figure 31B**). According to the abundance of these particles, the tomogram was divided into 3 distinct EC domains (areas 1-3 in **Figure 31C**) and a dense HC compartment (area 4 in **Figure 31C**). The least stained area 1 does not enclose any dense particles and probably corresponds to a nucleosome-free region at the centre of the cavity. The intensity of this area was used to set a threshold in the tomogram (4.5σ values over the average intensity) suitable to detect of the individual electron dense particles whose number was estimated by fitting 12 nm wide spheres.

Euchromatin area 2 contains well separated particles most of which are 10 to 12 nm in size. With an average density of $58 \cdot 10^3$ particles/ μm^3 they occupy about 6.7% of the volume. The particles are often connected by 2-4 nm wide threads and form extended fibers with an average spacing between particles of 22 nm ($n=49$, $\sigma=5$) (**Figure 31D**). This beads-on-a-string

appearance is consistent with the structure of an extended chromatin fibre formed by core nucleosomes connected by a linker DNA filament. The estimated repeated distance of 179 +/- 15 bp (146 bp wrapped around the core nucleosomes and 33 bp or 11nm of linker DNA) is comparable to the 190 bp nucleosomal repeat length found in mouse spleen cells (Smith et al., 1983). Altogether these observations show that individual nucleosomes and even connecting DNA can be resolved in the tomograms of stained nuclear sections and that individual, highly extended, chromatin fibers can be depicted in these EC domains.

Area 3 corresponds to an EC compartment which contains more densely packed particles and a nucleosome density of $145 \cdot 10^3$ nucleosomes/ μm^3 was determined. Nucleosome-sized particles are distinguished at the periphery of this domain but individual chromatin fibres cannot be traced. The nucleosomes occupy about 16% of this nuclear domain which is penetrated by solvent accessible channels.

Finally, area 4 corresponds to a characteristic HC domain where the boundaries of individual particles cannot be distinguished. A total of 61% of the volume has an intensity above the threshold assigned for the nucleosomes which, assuming a similar staining than for the EC territories, yields a concentration of about $540 \cdot 10^3$ nucleosomes per μm^3 . Considering the volumes of each chromatin compartment and their estimated nucleosomal densities, a total of $12 \cdot 10^6$ nucleosomes are predicted to be present in the nucleus. Such an amount of chromatin would package roughly 2.3 Gbp of DNA which is only slightly lower than the sequenced mouse genome (2.5 Gbp) thus validating the estimated chromatin compaction.

Despite its electron dense nature the HC compartment showed at least two distinct textures indicative of different nucleosomal arrangements. The periphery of the HC territory had generally a granular appearance whereas the most central domain showed a highly homogeneous and smooth texture (**Figure 31E**). In order to characterize the average size of this granularity the Fourier transform was calculated for the central and external parts of the HC compartment (Inserts 1 and 2 in **figure 31E**, respectively). The central HC showed a feature-less spectrum consistent with its homogeneous texture. In sharp contrast, the peripheral granular HC region is characterized by a strong ring in the Fourier transform at $1/30.9 \text{ nm}^{-1}$. This observation indicates that the periphery of the HC territory is formed by closely packed 30 nm chromatin fibres whereas such fibres are not detected in the most central domain.

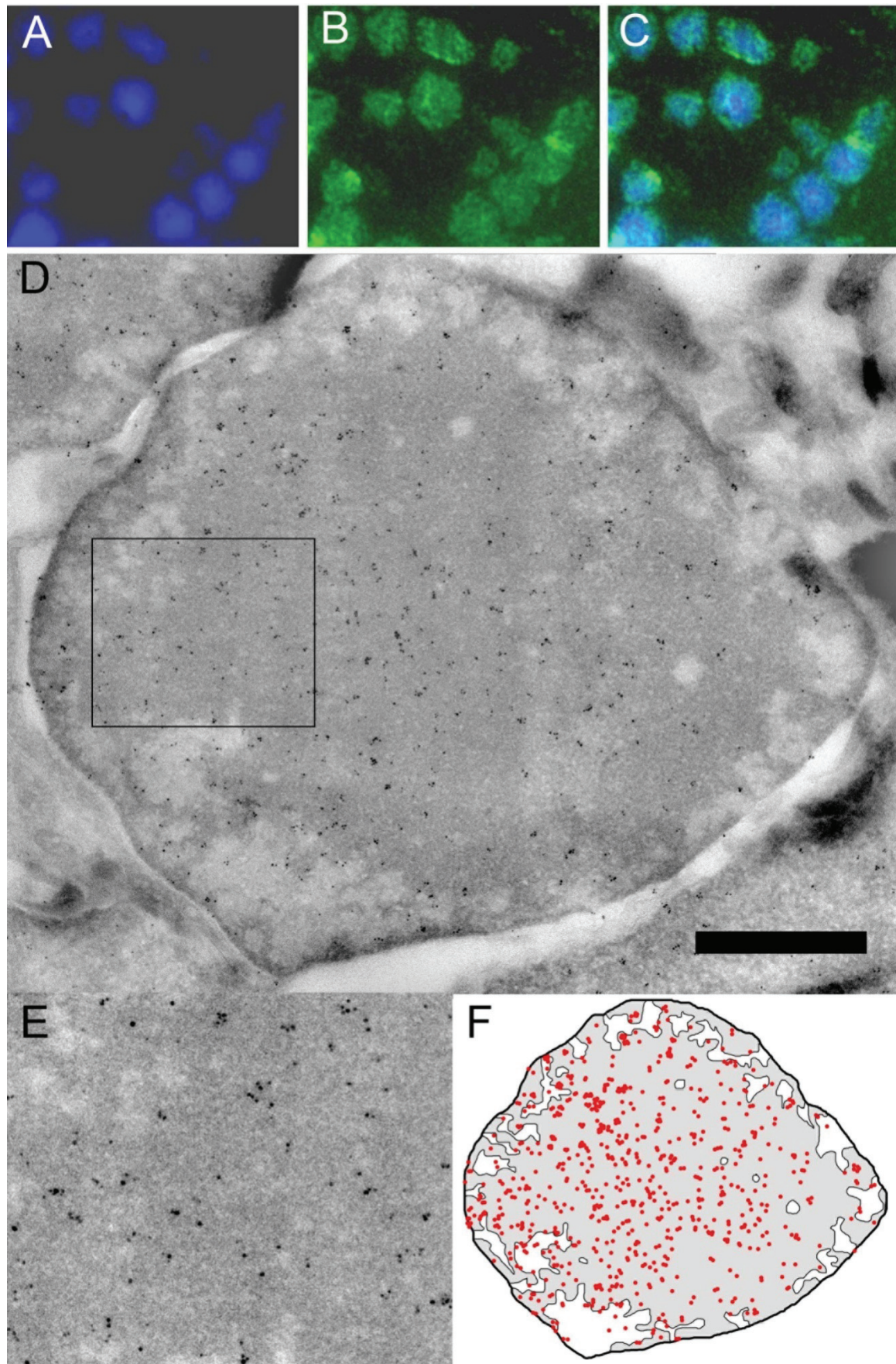


Figure 32 : Immunolabelling of core histone H3.

(A) DAPI staining of an ultra-thin cryo-section (B) Core histone H3 labelling detected by Alexa Fluor 488. (C) Merged image. (D) Overall view of the ultra-thin immunogold labelled section. (E) Enlarged region showing the uniform labelling of the section. (F) Schematic representation of the H3-specific labelling. Bar represents 1 μm in D and 0.5 μm in E.

3-Optimized immunolabelling of histones in condensed chromatin.

In order to correlate the degree of chromatin compaction with the distribution of post translational histone marks we performed immunocytochemistry experiments using antibodies directed against native or modified histones. In our hands, methods using cell permeabilization failed to label the condensed central HC probably because of reduced accessibility (data not shown). Ultra-thin cryo sections of the retina were therefore produced to gain equal access to all regions of the nucleus and to optimally preserve the antigenicity of the epitopes (Tokuyasu, 1980). An antibody directed against the C-terminal part of histone H3 was first used to label all nucleosomes. After immunofluorescent detection, this antibody was found to bind strongly to the central part of the cell nucleus where it overlapped with the DAPI staining thus indicating that the condensed HC domains are unveiled by the sectioning process and accessible for antibody binding (**Figure 32A-C**). In order to quantify the labelling density and its variations in the different nuclear domains, the primary antibody was immuno-gold labelled and the sections were observed by electron microscopy to determine the number of electron dense particles per surface area (**Figure 32D-F**). For the anti H3 antibody the labelling density was of 86 particles per μm^2 ($\text{p}/\mu\text{m}^2$) in HC and of 42 $\text{p}/\mu\text{m}^2$ in EC yielding a HC/EC labelling ratio of 2. This ratio is significantly lower than the HC/EC nucleosome density ratio of at least 5 found by tomography suggesting that the accessibility of this epitope is affected by the nucleosomal packing. To quantify the radial variation of the labelling density within the nucleus, the HC domain was contoured and the gold particles were counted in concentric rings of decreasing size, each separated by 150 nm (**Figure 37**). The labelling density is remarkably uniform for the anti H3 antibody throughout the whole HC.

4- Different trimethylation states of silenced chromatin.

The distribution of three histone trimethylation marks specific for transcriptionally silenced chromatin were investigated by using antibodies recognizing histone H3 modified on lys 9 (H3K9me3), on lys 27 (H3K27me3) or histone H4 modified on lys 20 (H4K20me3).

The H3K9me3 mark is strongly underrepresented in the EC regions since the labelling density is 15 times lower than the average HC labelling. In addition, this mark is not homogeneously distributed over the HC domain since the labelling density increases towards

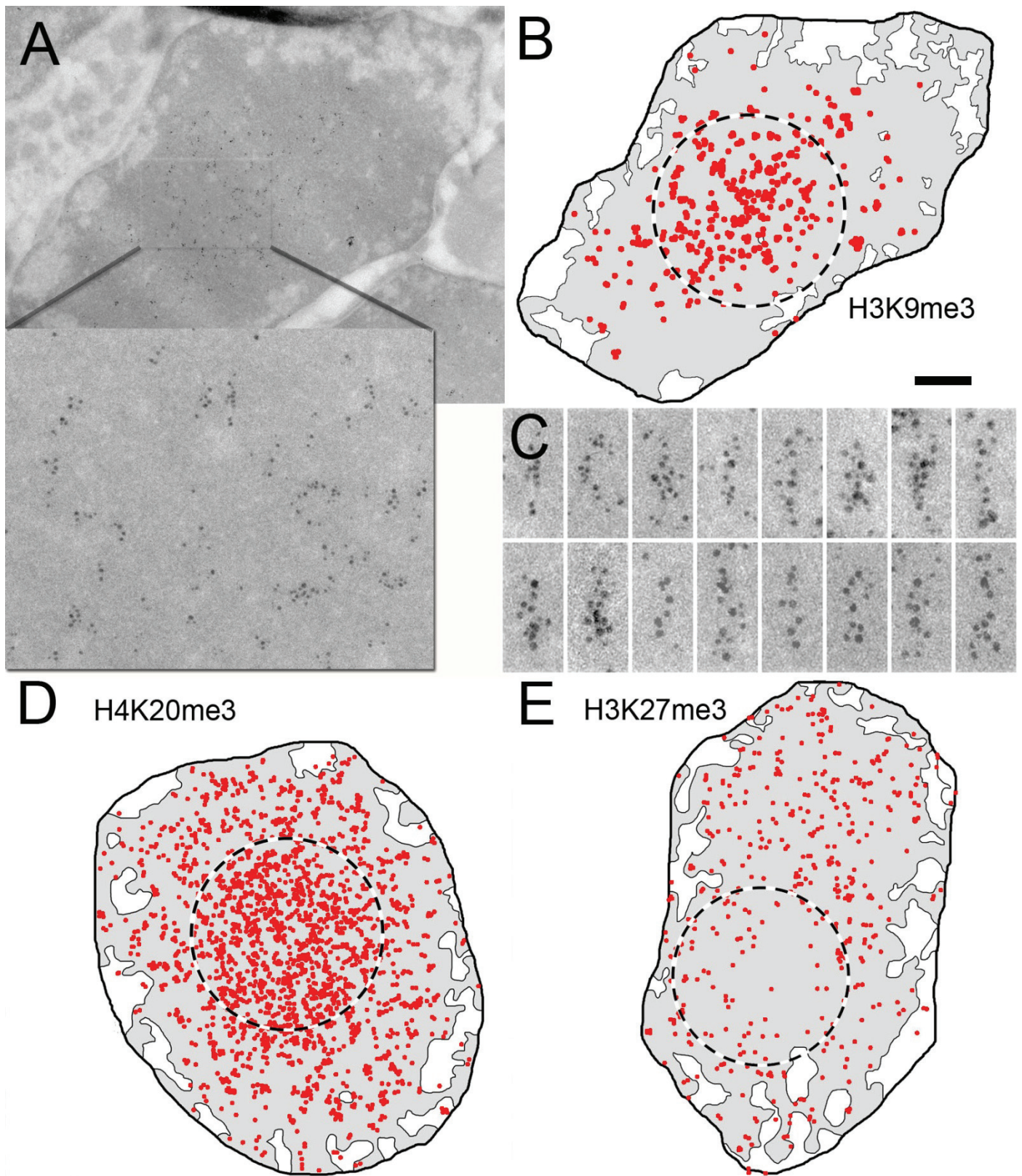


Figure 33 : Immunolabelling of transcriptionally inactive histone marks.

(A) Overall view of a rod nucleus immunogold labelled with H3K9me3-specific antibodies (B) Schematic representation of the H3K9me3-specific labelling. The dashed circle indicates the more intensely labelled central HC core (C) Enlarged region showing the distribution of the labelling along 30 nm fibers. (D) Schematic representation of the H4K20me3-specific labelling. The dashed circle indicates the more intensely labelled central HC core (E) Schematic representation of the H3K27me3-specific labelling. The dashed circle indicates the less labelled central HC core. The bar represents 500 nm in (A, B, D, and E) and 85 nm in (C).

the center of the HC (**Figure 33A and B**). The gold particle density was $40 \text{ p}/\mu\text{m}^2$ in the most external HC ring (from 0 to 150 nm from the EC/HC interface) and increased regularly to reach $255 \text{ p}/\mu\text{m}^2$ in the center of the nucleus (**Figure 37**). This 6.4 times increased labelling of the inner HC is highly significant since it contrasts with the control H3 labelling which varied by less than 5%. Direct inspection of the labelled nuclei identifies two distinct HC domains. In a round almost central core HC domain representing about 25% of the total HC surface, the labelling density is $245 \text{ p}/\mu\text{m}^2$ whereas in the peripheral HC it falls to $42 \text{ p}/\mu\text{m}^2$. Interestingly, both in the peripheral and in the core HC, the gold labels were often arranged along 30 nm wide fibers indicating that some chromatin fibers can bind several antibodies whereas neighboring fibers cannot (**Figure 33C**). The absence of labelling is not due to less accessible epitopes or to an unfavorable cutting plane since such a pattern was not observed for the control anti H3 antibodies. This fiber pattern discloses a spreading mechanism where the nucleosomes of some fibers are highly trimethylated on H3K9.

The overall distribution of the H4K20me3 mark is comparable to that of the H3K9me3 modification. The HC domain is on average 11.6 times more labelled than the EC compartment and a 5.6 fold increase in labelling density is observed between the most peripheral and the most central parts of the nucleus. A core HC domain, which represents 42% of the nuclear radius, can be defined in which the labelling is almost homogeneous ($400 \text{ p}/\mu\text{m}^2$) and 2.8 times higher than in the periphery ($140 \text{ p}/\mu\text{m}^2$) (**Figure 33D and 37**). A fiber-like labelling pattern is also observed for the H3K20me3 mark.

The H3K27me3 marks are also enriched in the HC region but in contrast to the previously analyzed trimethylations, show a decreased labelling from the periphery to the center of the HC territory (**Figure 33E and 37**). A central HC core domain representing about 25% of the HC surface can thus be delineated in which the average labelling density is $24 \text{ p}/\mu\text{m}^2$ whereas it rises to $87 \text{ p}/\mu\text{m}^2$ in the periphery.

5- Condensed chromatin can be acetylated

The distribution of acetylated histones generally associated with actively transcribed genes and with decondensed chromatin was investigated using an antibody directed against acetylated H4K8. In sharp contrast to the silencing marks, H4K8ac is almost absent in the central HC domain ($4 \text{ p}/\mu\text{m}^2$) but, unexpectedly, is found highly enriched in the condensed HC closest to the HC/EC interface ($97 \text{ p}/\mu\text{m}^2$) and in the EC compartment ($41 \text{ p}/\mu\text{m}^2$) (**Figure**

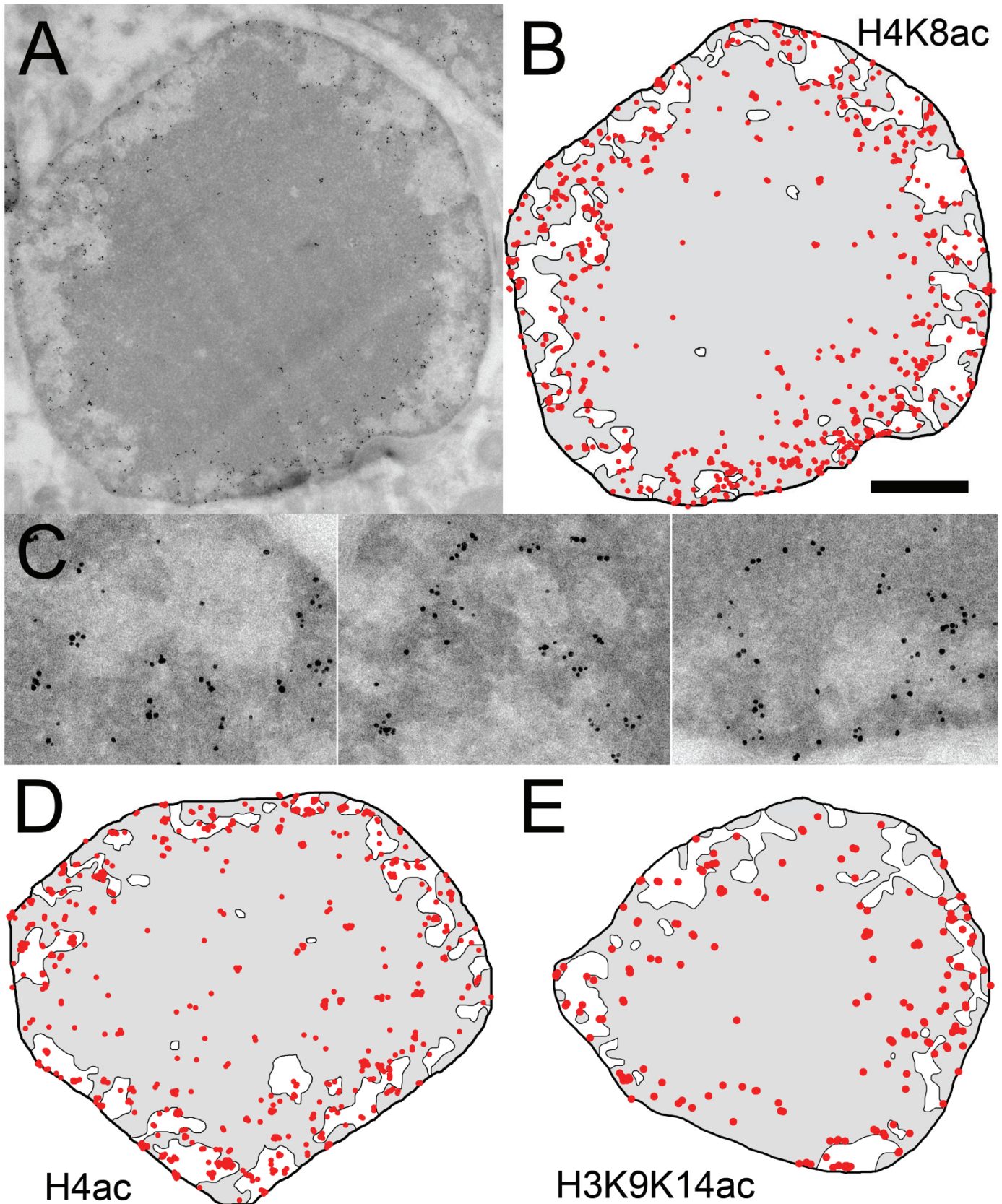


Figure 34 : Immunolabelling of acetylated histone marks.

(A) Overall view of a rod nucleus immunogold labelled with acetylated H4K8-specific antibodies. (B) Schematic representation of the H4K8ac-specific labelling. (C) Enlarged region showing the distribution of the H4K8ac labelling around the EC cavities. (D) Schematic representation of the labelling for the pan-acetylated H4. (E) Schematic representation of the labelling for H3 acetylated on K9 and K14. The bar represents 1 μm in A, B, D, E, and 260 nm in C.

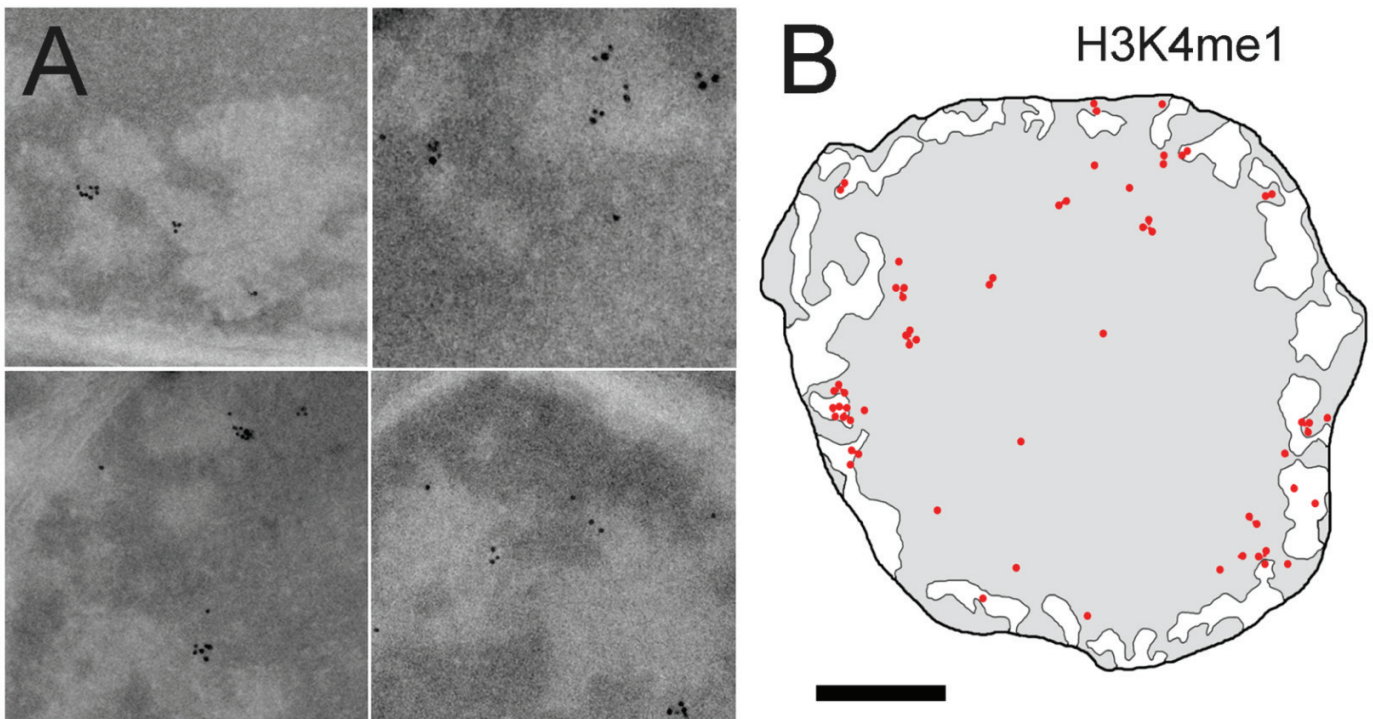


Figure 35 : Immunolabelling of lysine 4 monomethylated histone H3.

(A) Enlarged region showing the distribution of the H3K4me1 labelling around and within the EC cavities. (B) Schematic representation of the labelling for the H3K4me1 mark. The bar represents 260 nm in A and 1 μ m in B.

34A-C and 37). The nucleosomes present in the EC and close to the EC/HC interface are thus hyperacetylated on histone H4. The condensed chromatin associated with the nuclear membrane is also heavily decorated by this antibody ($100 \text{ p}/\mu\text{m}^2$). An antibody directed against all acetylated forms of H4 gave the same labelling profile (**Figure 34D**).

The distribution of acetylated histone H3 was investigated by using an antibody specific for acetylated K9 and K14. Despite a slightly lower labelling density, the distribution of H3K9K14ac is similar to that of H4K8ac (**Figure 34E**). Highest labelling is found at the EC/HC interface and in EC domains where less condensed chromatin is more likely to occur (**Figure 37**). These observations confirm that the extended chromatin is highly acetylated and show that the highly condensed chromatin placed at the interface with EC is also acetylated thus demonstrating that this histone mark is not sufficient to promote chromatin decondensation.

6- Euchromatin and its interface with heterochromatin show high levels of H3K4 monomethylation

Unlike the H3K9, H3K27 or H4K20 methylations described above, the methylation of lysine 4 of histone H3 is a post translational modification exclusively associated with actively transcribed genes and particularly with the early transcribed region (Shilatifard, 2008). The distribution of this mark was investigated using an antibody directed against the monomethylated form of H3K4. Despite a lower labeling density than observed for the previous marks, H3K4 monomethylation is 4 time more abundant in EC than in the most central part of the HC domain and is found enriched in the condensed HC closest to the HC/EC (**Figure 35 and 37**). The distribution of the methylation mark is thus comparable to that of the acetylation mark with the notable difference that the enrichment in the EC compartment is more important for H3K4me. Due to the lower nucleosomal content in the EC compartment acetylation density drops by a factor of 2.1 between the HC close to the HC/EC interface and the EC. In the case of H3K4 methylation, the labeling density remains constant suggesting that the extended chromatin is more enriched in H3K4 monomethylation than in acetylation marks.

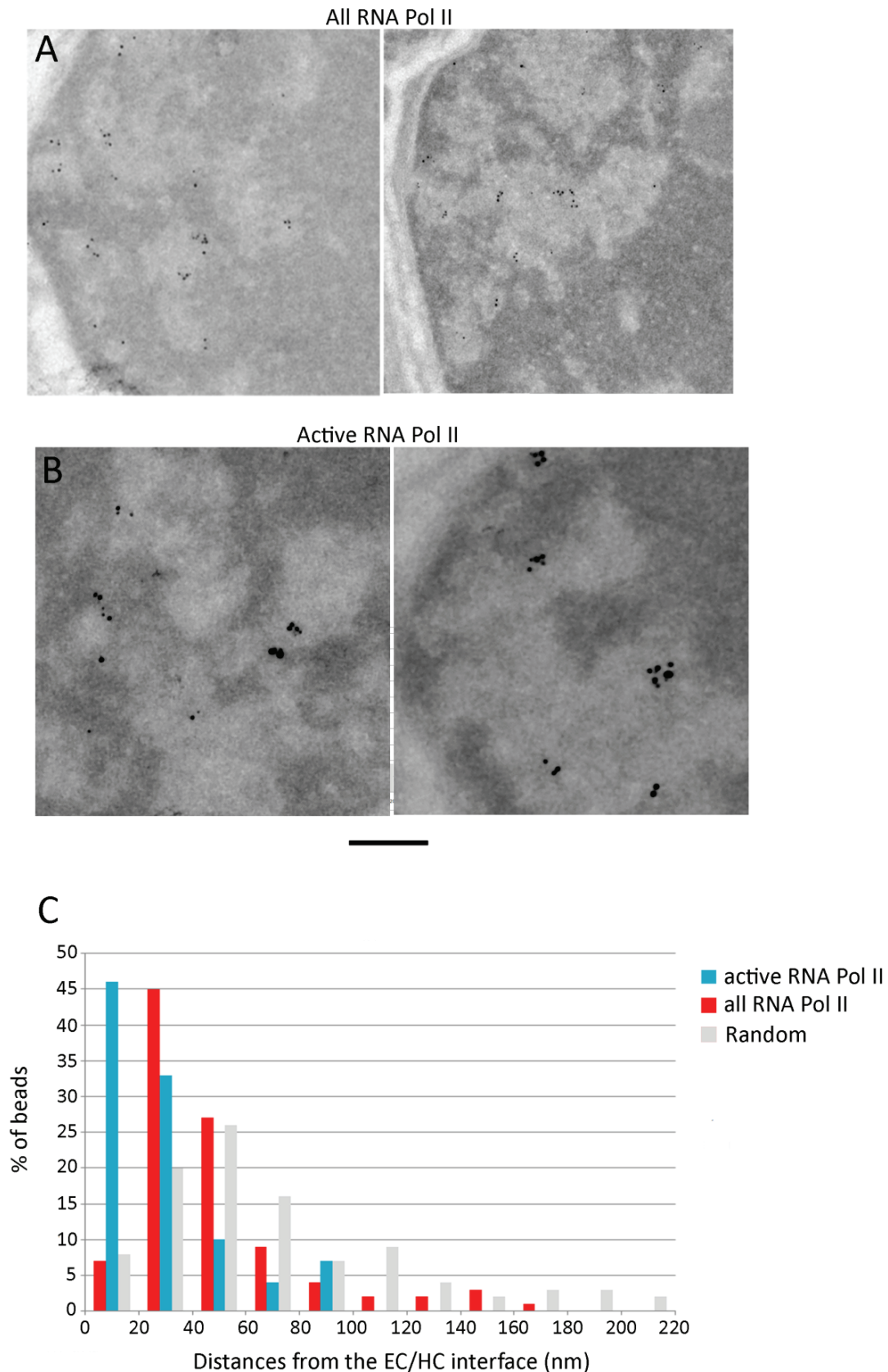


Figure 36 : Immunolabelling of RNA polymerase II.

(A) Rod nuclei immunogold labelled with antibodies directed against the total pool of RNA Pol II molecules. (B) Rod nuclei immunogold labeled with an antibody directed against the transcriptionally active RNA Pol II in which the CTD heptapeptide is phosphorylated on Ser5. (C) Histogram showing the distances between the EC/HC interface and the immunogold particles in the case of the total pool of RNA Pol II (blue) and the actively transcribing RNA Pol II (red). The grey histogram represents a simulated random distribution of the particles in the same EC domains. The bar represents 200 nm.

7- RNA polymerase II accumulates close to the EC/HC transition.

In order to position RNA polymerase II (RNA Pol II) molecules an antibody targeting the repeated heptapeptide of the C-terminal domain (CTD) of the largest RNA Pol II subunit was used. This antibody recognizes all forms of RNA Pol II since it is directed against the non phosphorylated CTD. The RNA Pol II were found almost exclusively (79%) within the EC compartment where the labelling was 14.5 times higher than in the HC domain. Interestingly the labelling was not distributed randomly within the EC cavities but appeared to be stronger close to the EC/HC interface (**Figure 36A**). To quantify this effect, the distances of the gold beads to the EC/HC interface were plotted as a histogram along with a modeled random distribution of beads to take into account the size distribution of the EC cavities (**Figure 36C**). This representation shows that the RNA Pol II distribution peaks at a distance of 40 nm from the interface and 67% of the label is found within 40 +/- 20 nm. In case of a random distribution, the plot is flatter and a maximum is observed at 55 nm that contains only 26% of the beads. The most central parts of the cavities contain only 8 % of the RNA Pol II labelling when it should be 23 % if random. These experiments indicate that RNA pol II molecules accumulate in the EC domain close to the EC/HC interface and are depleted in the center of the EC cavities.

In order to investigate the distribution of the transcriptionally active form of RNA Pol II an antibody directed against the CTD phosphorylated on serine 2 of the heptapeptide repeat. The active RNA Pol II is located preferentially (enriched 4.3 times) in the EC compartment. The histogram representing the distance of the active polymerases to the EC/HC interface shows that 66% of the active enzyme peaks at 20 +/- 20 nm from the interface. Moreover no active RNA Pol II labeling could be detected in the most central parts of the EC cavities. These results show that the transcribing enzyme is located even closer to the interface than the total pool of RNA Pol II.

Discussion

Murine rod photoreceptors are terminally differentiated cells and contain a highly condensed HC domain placed at the center of the nuclei. The small size of the EC compartment, the peculiar chromatin organization and the availability of genome wide gene expression data turn these cells into unique models to study the correlations between

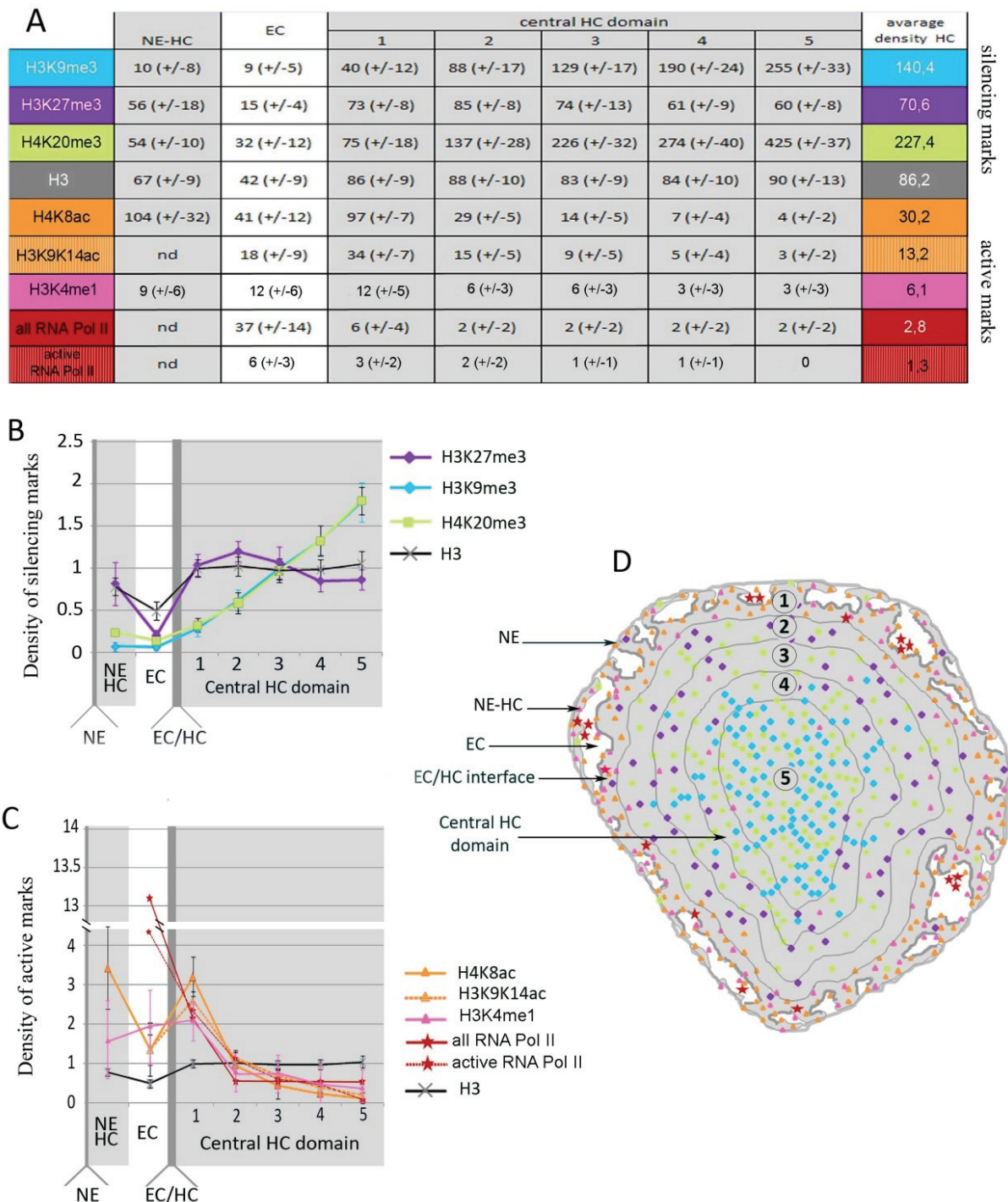


Figure 37 : Radial distribution of the labelling densities within rod nuclei.

(A) Table showing the labelling densities found for each antibody in the different chromatin compartments. (B) Graph representing the labelling density of the silencing histone marks in concentric nuclear compartments. From left to right the graph represents the nuclear envelope-associated heterochromatin (NE-HC), the euchromatin compartment (EC) and five concentric rings of the central heterochromatin domain that are separated by 150nm as indicated on panel B. The darkest bar positions the EC/HC interface. The labelling densities were normalized by the average labelling density of the central HC domain. (C) Same representation as in (B) for the histone marks specific for active transcription. (D) Schematic representation of a rod nucleus showing the euchromatin (white) and the heterochromatin (grey) territories. The central heterochromatin domain is separated into 5 concentric rings separated by 150 nm and analyzed independently to determine the radial variation in labelling density. The coloured dots represent schematically the distribution of the histone marks and respect the colour code used in panel (A).

chromatin compaction, transcriptional activity and histone modifications. At first sight, rod photoreceptor nuclei show two distinct nuclear domains that reflect the early structural definition of EC and HC based on regions differentially stained with basophilic dyes (Heitz, 1928b). Our results show that this binary EC/HC concept is oversimplified and reveal a variety of chromatin states in both nuclear compartments. A specific pattern of histone modifications is associated to each chromatin state and transcriptional activity is confined to the decondensed chromatin areas.

The 30nm chromatin fiber forms a discrete level of heterochromatin compaction.

A widely accepted model for chromatin compaction involves successive folding events during which linear nucleosome arrays wrap into 30 nm wide helical fibers forming either a solenoid or a zig-zag assembly. Mostly observed *in vitro* for dispersed chromatin, 30 nm fibers are more elusive in the cellular context except for isolated starfish sperm or chicken erythrocyte nuclei placed in hypotonic conditions (Horowitz et al., 1994). Direct evidence that such fibers are fundamental structural units of condensed chromatin in physiological ionic strength comes from early small angle X-ray scattering experiments of isolated nuclei which showed a diffraction signal at $1/30\text{nm}^{-1}$ proposed to be generated by tightly packed chromatin fibers (Paulson and Langmore, 1983). Such a signal was however never detected in electron micrographs of sectioned cell nuclei thus raising the possibility that it could originate from structures other than chromatin. Technical reasons such as poor structural preservation or lack of repeated units were eluted by the observation of frozen hydrated cryo sections which preserve optimally the cell architecture. The absence of any detectable signal for 30nm fibers in frozen hydrated section of mitotic chromosomes (Eltsov et al., 2008) (McDowall et al., 1986) or of cultured cells nuclei (Bouchet-Marquis et al., 2006) led the authors to support a model in which the fibers are highly interdigitated thus leading to a liquid crystal-like organization of nucleosomes.

Our studies revealed for the first time a signal at $1/30\text{nm}^{-1}$ in the Fourier transform of nuclear images. The highly compact nature of the rod nucleus may have favoured the detection of the fibers and special care was taken to perturb as little as possible the nuclear organisation during specimen preparation. In this respect, the nuclei were not isolated from cells, the physiological ionic strength was preserved during dissection and the freshly

dissected tissue was shown to be functional just prior to high pressure freezing. Interestingly 30nm fibers are only detected in the periphery of the HC whereas the central part appears uniform and does not show any periodic signal at $1/30\text{nm}^{-1}$. Our results thus favour a model in which rod HC is organized as closely packed 30 nm fibers which, consistent with the liquid crystal model, appear melted in the most central HC. However, even in these central parts of the nuclei, our immunolabelling data reveal 30 nm wide fibers, suggesting that the diffusion of nucleosomes around the positions they would adopt within a regular 30 nm fiber is limited. The transition between the homogeneous and the granular HC is unrelated to histone acetylation but correlates with a specific trimethylation pattern that could contribute either directly or through the recruitment of specific factors to interfiber interactions.

Functional organization of rod heterochromatin into concentric layers.

The rod HC is organized into three concentric layers, each characterized by a specific combination of histone modifications and this arrangement reflects the functional layout of the nuclei. The central HC core has a radius of 0.8 μm corresponding to 42 % of the nuclear radius and contains histones highly enriched in H4K20me3 and H3K9me3 marks, weakly trimethylated on H3K27 and deacetylated. The size of this domain correlates with Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) experiments showing that telomeric, centromeric and subcentromeric satellite DNA are found between 0 and 45% of the nuclear radius (Solovei et al., 2009). The core HC thus shows all the hallmarks of constitutive heterochromatin. Interestingly both H4K20me3 and H3K9me3 marks are distributed along 30 nm fibers indicating their accumulation on contiguous genomic locations consistent with their spreading around an initial deposition site. Self propagation is a characteristic feature of centromeric HC in mammals where spreading is based on the SUV39H methylase that favours the binding of HP1 proteins which recruit more methylases and propagate the H4K20me3 mark (Schotta et al., 2004).

A peripheral domain surrounds this central core and extends to about 0.2 μm to the EC/HC interface which corresponds to 42% and roughly 60-80% of the nuclear radius since the interface is folded. In this domain the histone tails are not acetylated and show reduced H4K20me3 and H3K9me3 and higher H3K27me3 levels than the central core. The H3K27me3 mark was associated in several systems to facultative HC defined here as genomic regions

that have the opportunity to adopt an open or a compact conformation within defined temporal or spatial constraints (Trojer and Reinberg, 2007). For example, H3K27me3 has an important role in embryonic development and was found to be involved in long range HOX gene silencing through the Polycomb group of proteins (Schuettengruber et al., 2007). In rod nuclei the accumulation of H3K27me3 around the central core is consistent with a developmentally regulated onset of these marks (Solovei et al., 2009).

Finally a 0.2 μm thick rim of heterochromatin at the EC/HC interface displays the same histone trimethylation pattern than the peripheral HC domain but is surprisingly highly acetylated. FISH experiments have located the gene rich regions of the genome, irrespectively of their transcriptional status, between 70 and 100% of the nuclear radius (Solovei et al., 2009). This layer of the rod nucleus is highly heterogeneous and contains intermingled Eu- and Heterochromatin but it is tempting to speculate that transcriptionally inactive genes are located in this compact but acetylated HC territory whereas actively transcribed genes are placed in the adjacent EC territory. Our results show that the role of histone acetylation needs to be reassessed since it does not primarily affect the tight nucleosomal packing and can be associated with inactive chromatin. The position of these marks at the HC/EC interphase raises the possibility that these marks contribute to the general organization of the nucleus by partitioning the gene rich and gene poor regions of the genome into distinct territories.

Transcriptionally active chromatin.

Transcription, as probed by the presence of RNA Pol II, is strictly restricted to the EC compartment, which is characterized by the presence of decondensed chromatin, acetylated and monomethylated histone tails, and the absence of H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3 marks. Hyperacetylation of H3 and H4 tails is a hallmark of actively transcribed genes in higher eukaryotes (Allfrey and Mirsky, 1964), (Turner, 2000), (Schubeler et al., 2004) and *in vitro* transcription experiments indicate that acetylation facilitates chromatin unfolding and transcription (Tse et al., 1998). However, recent folding studies showed that acetylation of the H4 tail does not totally impair condensation and that histone H1 eviction is necessary to form an extended chromatin structure (Robinson et al., 2008). Accordingly, our *in vivo* observations confirm that H3 and H4 acetylation on its own is not sufficient to elicit chromatin decondensation at the HC/EC interface. *In vitro* the extended 11 nm chromatin

fibers showing the typical beads-on-a-string appearance were only observed in the absence of the histone H1, which is believed to stabilize the 30 nm fiber by acting on the path of DNA at the exit of the nucleosome (Rose and Garrard, 1984), (Hamiche et al., 1996). Therefore our observations indicate that the removal of H1 is a critical event in the transition towards an active transcriptional state.

Electron tomograms revealed large variations in nucleosomal packing in the EC compartment ranging from extended 11 nm fibers to more densely packed chromatin regions. These variations suggest that all the euchromatin is not in the same transcriptional state and that significant transcriptional regulation may still occur in the EC compartment through modulation of the chromatin structure. The fraction of the genome exposed in the EC territory can be roughly estimated to be 20 Mbp or less than 1% of the mouse genome from the average nucleosome density (about $10^5/\mu\text{m}^3$) and the volume of the EC compartment (about $9 \mu\text{m}^3$). This fraction may correspond to genes that can rapidly switch between an activated and a repressed state.

The distribution of the actively transcribing RNA Pol II correlates with the EC/HC interface since both the phosphorylated and the total pool of RNA Pol II accumulate at a defined distance to the HC compartment. These distance constraints, which are found to be more stringent for the active enzymes, indicate that the transcription process takes place preferentially at 20 nm or 1-2 nucleosomes away from the interface. The significance of this observation is still unclear but it is tempting to speculate that chromatin fibers loop out of the HC domain and that transcribing polymerases are located close to the basis of these loops.

Acknowledgements

We thank Dr M. Roux for his invaluable help in the dissection and electrophysiological characterization of the mouse retina, C. Ziegler-Birling for genotyping and taking care of the animals, J. Leunissen and P. van de Plas for the kind gift of immunogold reagents and their invaluable advices. We are thankful to R. Drillien for critical reading of the manuscript and L. Tora for stimulating scientific discussions.

Materials and Methods

Retina dissection.

The ICS/IGBMC animal facility is approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries' veterinary services (D67-218-5 - notification of 13/10/2008). The experiments involving animals were conducted under the supervision of a staff member holding an animal experimentation authorization from the Ministry of Agriculture and Fisheries: having followed the obligatory national training programs for animal handling, including procedures of euthanasia. The institution is guided by the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences and all experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the care and Use of Laboratory Animals*.

Thirteen to twenty-one weeks old C57/BL6 mice were sacrificed in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Their eyes were rapidly enucleated and placed in Artificial CerebroSpinal Fluid (ACSF) buffer (126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 18 mM NaHCO₃, 11 mM Glucose, PH 7.4, equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂) for the dissection. The retina were gently separated from the pigment epithelium and the sclera after removal of the lens, iris and vitreous humor. The dissection was completed in less than 5 min (Wilson et al., 1998).

High Pressure Freezing and freeze substitution.

For High Pressure Freezing (HPF), retinas were punched (Miltex, biopsy punch) to obtain an oriented disk 1.5 mm in diameter that fits into the specimen carrier. After infiltration in a drop of cryoprotectant containing 10% dextran (Sigma # D1662) and 10% BSA (Sigma # A4503) v/v in ACSF buffer (5 sec), each disk was placed onto a 200 µm thick flat gold-plated specimen carrier in order to be vitrified in the HPF machine (EMPACT2, Leica Microsystems, Vienna).

After HPF, the samples were freeze substitute (Humbel, 2007) at -90 °C for 80 h in acetone supplemented with 2% OsO₄ and were then warmed up slowly (1 °C/h) to -60 °C in an Automated Freeze Substitution device (AFS2, Leica Microsystems). After 8-12 h the temperature was raised to -30 °C (1 °C/h) and the samples were kept at this temperature for

8-12 h before being rinsed several times in acetone. The samples were then infiltrated with gradually increasing concentration of Epon in acetone (1:2, 1:1, 2:1 volume ratio and finally pure Epon) for 2-3 h while raising the temperature. Addition of pure Epon was performed at room temperature. After polymerization of the resin at 60 °C, 70-100 nm thin sections were produced using an ultramicrotome (ultracut UC6, Leica Microsystems, Vienna), collected on formvar-carbon coated hexagonal 50 mesh copper grids and post-stained for 5 min with 2% aqueous uranyl acetate, rinsed and incubated for 2 min with lead citrate. The quality of the vitrification was assessed by the absence of recognizable ice crystal ghosts.

Stereology.

To determine the proportion of the nuclear volume occupied by the different chromatin compartments we used stereological methods (Griffiths, 1993) and approximated the nucleus as concentric spheres composed, from inside to outside, of core HC, HC, EC, and membrane interacting HC. To estimate the volume of the nuclei, the radius of 20 sectioned nuclei were measured and plotted as a histogram. The peak of the histogram was close to the largest measured value and gave the radius of the central section of the nuclei. The volume occupied by a given chromatin compartment is proportional to the surface occupied by this compartment in a central section of the nucleus corrected for its radial distribution. The areas of the different chromatin compartments were determined by applying an intensity threshold on low pass filtered images. The surface of the central HC compartment was used to determine an average HC radius that was used to calculate the volume. Heterochromatin was considered to be associated to the nuclear envelope (NE) when it was within 150 nm of the NE. The volume of this shell was calculated and multiplied by the fraction of this area occupied by NE-HC to obtain the volume of NE-HC.

Electron Tomography.

Ten nanometer colloidal gold particles were applied on one side of the grid to be used as fiducial markers to align the tilt series. The specimen was inserted in a transmission electron microscope equipped with a field emission gun and operating at 200 kV (Tecnai F20, FEI Company). Digital images were recorded at a magnification of 29.000 x on a Pelletier cooled 2k CCD camera leading to a pixel spacing of 3.6 Å (Gatan, Inc., Pleasanton, CA, USA). Each tilt series was recorded in bright-field mode over a tilt range of -65° to +65° with 1°

increments giving a total of 131 images automatically collected with the Xplore 3D software (FEI Company). The recorded images were aligned on a common origin by means of cross correlation techniques and the 3-D reconstruction was performed using the Inspect3D tomography reconstruction package (FEI Company) according to the weighted-back projection methods or the Simultaneous Iterative Reconstruction Technique (SIRT). Surface rendering was performed by gray level thresholding using the Chimera software (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) after having low pass filtered the tomograms to $1/10 \text{ nm}^{-1}$.¹ In order to position the electron dense particles the low pass filtered tomograms were searched for peaks of high intensity separated by more than 12 nm. For modeling, a 12 nm sphere was placed at each peak coordinate.

Antibodies.

Active marks of transcription were detected with rabbit polyclonal antibodies directed against H3K9K14ac (Millipore # 06-599), H4K8ac (Abcam # ab15823, Cambridge), pan acetylated H4 (Millipore # 06-866) and H3K4me1 (Abcam # ab8895). Inactive marks of transcription were detected with rabbit polyclonal antibodies directed against H4K20me3 (Abcam # ab9053), H3K27me3 (Millipore # 07-449) and H3K9me3 (diagenode # pAb-056-050). Total Histone H3 was detected with a rabbit monoclonal antibody directed against the C-terminus of histone H3 (Millipore # 05-928). RNA polymerase II was detected with an IgG1-type mouse monoclonal antibody developed at IGBMC (1PB7C2). This immunopurified antibody reacts with the conserved heptapeptide repeat of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. The active form of RNA polymerase II was detected with an IgM-type mouse monoclonal antibody against the phosphoserine 2 in the heptapeptide repeat (Covance # MMS-129R). The primary antibodies were revealed with goat anti-rabbit ultra-small gold-conjugates (Aurion, Wageningen, The Netherlands). For the detection at the light microscope level goat anti-rabbit IgG coupled to AlexaFluor 488 were used (Invitrogen # A11008).

Immunocytochemistry.

Retina samples were prepared, sectioned and immunolabelled according to Tokuyasu (Tokuyasu, 1973). *Sample preparation:* Briefly, after dissection, retina were cut into small

blocks of about 1mm³, fixed in 2.5% formaldehyde, 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M Phosphate Buffer Saline pH 7.4 (PBS) for 1h. Free aldehydes were blocked with several washes in PBS supplemented with 50 mM glycine. The blocks were infiltrated with 2.3 M sucrose in PBS in an Eppendorf tube on a rotating wheel for at least 2 h at 4 °C. The blocks were then mounted on the holders of the cryoultramicrotome and rapidly frozen in liquid nitrogen. *Cryosectioning*: Ultra-thin cryo-sections (100 nm) were cut using a cryo-ultramicrotome (UM6, Leica Microsystems) at -130 °C using diamond knives (Diatome, Switzerland) and recovered with a drop of 2.3 M sucrose on formvar-carbon coated 50 mesh nickel grids or on coated light microscope slides for immunofluorescence. After thawing, immunolabelling was performed using the automatic Immuno Gold Labelling apparatus (IGL, Leica Microsystems, Vienna). *Immunolabelling*: After a blocking step of two times 10 mn in glycine (0,5 mM in PBS) and another 10 mn in 1% BSA/PBS (blocking buffer), the sections were incubated 20 min with the primary antibody. After 4 times 2 min washes on 10 x diluted blocking buffer bound antibodies were revealed using goat anti-rabbit conjugated to ultra-small colloidal gold (US) diluted 1:25 PBS with 0.1% acetylated BSA (BSA-c™) (Aurion, Wageningen, The Netherlands). After several washes in PBS/0,1%BSA followed by PBS, the antigen-antibody complexes were stabilized on 1% glutaraldehyde in PBS for 5 min After several washes in PBS followed by water colloidal gold silver enhancement was performed using R-Gent™ (Aurion) for 30 min resulting in an average particle size of 10 nm. Thereafter, sections were carefully washed 5 times (5 min each) with water, stained and embedded in a solution containing 4 parts of 2% methyl cellulose (Sigma-Aldrich # M-6385) and one part of 2% uranyl acetate. Sections were observed using a Philips CM 120 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 100 kV.

For immunofluorescence the primary antibody was detected with a goat anti-rabbit IgG coupled to AlexaFluor 488 diluted in blocking buffer. Sections were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (1 µg/ml, Sigma) and embedded in Aqua-Poly/Mount (Polysciences # 18606-20) medium. The results were examined using a *DM400B Leica* epifluorescence *microscope* connected to a Cool Snap camera (Roper).

Quantification of gold particles.

The number of particles per µm² was quantified for 15-20 rod nuclei for each immunolabelling experiment. The regions of interest were delimited and their surfaces were

measured using the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Gold particles were counted within each region of interest after high pass filtering of the images and by using an automated peak search algorithm (Imaging Science, Berlin, Germany).

References

- Abou-Sleymane G, Chalmel F, Helmlinger D, Lardenois A, Thibault C et al. (2006) Polyglutamine expansion causes neurodegeneration by altering the neuronal differentiation program. *Hum Mol Genet* 15(5): 691-703.
- Allfrey VG, Mirsky AE (1964) Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science* 144(3618): 559.
- Bassett A, Cooper S, Wu C, Travers A (2009) The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 19(2): 159-165.
- Bellard M, Gannon F, Chambon P (1978) Nucleosome structure III: the structure and transcriptional activity of the chromatin containing the ovalbumin and globin genes in chick oviduct nuclei. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42 Pt 2: 779-791.
- Berger SL (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447(7143): 407-412.
- Blackshaw S, Fraioli RE, Furukawa T, Cepko CL (2001) Comprehensive analysis of photoreceptor gene expression and the identification of candidate retinal disease genes. *Cell* 107(5): 579-589.
- Bouchet-Marquis C, Dubochet J, Fakan S (2006) Cryoelectron microscopy of vitrified sections: a new challenge for the analysis of functional nuclear architecture. *Histochem Cell Biol* 125(1-2): 43-51.
- Carter-Dawson LD, LaVail MM (1979) Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 188(2): 245-262.
- Eltsov M, Maclellan KM, Maeshima K, Frangakis AS, Dubochet J (2008) Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(50): 19732-19737.
- Gilbert N, Boyle S, Fiegler H, Woodfine K, Carter NP et al. (2004) Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118(5): 555-566.
- Griffiths G (1993) Quantitative aspects of immunocytochemistry. In: Griffiths G, editor. *Fine structure immunocytochemistry*. Springer-Verlag ed: Springer-Verlag. pp. 371-445.
- Hamiche A, Schultz P, Ramakrishnan V, Oudet P, Prunell A (1996) Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes. *J Mol Biol* 257(1): 30-42.
- Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M et al. (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111(3): 369-379.
- Heitz E (1928) Das Heterochromatin der Moose. . *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik* 69: 762–818.
- Horowitz-Scherer RA, Woodcock CL (2006) Organization of interphase chromatin. *Chromosoma* 115(1): 1-14.

- Horowitz RA, Agard DA, Sedat JW, Woodcock CL (1994) The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J Cell Biol* 125(1): 1-10.
- Humbel B (2007) Freeze-substitution. In: Cavalier A, Spohner D, Humbel BM, editors. *Handbook of cryo-preparation methods for electron microscopy*. CRC Press ed: CRC Press. pp. 321-341.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293(5532): 1074-1080.
- Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL et al. (2005) Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* 3(10): e328.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648): 251-260.
- Margueron R, Trojer P, Reinberg D (2005) The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 15(2): 163-176.
- McDowall AW, Smith JM, Dubochet J (1986) Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ. *Embo J* 5(6): 1395-1402.
- Mujtaba S, Zeng L, Zhou MM (2007) Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26(37): 5521-5527.
- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4(4): 281-300.
- Paulson JR, Langmore JP (1983) Low angle x-ray diffraction studies of HeLa metaphase chromosomes: effects of histone phosphorylation and chromosome isolation procedure. *J Cell Biol* 96(4): 1132-1137.
- Robinson PJ, An W, Routh A, Martino F, Chapman L et al. (2008) 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. *J Mol Biol* 381(4): 816-825.
- Rose SM, Garrard WT (1984) Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J Biol Chem* 259(13): 8534-8544.
- Schneider R, Grosschedl R (2007) Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 21(23): 3027-3043.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R et al. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18(11): 1251-1262.
- Schubeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C et al. (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* 18(11): 1263-1271.
- Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G (2007) Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128(4): 735-745.
- Shilatifard A (2008) Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol* 20(3): 341-348.
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR et al. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311(5762): 844-847.
- Smith RD, Seale RL, Yu J (1983) Transcribed chromatin exhibits an altered nucleosomal spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(18): 5505-5509.
- Solovei I, Kreysing M, Lanctot C, Kosem S, Peichl L et al. (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137(2): 356-368.
- Thoma F, Koller T (1977) Influence of histone H1 on chromatin structure. *Cell* 12(1): 101-107.

- Tokuyasu KT (1973) A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* 57(2): 551-565.
- Tokuyasu KT (1980) Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem J* 12(4): 381-403.
- Trojer P, Reinberg D (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28(1): 1-13.
- Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 18(8): 4629-4638.
- Turner BM (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22(9): 836-845.
- Weintraub H, Groudine M (1976) Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* 193(4256): 848-856.
- Wilson MT, Farmer MA, Karwoski CJ (1998) Ultrastructure of the frog retina after high-pressure freezing and freeze substitution. *J Microsc* 189(Pt 3): 219-235.
- Woodcock CL, Grigoryev SA, Horowitz RA, Whitaker N (1993) A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(19): 9021-9025.
- Wu J, Smith LT, Plass C, Huang TH (2006) ChIP-chip comes of age for genome-wide functional analysis. *Cancer Res* 66(14): 6899-6902.
- Yaniv M, Cereghini S (1986) Structure of transcriptionally active chromatin. *CRC Crit Rev Biochem* 21(1): 1-26.
- Zeng L, Zhou MM (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513(1): 124-128.

II. Deuxième partie :

Etude *in vivo* du remodelage de la chromatine dans les noyaux des photorécepteurs de souris modèles pour la maladie SCA7.

La deuxième partie de mon travail de thèse consiste à mieux comprendre l'origine du phénotype nucléaire observé au niveau des bâtonnets des rétines de souris modèles pour la maladie génétique SCA7. Les souris SCA7 expriment l'ataxine 7 (ATXN7) polyQ sous le contrôle du promoteur de la rhodopsine. L'ATXN7 est une sous-unité du complexe de co-activation transcriptionnel SAGA. Les noyaux des bâtonnets de rétines de souris SCA7, subissent une réorganisation drastique de la chromatine. Le remodelage de la chromatine dans ces noyaux est corrélé avec des défauts transcriptionnels et les gènes spécifiquement surexprimés dans les noyaux de bâtonnets se retrouve transcriptionnellement sous-régulés.

Pour mieux comprendre ce phénotype nucléaire, j'ai réalisé une analyse morphologique des noyaux de bâtonnets de rétines SCA7 comparés aux noyaux de bâtonnets sains. Par des méthodes stéréologiques, j'ai déterminé le volume nucléaire ainsi que les fractions volumiques occupées par les différents compartiments chromatinien. Ces résultats ont permis de mettre en évidence un gonflement des noyaux SCA7, comparé aux noyaux sains le volume du noyau est multiplié par 2. Le compartiment d'hétérochromatine s'organise différemment avec une proportion accrue d'hétérochromatine associée à la membrane nucléaire et ressemble davantage à un noyau de fibroblastes en culture.

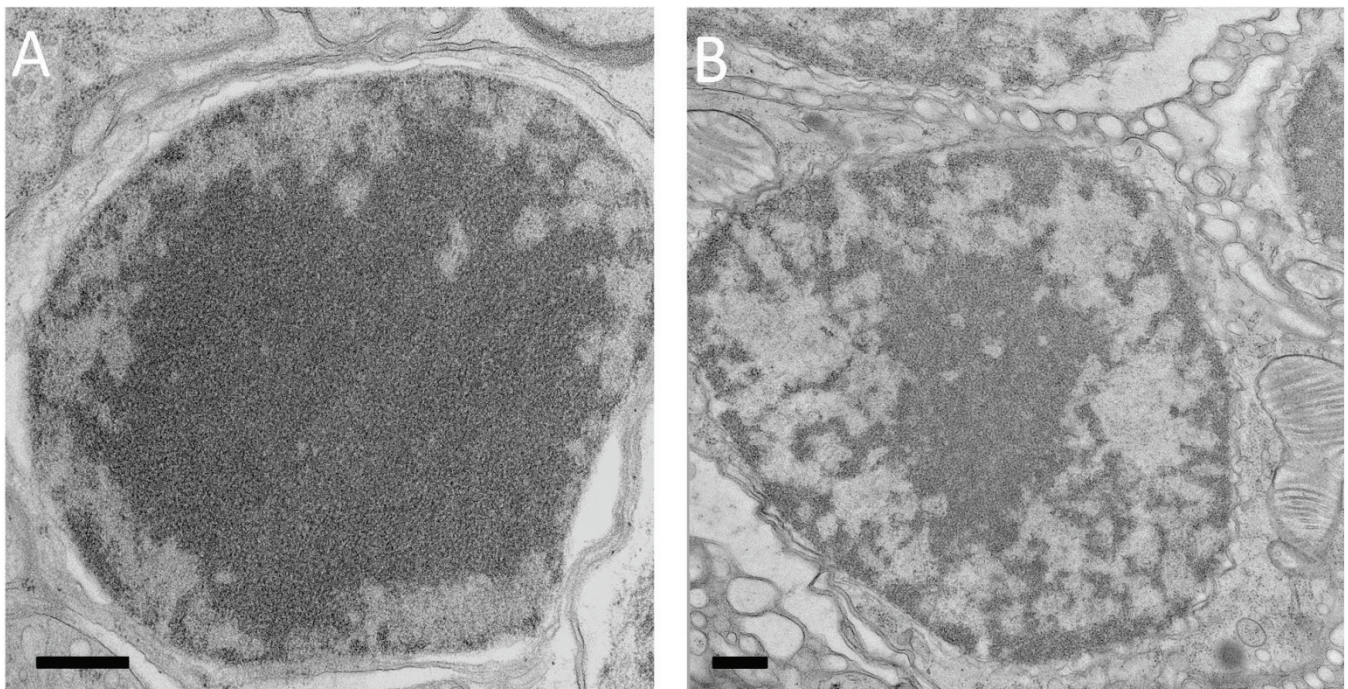
Par des expériences d'immunomarquage à l'or colloïdal, j'ai pu mettre en évidence un déplacement spécifique de l'hétérochromatine facultative dans le noyau des bâtonnets de rétines SCA7. Le cœur d'hétérochromatine riche en histones H3 tri-méthylées sur la lysine 9 et en histones H4 tri-méthylées sur la lysine 20 est maintenu au centre des noyaux SCA7 alors que l'hétérochromatine facultative riche en histone H3 tri-méthylées sur la lysine 27, migre pour venir s'associer à la membrane nucléaire.

Pour comprendre le rôle joué par l'ATXN7 polyQ au sein du complexe SAGA, j'ai étudié l'activité histone acétyl-transférase (HAT) de ce complexe dans les rétines de souris SCA7. Le complexe SAGA acétyle préférentiellement l'histone H3. J'ai réalisé des extractions acides des histones de rétines de souris normales et de souris SCA7 et j'ai comparé par des expériences de Western Blot le profil d'acétylation de l'histone H3. Le niveau d'acétylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 14 est comparable entre les rétines SCA7 et les rétines normales. De ce fait, l'ATXN7 polyQ ne semble pas influencer l'activité HAT du complexe SAGA.

Cependant, dans les noyaux de bâtonnets SCA7, la transcription de certains gènes se retrouve dérégulée. L'analyse par bio-informatique des données transcriptomiques issues de

réтины SCA7 a mis en évidence un certain nombre de gènes dont l'expression, généralement fortement exprimée, est fortement dérégulée. Parmi ces gènes, j'ai identifié le gène codant pour l'histone H1 dont le niveau d'expression est réduit d'un facteur 2 au niveau transcriptomique. L'histone H1 est connue pour jouer un rôle important dans la condensation de la chromatine et pourrait constituer un bon candidat pour expliquer le remodelage de la chromatine observé dans les noyaux de bâtonnets SCA7.

La perte de fonction de l'histone H1 dans les noyaux de bâtonnets SCA7 a pu être confirmée par des méthodes de protéomique. Après migration des histones extraites des réтины SCA7 et sauvages sur gel de polyacrylamide, une bande toujours présente dans les extraits de réтины sauvages n'est plus détectable sur le gel au niveau des extraits de réтины SCA7. Cette bande analysée par spectrométrie de masse correspond à la protéine histone H1c. Il y a donc une disparition de la protéine histone H1 dans les noyaux de bâtonnets des réтины SCA7. L'absence de l'histone H1c pourrait nous permettre de comprendre l'origine du phénotype nucléaire et la décondensation de la chromatine observée dans les bâtonnets SCA7 mais le rôle joué par l'ATXN7 polyQ au niveau du complexe SAGA dans ces noyaux, reste encore inconnu.



C	Noyaux	Sauvages	SCA7
	Volume du noyau	31 μm^3	67 μm^3
	Volume total d'HC	22 μm^3	39 μm^3
	Volume d'HC associée à la membrane nucléaire	2.9 μm^3	9.4 μm^3
	Volume total d'EC	9 μm^3	28 μm^3

Figure 38: Ultrastructure des noyaux de photorécepteurs de rétines de souris normales et SCA7.

Les noyaux de bâtonnets sont observés par microscopie électronique après cryo-fixation et cryo-substitution des rétines (A) Noyau de bâtonnet normal. (B) Noyaux de bâtonnet SCA7. Les barres d'échelles correspondent à 500nm. (C) Volumes des différents compartiments de chromatine présents dans les noyaux de bâtonnets normaux et SCA7 estimés par les méthodes stéréologiques. (HC : hétérochromatine ; EC : euchromatine).

1) Effets de l'ATXN7 polyQ sur l'organisation nucléaire des

bâtonnets :

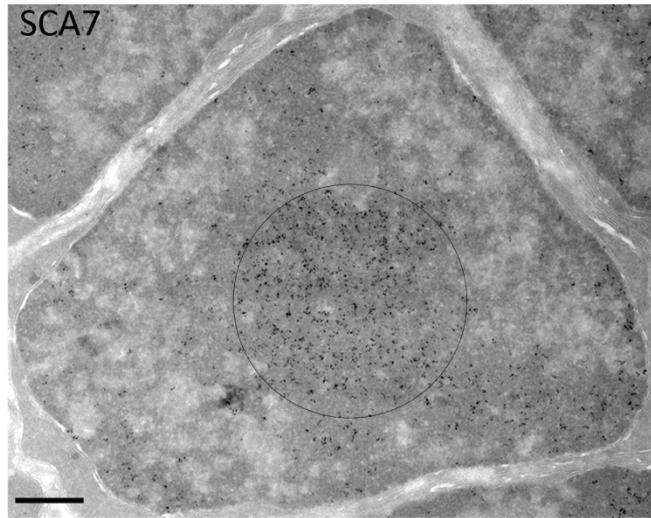
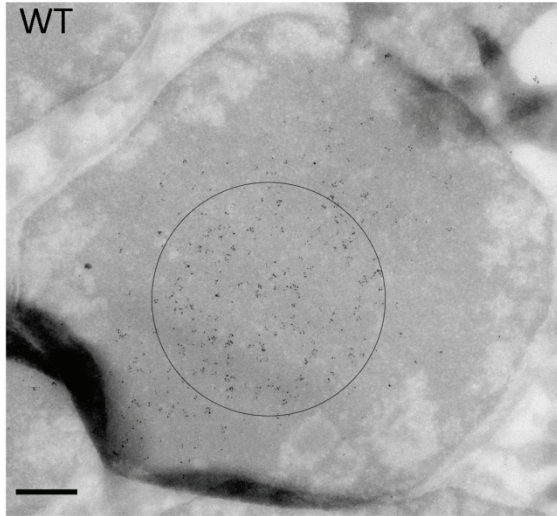
Pour étudier les conséquences de l'expression de l'ATXN7 polyQ sur la morphologie des noyaux de bâtonnets, les rétines de souris issues de souris normales et SCA7 âgées entre 13 et 20 semaines, sont préparées par cryo-fixation et cryo-substitution, puis les échantillons sont enrobés dans la résine pour être sectionnés à température ambiante. Les coupes ultrafines de rétine (100nm) sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb avant d'être observées au microscope électronique.

Dans ces conditions de préparation, l'organisation nucléaire des bâtonnets normaux est préservée (**figure 38A**). Le grand territoire d'hétérochromatine occupe le centre du noyau et le domaine d'euchromatine est réduit en périphérie proche de l'enveloppe nucléaire. Le noyau de bâtonnet normal a un volume moyen de $31 \mu\text{m}^3$ et l'hétérochromatine occupe 70% du volume du noyau. Une bordure située à 500-600 nm de l'enveloppe nucléaire contient le territoire d'euchromatine et d'hétérochromatine associée à la membrane nucléaire. Le volume d'hétérochromatine associée à la membrane nucléaire représente 15% du volume d'hétérochromatine totale (**figure 38C**).

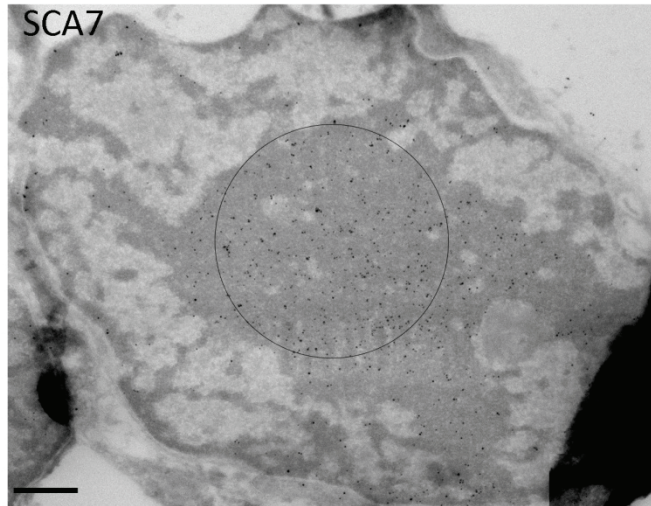
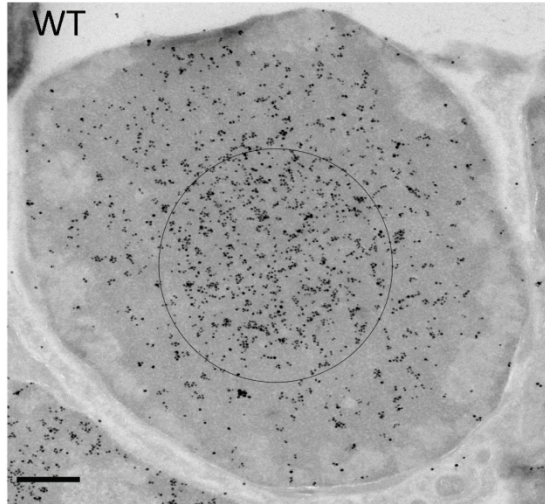
L'expression de l'ATXN7 polyQ dans le noyau de bâtonnets entraîne une importante désorganisation nucléaire (**figure 38B**). Le volume du noyau SCA7 est augmenté d'un facteur supérieur à deux (2.17). La fraction occupée par l'hétérochromatine est réduite à 58% contre 70% dans le noyau de bâtonnet normal. La proportion d'hétérochromatine au centre du noyau est réduite et une bordure élargie, située à 1.5-2 μm de l'enveloppe nucléaire, contient le territoire d'euchromatine et d'hétérochromatine associée à la membrane nucléaire. La proportion d'hétérochromatine associée à la membrane nucléaire est plus importante et représente 24% du volume d'hétérochromatine totale (**figure 38C**).

L'expression de l'ATXN7 polyQ est corrélée avec un important remodelage de la chromatine dans les noyaux de bâtonnets SCA7. L'augmentation du volume nucléaire suggère l'existence d'un phénomène de décondensation de la chromatine dans ces noyaux. La chromatine adopte des niveaux de compaction nucléosomique différents comparés aux noyaux de bâtonnets normaux. De plus, l'augmentation de la proportion d'hétérochromatine associée à la membrane nucléaire dans les noyaux SCA7 suggère un

H3K9me3



H4K20me3



H3K27me3

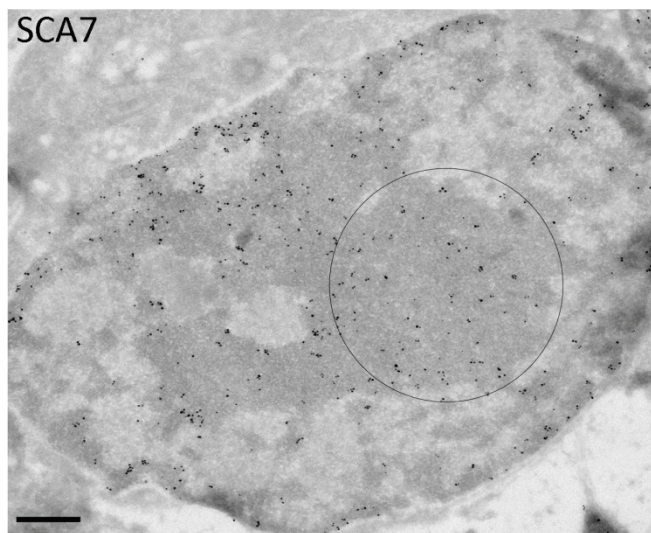
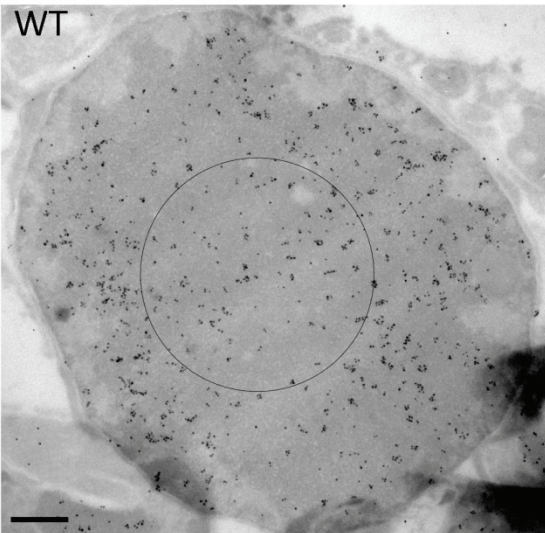


Figure 39 : Immunomarquage des histones tri-méthylées associées à la transcription inactive dans les noyaux de bâtonnets normaux et SCA7.

Les histones tri-méthylées sur H3K9, H4K20 et H3K27 sont immuno-marquées à l'or colloïdal dans les noyaux de bâtonnets normaux (à gauche) et SCA7 (à droite). Le cercle noir représente le cœur central d'hétérochromatine. Les barres d'échelles correspondent à 500nm.

déplacement de l'hétérochromatine centrale vers la périphérie du noyau pour venir s'associer à l'enveloppe nucléaire.

2) Organisation du territoire d'hétérochromatine dans les noyaux de bâtonnets SCA7 :

Dans les noyaux de bâtonnets, on peut définir 3 compartiments distincts d'hétérochromatine: - l'hétérochromatine associée à l'enveloppe nucléaire (HC-Env nuc) se situant dans la bordure du noyau qui s'étend à une distance de 150-200 nm de la membrane nucléaire ; - l'hétérochromatine centrale (HC-centrale) située au cœur du noyau et – l'hétérochromatine périphérique (HC-periph) qui se situe au bord du territoire central d'hétérochromatine et qui s'étend de l'interface qui sépare l'euchromatine et l'hétérochromatine jusqu'à 300 nm dans le territoire d'hétérochromatine.

Pour étudier les remodelages de la chromatine et l'organisation de l'hétérochromatine dans les noyaux de bâtonnets SCA7, j'ai localisé, dans ces noyaux, les histones tri-méthylées associées à la chromatine transcriptionnellement inactive par immunomarquage à l'or colloïdal. Ainsi, j'ai localisé les histones H3 tri-méthylées sur la lysine 9 et les histones H4 tri-méthylées sur la lysine 20, ces marques sont associées à l'hétérochromatine dite constitutive. J'ai aussi localisé les histones H3 tri-méthylées sur la lysine 27 spécifiquement associées à l'hétérochromatine dite facultative (**figure 39**). Pour chaque marque, j'ai déterminé la densité moyenne de particules présentes par μm^2 dans chacun des compartiments d'hétérochromatine, dans les noyaux de bâtonnets normaux et les noyaux de bâtonnets SCA7 (**figure 40**). La densité de marquage présente dans chaque compartiment est normalisée par rapport à la densité de marquage présente dans le territoire d'hétérochromatine associée à l'enveloppe nucléaire. Pour réaliser cette étude, on estime que les modifications d'histones présentes sur les nucléosomes ne changent pas mais que c'est la distribution des nucléosomes au sein des noyaux de bâtonnets SCA7 qui est altérée.

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, dans les noyaux de bâtonnets normaux, les histones tri-méthylées s'organisent de façon concentrique et définissent différents états de la chromatine condensée. Les histones H3 tri-méthylées sur la lysine 9 sont enrichies au centre du noyau et sont 25 fois plus abondantes dans le territoire d'HC

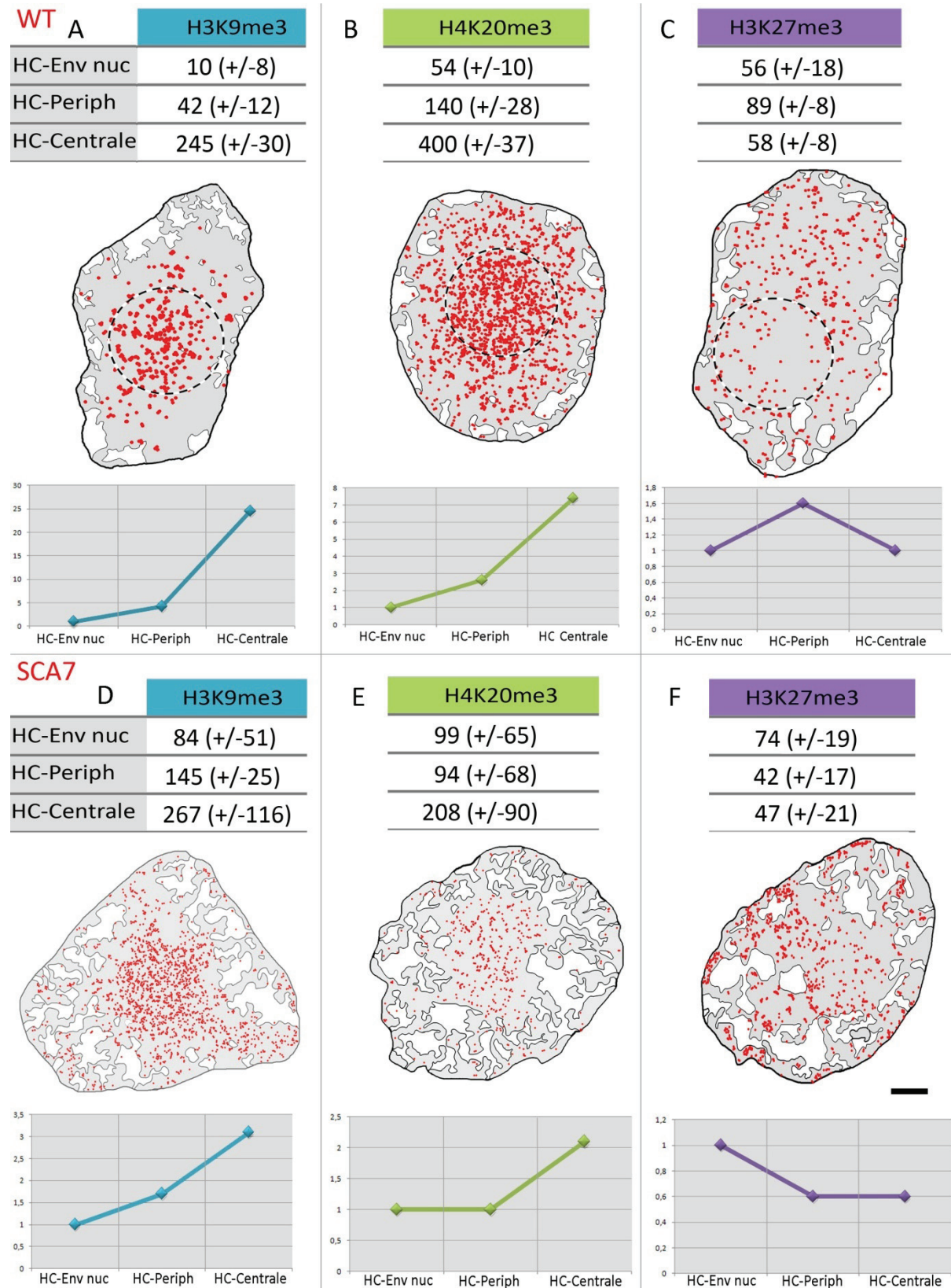


Figure 40 : Distribution des densités de marquage des histones tri-méthylées associées à la transcription inactive dans les différents compartiments d'hétérochromatine des noyaux de bâtonnets normaux et SCA7.

La distribution des histones tri-méthylées respectivement sur H3K9, H4K20 et H3K27 est représentée schématiquement dans les noyaux de bâtonnets normaux (A, B et C) et SCA7 (D, E et F). Pour chaque marque, les densités de marquage en billes par μm^2 présentes dans chaque compartiment d'hétérochromatine sont répertoriées dans un tableau et représentées graphiquement. (HC-Env nuc : HC associée à l'enveloppe nucléaire ; HC-Periph : HC en périphérie et HC-centrale : HC au centre du noyau). La barre d'échelle correspond à 250nm dans les noyaux WT et 500 nm dans les noyaux SCA7.

centrale comparé au territoire d'HC associé à l'enveloppe nucléaire (**figure 40A**). Par ailleurs, les histones H4 tri-méthylées sur la lysine 20 sont 7.5 fois plus abondantes dans le territoire d'HC centrale (**figure 40B**). Ces marques définissent le cœur central d'hétérochromatine constitutive. Les histones H3 tri-méthylées sur la lysine 27 se localisent préférentiellement en périphérie du territoire d'hétérochromatine et sont 1.6 fois plus abondantes dans l'HC périphérique comparé au territoire d'HC centrale ou d'HC associée à l'enveloppe nucléaire (**figure 40C**). Cette marque définit le territoire d'hétérochromatine facultative.

a) Le cœur d'hétérochromatine constitutive est conservé dans les noyaux de bâtonnets SCA7 :

Dans le noyau des bâtonnets SCA7, les histones tri-méthylées associées à la chromatine transcriptionnellement inactive ne sont pas uniformément réparties dans le territoire d'hétérochromatine définissant différents compartiments.

La partie centrale d'hétérochromatine qui se situe à 1.5-2 μm de l'enveloppe nucléaire est hyper-méthylée sur la lysine 9 de l'histone H3 et sur la lysine 20 de l'histone H4. Ces marques sont en moyenne 2.5 fois plus abondantes dans le territoire d'HC centrale que dans le territoire d'HC associée à l'enveloppe nucléaire (**figure 40D et E**).

Ces résultats suggèrent, que l'expression de l'ATXN7 polyQ dans les noyaux de bâtonnets SCA7, ne modifie pas le statut de méthylation du cœur d'hétérochromatine constitutive qui perdure au centre du noyau même pour des stades avancés de la maladie.

b) L'hétérochromatine facultative s'associe à l'enveloppe nucléaire dans les noyaux de bâtonnets SCA7 :

Dans les noyaux de bâtonnets SCA7, le volume d'hétérochromatine associée à l'enveloppe nucléaire est trois fois plus important (cf. fig. 38) que dans les noyaux de bâtonnets normaux. Il y a donc un déplacement de l'hétérochromatine vers la périphérie du noyau pour venir s'associer à la membrane nucléaire. Dans le but de caractériser l'hétérochromatine qui vient spécifiquement s'associer à l'enveloppe nucléaire, j'ai étudié la distribution des histones tri-méthylées au sein du territoire d'HC associée à l'enveloppe nucléaire.

La densité de marquage des histones tri-méthylées sur H3K9 et H4K20 (associées à l'HC constitutive) dans le territoire d'HC associée à l'enveloppe nucléaire des noyaux de

bâtonnets SCA7 est plus élevée comparée au noyaux de bâtonnets normaux (avec en moyenne 92 billes/ μm^2 dans les noyaux SCA7 contre 32 billes/ μm^2 dans les noyaux normaux) (**figure 40D et E**) et se rapproche de la densité de marquage présente dans le territoire d'HC périphérique des noyaux de bâtonnets normaux (avec en moyenne 91 billes/ μm^2) (**figure 40A et B**). Ces résultats suggèrent un déplacement de l'hétérochromatine facultative vers la périphérie du noyau. Cette hypothèse est confirmée par la distribution des histones H3K27me3. Dans les noyaux de bâtonnets SCA7, les histones H3 tri-méthylées sur la lysine 27 sont préférentiellement localisées dans le compartiment d'HC associée à l'enveloppe nucléaire avec une densité de marquage 1.6 fois plus élevée comparé aux territoires d'HC centrale et d'HC périphérique (**figure 40F**). De plus, la distribution de H3K27me3 est homogène au centre du noyau avec une densité de marquage identique dans les territoires d'HC centrale et d'HC périphérique contrairement aux noyaux de bâtonnets normaux qui présentent une densité de marquage plus élevée au niveau du territoire d'HC périphérique (**figure 40C**).

Le profil de distribution des histones tri-méthylées associées à la chromatine transcriptionnellement inactive, permet de mettre en évidence un déplacement spécifique de l'hétérochromatine facultative du centre vers l'enveloppe nucléaire dans les bâtonnets de rétines SCA7. Au cours de la progression de la pathologie, l'hétérochromatine facultative se détache progressivement du cœur d'hétérochromatine constitutive pour venir s'associer à l'enveloppe nucléaire, et la proportion d'hétérochromatine associée à l'enveloppe nucléaire pourrait corrélérer avec le stade d'évolution de la maladie.

3) Etude de l'activité HAT du complexe SAGA dans les noyaux de bâtonnets SCA7 :

L'ATXN7 qui est la protéine portant l'expansion polyQ dans les rétines SCA7, est une sous-unité du complexe co-activateur de transcription SAGA. Le complexe SAGA est connu pour activer la transcription notamment via une activité histone-acétyl transférase (HAT) avec en particulier l'acétylation de l'histone H3. Une des hypothèses avancées pour expliquer la dérégulation transcriptionnelle des gènes dans les rétines SCA7, repose sur un dysfonctionnement de l'activité HAT du complexe SAGA après incorporation de l'ATXN7 polyQ au sein du complexe (McMahon et al., 2005).

Pour tester cette hypothèse, j'ai extrait les histones des rétines de souris normales et de souris SCA7 dans le but de comparer le niveau d'acétylation de l'histone H3. Par des expériences de Western Blot, j'ai révélé la présence des histones H3 acétylées sur les lysines 9 et 14 ainsi que les histones H3 uniquement acétylées sur la lysine 14 dans les rétines normales et SCA7. Afin de normaliser les résultats j'ai utilisé un anticorps anti-H2B pour révéler la présence de cette histone dans chaque préparation d'extrait protéique (**figure 41A**).

Après quantification et normalisation des résultats, aucune différence significative n'a été observée entre le niveau d'acétylation de l'histone H3 des rétines de souris normales et des rétines de souris SCA7 (n=4) (**figure 41B**).

Ces résultats démontrent que l'expression de l'ATXN7 polyQ ne modifie pas le niveau d'acétylation des histones H3 dans les bâtonnets de rétines SCA7 qui reste comparable au niveau d'acétylation des histones H3 dans les rétines de souris normales. Les défauts transcriptionnels observés dans les noyaux de bâtonnets SCA7 ne semblent pas être liés à un dysfonctionnement de l'activité HAT du complexe SAGA après incorporation de l'ATXN7 polyQ et l'hypothèse de départ peut être réfutée.

4) Etude du phénotype nucléaire des bâtonnets de rétines

SCA7 :

L'expression de l'ATXN7 polyQ dans le noyau des bâtonnets de rétine SCA7 s'accompagne d'une importante réorganisation de la chromatine corrélée à une sévère altération de l'expression des gènes.

Pour tenter de mieux comprendre le phénotype observé dans ces noyaux, j'ai réalisé, une approche « gène candidat ». Le but de cette approche est de déterminer les gènes dont l'expression est dérégulée dans les noyaux de bâtonnets de rétines SCA7 et qui pourraient expliquer le phénotype observé.

Les gènes dont l'expression est modifiée dans les noyaux de bâtonnets SCA7 ont pu être identifiés par analyse bio-informatique de données transcriptomiques. Les données transcriptomiques précédemment obtenues au sein de l'IGBMC (Abou-Sleymane et al., 2006), sont issues de rétines de souris normales et de souris SCA7.

La liste des gènes candidats ainsi générée est présentée en annexe dans le **tableau 6**.

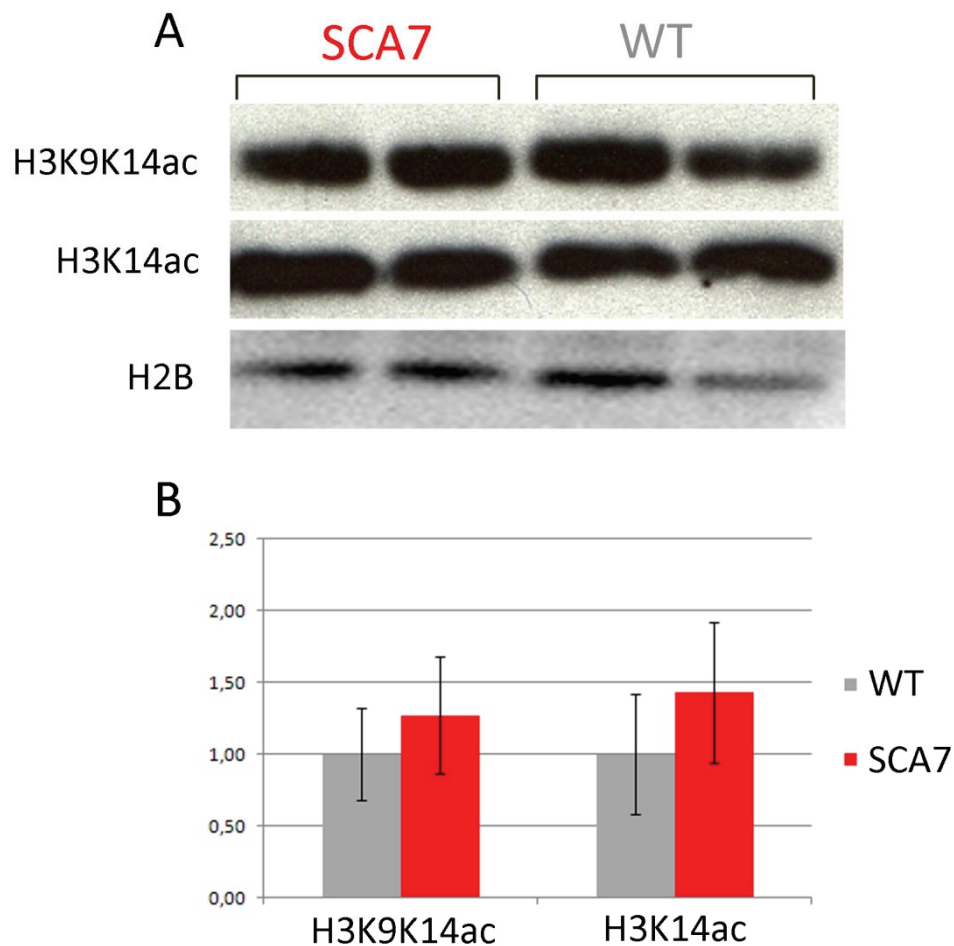


Figure 41 : Acétylation de l’histone H3 dans les rétines de souris normales et SCA7.

(A) Détection par Western Blot des histones H3 acétylées sur la lysine 9 et 14, des histones H3 acétylées sur la lysine 14 et des histones H2B dans les extraits protéiques issus de rétines SCA7 (gauche) et normales (droite). (B) Représentation graphique du niveau d’acétylation de l’histone H3 sur les lysines 9 et 14 et sur la lysine 14 dans les rétines normales (gris) et SCA7 (rouge) après quantification des bandes et normalisation par rapport à H2B.

Parmi ces gènes, l'histone H1c a attiré notre attention avec un nombre d'ARN messagers réduit d'un facteur 1.91 dans les rétines SCA7 comparées aux rétines normales. En effet, l'histone H1c est connue pour jouer un rôle important dans l'espacement des nucléosomes et la compaction de la chromatine des noyaux en interphase (Hashimoto et al., 2010). L'histone H1 pourrait donc constituer un candidat pertinent pour expliquer le phénotype observé dans les noyaux de bâtonnets SCA7.

Dans le but d'étudier au niveau protéique la diminution d'expression de l'histone H1 dans les noyaux de bâtonnets de rétines SCA7, les histones extraites des rétines SCA7 et normales, par extraction acide, sont déposées sur gel polyacrylamide dénaturant. Les protéines présentes dans le gel sont séparées en fonction de leur taille et colorées au bleu de Coomassie (**figure 42**). Sur le gel, une bande correspondant à une protéine de 33 kDa est présente au niveau des extraits protéiques issus des rétines normales mais n'est pas détectable dans les extraits protéiques de rétines SCA7.

L'analyse de cette bande par spectrométrie de masse a permis d'identifier la protéine manquante comme étant l'isoforme « c » de l'histone H1.

Ces résultats mettent en évidence dans les noyaux de bâtonnets SCA7 une importante diminution du niveau d'expression de l'histone H1c avec une perte de détection de la protéine correspondante dans les extraits protéiques de rétines SCA7. Cette perte d'histone H1c est corrélée à une décondensation de la chromatine, une augmentation du volume nucléaire et une réorganisation du territoire d'hétérochromatine dans ces noyaux. Une hypothèse pour expliquer le phénotype observé dans les noyaux de bâtonnets de souris SCA7 pourrait donc reposer sur une diminution de l'expression de l'histone H1c suite à l'incorporation de l'ATXN7 polyQ dans le complexe SAGA. Ces données suggèrent que l'histone H1c pourrait jouer un rôle crucial dans l'organisation des noyaux de bâtonnets normaux.

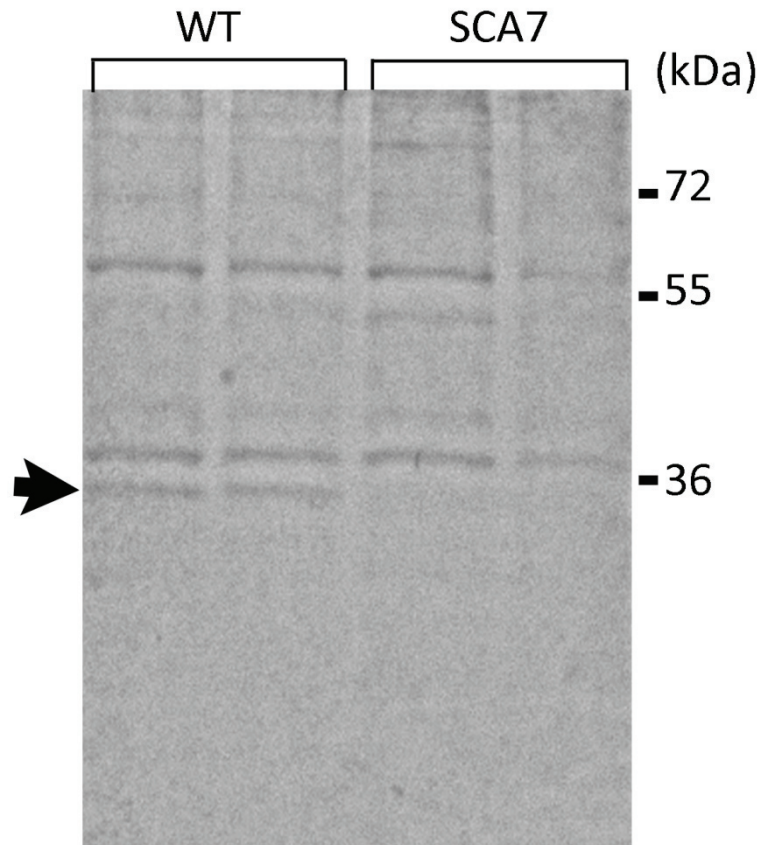


Figure 42 : Séparation des protéines extraites des rétines de souris normales et SCA7 âgées de 28 semaines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante.

Les protéines basiques présentes dans les rétines de souris normales (à gauche) et SCA7 (à droite) sont séparées en fonction de leur taille et colorées au bleu de Coomassie.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de mon doctorat mettent en lumière une organisation structurale et fonctionnelle de la chromatine à la résolution du nucléosome dans les noyaux de bâtonnets de rétines de souris normales et SCA7 (**figure 43**). Cette étude réalisée avec des techniques de microscopie électronique nous offre une description unique du noyau permettant de corrélérer *in vivo* l'organisation tridimensionnelle de la chromatine avec les modifications post-traductionnelles des histones et l'activité transcriptionnelle.

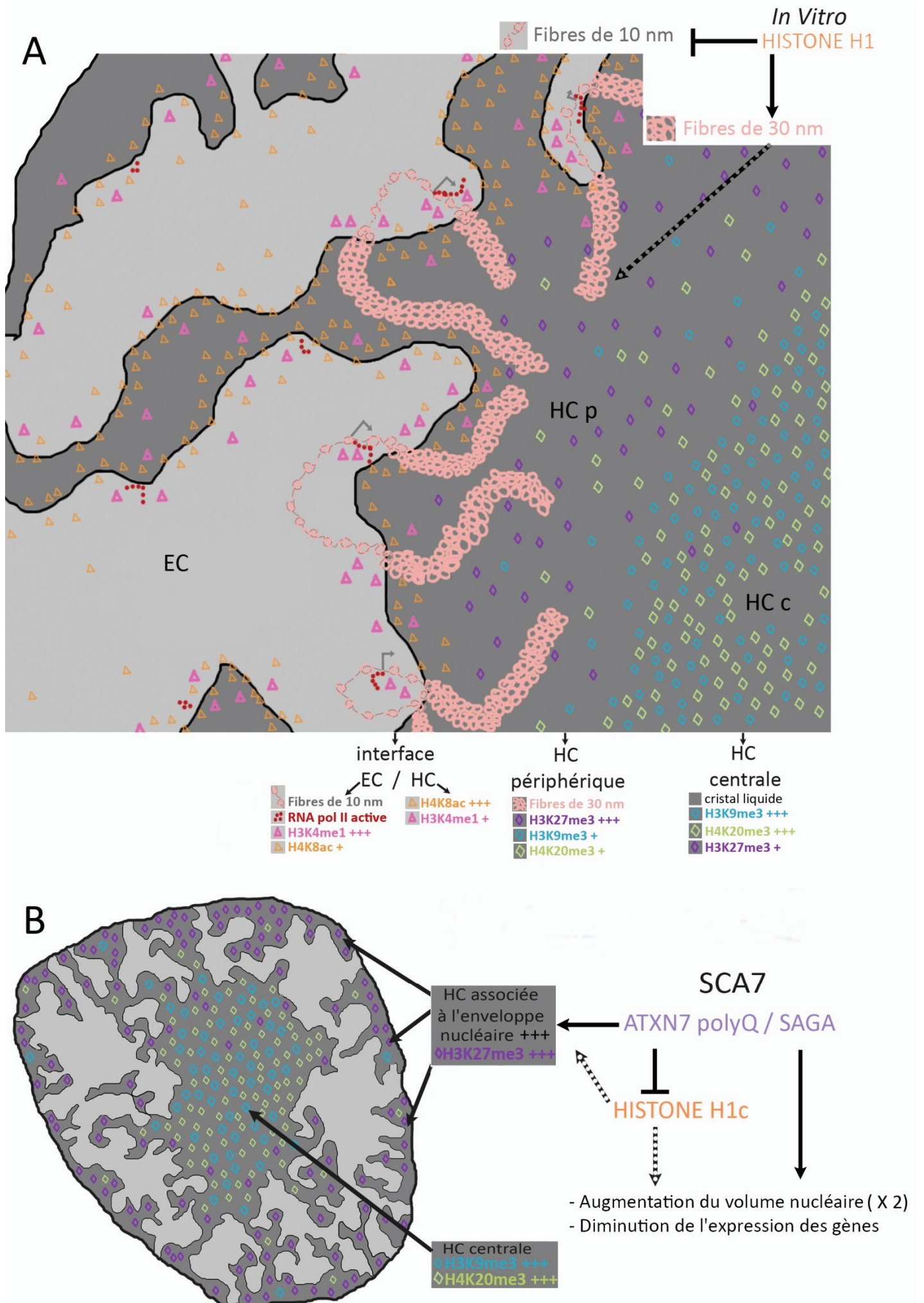
I. L'interface entre le territoire d'euchromatine et d'hétérochromatine :

L'étude ultrastructurale du noyau de bâtonnets issus de rétines de souris normales permet de proposer l'existence d'une régulation dynamique de l'expression des gènes à l'interface entre le territoire d'euchromatine et d'hétérochromatine. Cette hypothèse s'appuie sur différentes observations réalisées dans ces noyaux.

1) De la fibre de chromatine de 10nm à la transcription des gènes:

Tout d'abord, les expériences de tomographie électronique réalisées dans ces régions ont montré l'existence de fibres de 10 nm de diamètre qui pourraient correspondre à la chromatine organisée en « collier de perles ». Les fibres individuelles de 10 nm, se détachent du compartiment dense d'hétérochromatine pour s'étendre vers l'intérieur du compartiment d'euchromatine, formant ainsi un gradient de décondensation de la chromatine. Différents degrés de compaction de la chromatine sont présents dans le compartiment d'euchromatine suggérant un rôle actif de l'organisation de la chromatine sur la transcription.

De plus, les expériences d'immunomarquage en microscopie électronique ont permis de mettre en évidence dans ces noyaux, les molécules d'ARN polymérase II en cours de transcription. De façon surprenante, la distribution des molécules de polymérase II actives



n'est pas aléatoire dans le compartiment de chromatine décondensée. Les molécules viennent préférentiellement se localiser dans l'euchromatine, à 20 nm (+/-20nm) de l'interface qui sépare le territoire d'euchromatine du territoire d'hétérochromatine. La transcription se fait donc à une distance fixe du bord qui sépare l'euchromatine de l'hétérochromatine renforçant l'idée que cette interface puisse jouer un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. L'interface pourrait organiser les gènes dans le noyau, de façon à rendre les séquences promotrices accessibles à la machinerie de transcription. La transition entre les compartiments d'hétérochromatine et d'euchromatine pourrait constituer une étape limitante de l'élongation de la transcription.

Ces expériences montrent que plusieurs épitopes de l'ARN polymérase II sont immunodécorsés au niveau de chaque site de transcription. Cette organisation pourrait correspondre aux « foyers de transcription » décrits par l'équipe de Peter Fraser suggérant que les facteurs de transcription et les polymérases se regroupent au niveau de certains sites du noyau pour former des usines à transcription dans lesquelles plusieurs gènes se rassemblent (Osborne et al., 2004; Sexton et al., 2007b). Cependant, dans nos conditions d'immunomarquage, les molécules d'ARN polymérase II actives sont localisées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la séquence heptapeptidique répétée de l'extrémité C-terminale de la grande sous-unité Rpb1 de la polymérase II et une seule molécule d'ARN polymérase II peut fixer plusieurs anticorps. Ces expériences ne nous permettent pas d'affirmer l'existence de « foyer de transcription » dans les noyaux de bâtonnets. Pour vérifier cette hypothèse, l'immunolocalisation des molécules d'ARN polymérase II doit être réalisée à l'aide d'un nouvel anticorps dirigé contre une séquence peptidique non répétée de l'ARN polymérase II.

2) Les histones modifiées et l'organisation des gènes :

Les histones hyper-acétylées viennent décorer spécifiquement l'interface qui sépare l'euchromatine de l'hétérochromatine suggérant que cette bordure pourrait jouer un rôle important dans l'organisation des gènes dans le noyau. En effet, les histones acétylées sont préférentiellement localisées dans le territoire d'hétérochromatine à la bordure du territoire d'euchromatine. Nos résultats démontrent que la chromatine transcriptionnellement inactive peut être acétylée et que l'acétylation des histones n'est pas suffisante pour décondenser la chromatine suggérant un rôle important de l'histone H1 dans le mécanisme de décondensation de la chromatine (Robinson et al., 2008). L'ensemble de ces observations

soulève la question du rôle joué par l'acétylation des histones sur l'expression des gènes. Les expériences réalisées par Gilbert et ses collaborateurs ont permis de démontrer que la capacité d'un gène à être transcrit n'est pas nécessairement perdue lorsque la chromatine est condensée en fibres compactes, et que ce n'est pas la localisation des gènes dans les domaines d'euchromatine ou d'hétérochromatine qui régule l'activité des gènes mais d'autres facteurs tels que les modifications des histones (Gilbert et al., 2004). En s'appuyant sur ces résultats on peut suggérer que la chromatine condensée mais hyper-acétylée créerait dans le noyau un nouveau compartiment de chromatine « compétente », riche en gènes inactifs prêts à être transcrits. Nous proposons un rôle nouveau pour l'acétylation des histones qui pourrait assurer une auto-organisation des gènes dans le noyau. L'hyperacétylation des régions riches en gènes pourrait assurer l'auto-assemblage des gènes en périphérie du territoire d'hétérochromatine permettant aux gènes, indépendamment de leur statut transcriptionnel, d'être facilement accessibles à la machinerie de transcription. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par des expériences d'assemblage *in vitro* de chromatine purifiée. Il serait intéressant de pouvoir observer au microscope électronique l'organisation des séquences acétylées au cours de mécanismes de condensation de la chromatine et l'immunomarquage des histones acétylées nous permettrait de vérifier si les séquences acétylées s'organisent de façon aléatoire ou si elles sont préférentiellement exposées vers l'extérieur de la chromatine condensée.

Nos expériences démontrent que les histones hyper-acétylées ne représentent pas « la marque » spécifique de la chromatine décondensée transcriptionnellement active et que cet état actif de la chromatine reposerait plutôt sur la présence de l'histone H3 mono-méthylée sur la lysine 4. En effet, nos résultats montrent que l'histone H3 mono-méthylée sur la lysine 4 (H3K4me1) est préférentiellement localisée dans le compartiment d'euchromatine mais toujours à proximité de l'interface qui sépare l'euchromatine de l'hétérochromatine. Des expériences d'analyse du génome humain par immunoprécipitation de la chromatine montrent que les régions régulatrices distales sont riches en H3K4me1 et en particulier les séquences « enhancers » (Heintzman et al., 2007). La distribution de H3K4me1 dans le compartiment d'euchromatine à proximité de l'interface semble comparable au profil de distribution des molécules d'ARN polymérase II actives suggérant un rapprochement physique entre les séquences « enhancers » riche en H3K4me1 et les molécules d'ARN polymérase II à proximité de l'interface. Différentes études ont permis de mettre en

évidence l'existence de boucles de chromatine (**figure 43**) assurant l'interaction des séquences régulatrices distales avec les séquences promotrices et ces boucles joueraient un rôle important dans la régulation de l'expression de certains gènes (Li et al., 2006).

3) De l'euchromatine « active » à l'hétérochromatine « compétente » :

L'ensemble de ces observations converge pour placer l'interface qui sépare l'euchromatine et l'hétérochromatine au cœur des mécanismes de régulation de la transcription au sein des noyaux de bâtonnets. Une expérience intéressante serait de pouvoir localiser dans ces noyaux les gènes actifs par hybridation *in situ* à la résolution de la microscopie électronique. Les expériences de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) réalisées par Solovei et ses collaborateurs ont permis de localiser les séquences codantes en périphérie des noyaux de bâtonnets (Solovei et al., 2009). Cependant, les observations réalisées à la résolution de la microscopie optique ne permettent pas de déterminer l'organisation précise des séquences codantes par rapport à l'interface.

De récentes découvertes ont permis de mettre en évidence au sein des noyaux une organisation en sous-compartiments spécialisés avec une architecture nucléaire qui jouerait un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes (Sexton et al., 2007a). En accord avec ces données, l'ensemble de nos résultats suggère l'existence d'une nouvelle région nucléaire cruciale pour l'expression des gènes située à l'interface entre l'euchromatine et l'hétérochromatine qui pourrait s'organiser en deux domaines distincts. Un compartiment d'euchromatine transcriptionnellement active riche en H3K4me1 et en molécules d'ARN polymérase II et un compartiment d'hétérochromatine « compétente » hyper-acétylée duquel les fibres individuelles de 10 nm de diamètre se détachent pour s'étendre dans le compartiment d'euchromatine. Ce compartiment condensé mais hyper-acétylé suggère que l'acétylation des histones n'est pas suffisante pour décondenser la chromatine en fibre de 10 nm. Les mécanismes de décondensation de la chromatine doivent reposer sur d'autres facteurs au sein desquels l'histone H1 pourrait jouer un rôle clé.

II. Organisation structurale de l'hétérochromatine dans les noyaux de bâtonnets normaux :

1) Deux états de la chromatine condensée :

Nos résultats mettent en évidence des différences structurales et fonctionnelles d'organisation du territoire d'hétérochromatine des noyaux de bâtonnets. Ainsi, on peut distinguer deux niveaux de condensation de la chromatine corrélés à la distribution concentrique des modifications d'histones : La partie centrale du territoire d'hétérochromatine de texture homogène, hyperméthylée sur H3K9 et H4K20 et qui correspond à l'hétérochromatine constitutive, et la partie périphérique du territoire d'hétérochromatine de texture granuleuse, hyperméthylée sur H3K27, formée de fibres de chromatine individuelles de 30 nm de diamètre qui correspond à l'hétérochromatine facultative.

Notre étude révèle pour la première fois un signal fort à $1/30\text{nm}^{-1}$ sur la transformée de Fourier d'images de noyaux suggérant que l'hétérochromatine puisse s'organiser en fibres individuelles de 30 nm de diamètre au sein de ces noyaux. A l'heure actuelle, deux modèles d'organisation structurale de la chromatine condensée s'opposent et l'existence même de ces fibres *in vivo* reste très controversée (Robinson and Rhodes, 2006). Le premier modèle repose sur des expériences de SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) réalisées sur des noyaux intacts de cellules en culture mettant en évidence un pic de diffraction à $1/30\text{nm}^{-1}$ (Langmore and Paulson, 1983), cette organisation hélicoïdale en fibre de 30 nm est également visible en microscopie électronique sur de la chromatine isolée en présence d'histones internucléosomales et de cations bivalents (Finch and Klug, 1976; Robinson et al., 2006; Thoma et al., 1979). Cependant, les fibres de chromatine de 30 nm de diamètre n'ont jamais pu être détectées *in situ* sur des sections de noyaux observées au microscope électronique et le second modèle propose une organisation de la chromatine sous forme d'un « cristal liquide ». En effet, les expériences réalisées par Elstov et ses collaborateurs démontrent que dans les meilleures conditions de cryo-préservation des échantillons ne permettent pas de détecter la présence de fibres individuelles de 30 nm dans les noyaux en interphase par cryo-microscopie électronique (Elstov et al., 2008). Les auteurs suggèrent que

ces fibres existent seulement dans des conditions où la chromatine est diluée et que la concentration de la chromatine dans le volume nucléaire force les fibres à interagir les unes avec les autres pour former «une mer de nucléosomes ».

L'étude ultrastructurale du noyau de bâtonnet, nous a permis de mettre en évidence la coexistence des deux niveaux d'organisation de la chromatine condensée au sein d'un même noyau. L'hétérochromatine périphérique granuleuse qui pourrait s'organiser en fibres de 30 nm de diamètre et l'hétérochromatine centrale homogène qui forme une « mer de nucléosomes ». Ces résultats montrent une organisation polymorphe de la chromatine condensée *in vivo* qui semble être fortement liée au type de noyau étudié. L'état polymorphique de la chromatine dans les noyaux de bâtonnets suggère une organisation structurale dynamique de la chromatine *in vivo*. Dans le cas du noyau de bâtonnet, l'organisation spécifique de la chromatine avec un domaine d'hétérochromatine hautement condensé qui occupe 70% de la surface totale du noyau, permet d'obtenir un nombre suffisant de structures répétées pour détecter un signal de 30 nm sur la transformée de Fourier. De plus, contrairement aux expériences de cryo-microscopie électronique, réalisées par l'équipe du professeur Dubochet, où les noyaux sont observés en fonction de leur contraste intrinsèque, dans nos conditions expérimentales, le noyau est contrasté par des métaux lourds ce qui augmente le rapport du signal sur bruit. Il serait très intéressant de pouvoir confirmer la présence d'un signal à $1/30 \text{ nm}^{-1}$ sur la transformée de Fourier d'image de cryo-sections de noyaux de bâtonnets observés par cryo-microscopie électronique.

2) L'histone H1 et les fibres de chromatine de 30nm:

In vitro, en condition de force ionique faible ou modérée, l'histone H1 joue un rôle crucial dans l'organisation de la chromatine condensée (Thoma et al., 1979). En effet, l'addition d'histone H1 permet d'assembler deux ADN duplex pour former une structure en forme de tige d'environ 30 nm (Hamiche et al., 1996). Au contraire, en absence d'histone H1, les répulsions électrostatiques écartent les queues d'ADN de part et d'autre du nucléosome empêchant la fibre de chromatine de 10 nm de se condenser.

In vivo, il existe de nombreux sous-types de l'histone H1 avec par exemple 6 sous-types différents chez la souris. Le sous-type somatique H1c est le plus fortement exprimé (Wang et al., 1997). La perte de fonction de l'histone H1c dans les cellules en culture s'accompagne

d'une réorganisation de l'espacement des nucléosomes et d'un gonflement du noyau (Hashimoto et al., 2010; Sancho et al., 2008).

De façon surprenante, les noyaux de bâtonnets de souris modèles pour la maladie SCA7, présentent une forte diminution de l'expression de l'histone H1c corrélée avec une décondensation et une réorganisation de la chromatine et à un gonflement du volume du noyau.

Dans les noyaux de bâtonnets SCA7, on observe un déplacement spécifique de l'hétérochromatine facultative riche en H3K27me3 vers la périphérie du noyau pour venir s'associer à la membrane nucléaire. Nous savons que dans les noyaux de bâtonnets normaux l'hétérochromatine facultative riche en H3K27me3 s'organise spécifiquement en fibres de chromatine de 30 nm. On peut alors envisager que la perte de l'histone H1c dans les noyaux de bâtonnets SCA7 touche prioritairement l'hétérochromatine facultative. L'hétérochromatine des noyaux de bâtonnets SCA7 ainsi réorganisée se rapproche morphologiquement de l'organisation de la chromatine condensée des noyaux de cellules de type fibroblastes en culture, avec une certaine proportion de l'hétérochromatine associée à la membrane nucléaire (figure 7). Dans ces conditions, les fibres de 30 nm ne sont plus détectées.

L'ensemble de ces observations suggère que le niveau d'expression de l'histone H1c dans les noyaux de bâtonnets serait responsable de la condensation caractéristique de l'hétérochromatine facultative observée dans ces noyaux.

La comparaison par bio-informatique des données transcriptomiques de rétines de souris adultes avec les données transcriptomiques issues de différents tissus de l'organisme, permettrait de vérifier cette hypothèse et de détecter si le niveau d'expression de l'histone H1c est significativement plus élevé dans les noyaux de bâtonnets que dans les noyaux d'autres types cellulaires.

De plus, la comparaison de données transcriptomiques issues de rétines de souris à différents stades du développement de la rétine, nous permettrait d'étudier le profil d'expression des gènes au cours du développement et précisément au moment de la formation du territoire central d'hétérochromatine dans les noyaux des précurseurs de bâtonnets pour voir notamment si cet événement est corrélé à un pic d'expression de l'histone H1.

Enfin, l'étude du phénotype de cellules en culture qui sur-expriment l'histone H1c sera nécessaire pour corrélérer *in cellulo* le niveau d'expression de l'histone H1c avec l'organisation structurale de la chromatine condensée et la détection éventuelle de fibres individuelles de 30 nm. L'ensemble de ces expériences sera nécessaire pour étudier le rôle de l'histone H1 dans les noyaux de bâtonnets et plus généralement sur l'organisation *in vivo* de la chromatine condensée.

III. Les noyaux de bâtonnet de rétine de souris modèles pour la maladie génétique SCA7 :

1) L'ATXN7 polyQ et le complexe SAGA :

Les souris modèles pour la maladie génétique SCA7 qui expriment spécifiquement l'ATXN7 polyQ sous le contrôle du promoteur rhodopsine présentent un phénotype rétinien sévère corrélé à une diminution de l'expression d'un nombre important de gènes, en particulier les gènes impliqués dans les fonctions de phototransduction (Abou-Sleymane et al., 2006). Des travaux réalisés sur différents modèles pour la maladie SCA7 montrent que l'activité histone acétyl-transférase du complexe SAGA est affecté lorsque l'ATXN7 polyQ est exprimée, entraînant une diminution du niveau d'acétylation de l'histone H3 (McMahon et al., 2005; Palhan et al., 2005). Cependant, ces observations restent assez controversées et les travaux réalisés par Helmlinger et ses collaborateurs mettent au contraire en évidence une hyperacétylation de l'histone H3 dans les rétines de souris modèles pour la maladie SCA7 (Helmlinger et al., 2006a).

Dans nos mains, aucune de ces hypothèses n'a pu être confirmée et nos expériences montrent un niveau d'acétylation de l'histone H3 identique dans les rétines de souris normales et SCA7. Nos résultats suggèrent donc que l'activité HAT du complexe SAGA n'est pas modifiée en présence d'ATXN7 polyQ. Le rôle de cette protéine mutée au sein du complexe SAGA reste encore à élucider.

Toutefois, l'ATXN7 qui est une sous-unité du complexe SAGA fait partie intégrante d'un sous-module de débubiquitylation des histones (Zhao et al., 2008). Ce module de débubiquitylation joue un rôle crucial pour le couplage de la transcription des gènes et l'export nucléaire des ARNs messagers (Kohler et al., 2006). L'effet de l'ATXN7 polyQ sur les activités du module de débubiquitylation des histones n'a pas encore été exploré et pourrait se révéler fructueux pour comprendre les défauts transcriptionnels au sein des noyaux de bâtonnets SCA7.

En effet, une étude récente réalisée sur la levure démontre que la sous-unité Sgf73, l'homologue de l'ATXN7 chez la levure, est non seulement cruciale pour l'activité de débubiquitylation des histones du complexe SAGA mais aussi pour le recrutement au niveau du complexe SAGA de composants du complexe d'export des ARNs messagers. Ces travaux mettent en évidence qu'une perte de fonction de Sgf73 s'accompagne notamment de défauts d'export des messagers (vers l'extérieur du noyau) (Kohler et al., 2008). De plus, des expériences réalisées sur la levure ont pu mettre en évidence l'importance du positionnement nucléaire des gènes pour le contrôle de leur expression avec un confinement des gènes actifs au niveau de l'enveloppe nucléaire. Ce confinement des gènes repose sur des composants du complexe γ SAGA et du complexe du pore nucléaire (Cabal et al., 2006). Ces travaux démontrent que les sous-unités du complexe γ SAGA qui s'associent aux pores nucléaires participent non seulement à l'export des ARNs messagers mais jouent aussi un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes (Akhtar and Gasser, 2007).

Ainsi de nouvelles hypothèses peuvent être proposées pour comprendre les défauts transcriptionnels dans les noyaux de bâtonnets SCA7. Ces derniers pouvant être la conséquence de défauts de l'activité de débubiquitylation des histones et de défauts d'export des ARNs messagers.

Pour tester ces différentes hypothèses, il faudrait comparer le niveau d'ubiquitylation des histones dans les rétines de souris normales et SCA7 afin de détecter s'il y a ou non une augmentation significative des histones ubiquitylées dans les rétines SCA7.

Par immunocytochimie, les sous-unités du complexe SAGA peuvent être localisées dans les noyaux de bâtonnets normaux et SCA7. La distribution de ces sous-unités par rapport à l'enveloppe nucléaire pourrait refléter la présence éventuelle de défauts

d'association du complexe SAGA avec le complexe du pore nucléaire dans les noyaux de bâtonnets qui expriment l'ATXN7 polyQ.

Enfin des techniques de visualisation et de quantification des ARNs dans les noyaux, nous permettront de déterminer si il y a ou non une accumulation des messagers dans les noyaux de bâtonnets de rétines SCA7. La détection des messagers peut être réalisée par FISH (*fluorescent in situ hybridization*) à l'aide d'une sonde fluorescente dirigée contre les ARNs messagers totaux ; ou encore, par la méthode de coloration régressive à l'EDTA (Bernhard, 1968) qui permettra de visualiser spécifiquement les particules ribonucléo-protéiques au microscope électronique.

2) L'histone H1 et la décondensation de la chromatine :

Dans le noyau des bâtonnets de rétines SCA7, on observe une diminution du niveau d'expression de l'histone H1c et une absence de cette protéine dans les extractions acides de rétines SCA7 après migration sur gel. La perte de l'histone H1c est corrélée à une importante réorganisation de la chromatine dans ces noyaux, en particulier une décondensation de l'hétérochromatine avec pour conséquence une augmentation du volume nucléaire. Des expériences réalisées sur différents types de cellules en culture ont permis de confirmer le rôle joué par l'histone H1c sur l'espacement des nucléosomes et la compaction de la chromatine des noyaux en interphase. Ces travaux mettent aussi en évidence que la perte de fonction de l'histone H1c est corrélée à une diminution de l'expression de nombreux gènes (Hashimoto et al., 2010; Sancho et al., 2008). L'ensemble de ces observations suggère que le phénotype des noyaux des bâtonnets de rétine SCA7 s'apparente à une perte de fonction spécifique de l'histone H1c.

L'une des hypothèses pourrait être que l'ATXN7 polyQ incorporée dans le complexe SAGA entraînerait une dérégulation de l'expression de certains gènes (par un mécanisme encore indéterminé) ainsi que la diminution d'expression de l'histone H1c, cruciale pour l'organisation de la chromatine dans les noyaux, entraînerait une importante décondensation de la chromatine corrélée à une diminution de l'expression des gènes dans ces noyaux. Cependant de nouvelles expériences doivent être réalisées pour venir confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Des cellules de bâtonnets issues de rétines de souris normales ou SCA7, peuvent être cultivées en explant (Zhang et al., 2002). Tout d'abord, il faudra vérifier si l'organisation

caractéristique de la chromatine des bâtonnets est préservée lorsque les cellules sont cultivées en explant. En effet, des travaux réalisés sur les noyaux de différents types cellulaires en culture mettent en évidence l'existence de forces d'entassement ou « crowding », liées aux fortes concentrations de macromolécules présentes dans les noyaux. Ces forces jouent un rôle important dans l'organisation et le maintien des compartiments nucléaires fonctionnels (Hancock, 2004). Les cellules de bâtonnets cultivées en explant sont dissociées du reste de la rétine et les forces exercées sur les noyaux seront différentes, il est donc important d'étudier l'organisation de la chromatine dans ces conditions.

La technologie d'ARN interférant peut être utilisée pour réaliser des expériences d'extinction du gène codant pour l'histone H1c dans les cellules de bâtonnets normales cultivées en explant. Les conséquences morphologiques de la perte de fonction de cette protéine seront étudiées par microscopie électronique. L'étude de ces noyaux par des méthodes stéréologiques nous permettra de déterminer si le volume nucléaire est ou non augmenté et si la chromatine est ou non décondensée. De plus, il sera très intéressant d'étudier le transcriptome de ces noyaux afin de déterminer les gènes spécifiquement dérégulés par la perte de fonction de l'histone H1c. Enfin, des expériences de surexpression de l'histone H1c seront réalisées dans les cultures en explant de bâtonnets issues des rétines SCA7 afin d'étudier une éventuelle re-condensation de la chromatine dans ces noyaux. L'ensemble de ces expériences est indispensable pour nous permettre de conclure que la perte de fonction de l'histone H1c est bien la cause du phénotype nucléaire observé dans les bâtonnets de rétines SCA7.

IV. Du noyau aux molécules :

L'ensemble des résultats obtenus au cours de mon doctorat constitue un pré-requis indispensable pour étudier *in cellulo* les complexes majeurs de régulation de l'expression des gènes. Notre objectif ultime étant de visualiser les macromolécules en fonction de leur contraste intrinsèque, de les identifier par leur taille et leur structure 3-D et de les étudier dans le contexte nucléaire le plus proche possible de l'environnement cellulaire natif. Pour ce faire, les complexes macromoléculaires doivent être observés à une résolution

suffisamment élevée. La technique de cryo-microscopie électronique d'observation de sections de rétines vitreuses (CEMOVIS) nous offre la possibilité de travailler dans ces conditions (Al-Amoudi et al., 2004a; Bouchet-Marquis and Fakan, 2009).

1) CEMOVIS des rétines de souris :

Pour la technique de CEMOVIS (Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections), les échantillons biologiques sont cryo-fixés sous haute pression, les échantillons ainsi vitrifiés sont coupés à l'aide d'un cryo-ultramicrotome (à -140°C) et les cryo-sections ultrafines (50nm) sont observées dans un cryo-microscope électronique en mode « low dose » (faible dose). Dans ces conditions, les macromolécules peuvent être étudiées dans leur état natif, hydratées sans fixateur chimique ou contrastant (Dubochet et al., 1988).

L'obtention de cryo-sections de bonne qualité peut constituer un véritable défi lorsqu'il s'agit de tissu. Les difficultés majeures sont les contaminations par la glace microcristalline de l'air ambiant et la fixation du ruban sectionné sur la grille de microscopie électronique. Pour réduire les contaminations et le niveau d'hygrométrie nous utilisons une cryo-boite (cryosphère ; Leica) qui entoure le cryo-ultramicrotome. Dans ces conditions, les cryo-sections sont préparées dans une atmosphère azotée qui réduit à 20 % le degré d'humidité. La chambre du cryo-ultramicrotome étant isolée de l'air humide est également dépourvue de cristaux de glace. Une fois le ruban de cryo-sections obtenu, il doit être fixé sur la grille de microscopie électronique. Pour ce faire, une décharge électrostatique est appliquée sur le ruban et les cryo-sections viennent se plaquer sur le film de la grille. Le « static line II » permettant d'appliquer une décharge électrostatique sur les cryo-sections ainsi que la « cryosphère », sont deux techniques qui ont été développées par Leica. De notre côté, nous avons choisi d'utiliser le porte objet de coupes de l'AFM (Atomic Force Microscope) que nous avons transformé pour y loger la coupelle de congélation après cryo-fixation sous haute pression de l'échantillon (**figure 44**).

L'ensemble de ces optimisations pour la cryo-section d'échantillons biologiques vitrifiés nous a considérablement aidés pour obtenir nos premières cryo-sections de rétines (**figure 45**). Les premières images de noyaux de tissu complexe, la rétine en CEMOVIS sont très encourageantes car pour l'heure, cette technique est surtout utilisée pour étudier les cellules isolées en culture et seuls les travaux réalisés par Al-Amoudi ont permis d'étudier un

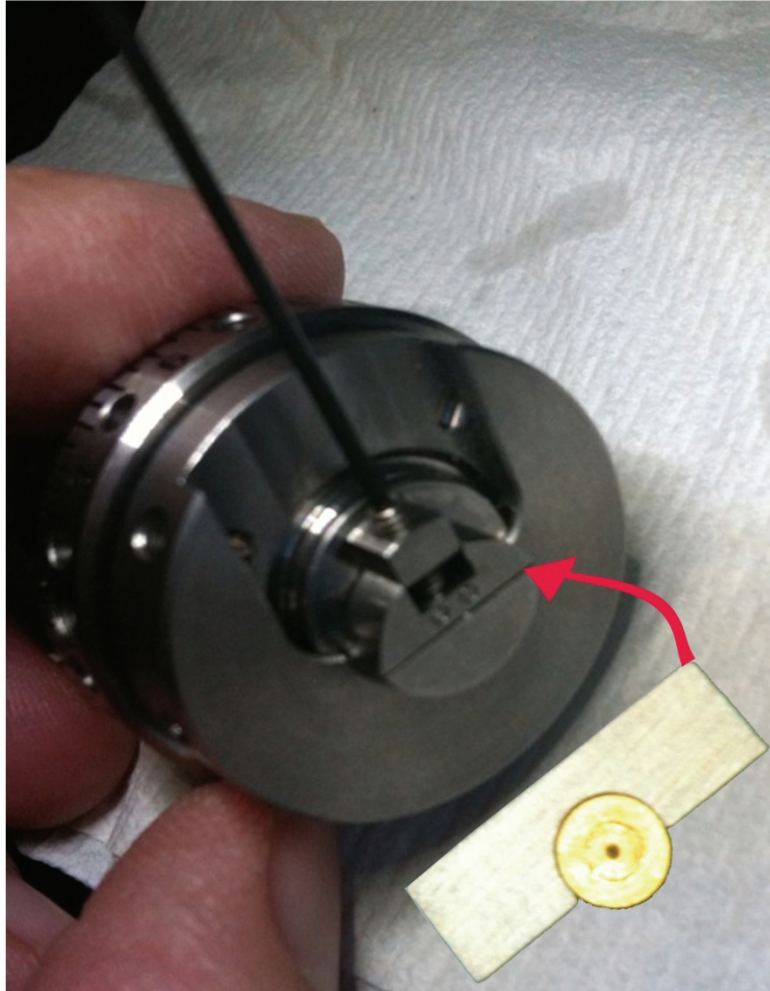


Figure 44 : Optimisation du porte objet AFM pour le CEMOVIS.

Après cryo-fixation de l'échantillon, la coupelle de congélation en cuivre est stabilisée sur une planchette, spécialement usinée pour s'adapter parfaitement aux dimensions de la coupelle. Elle est ensuite introduite dans la fente du porte objet AFM (flèche rouge).

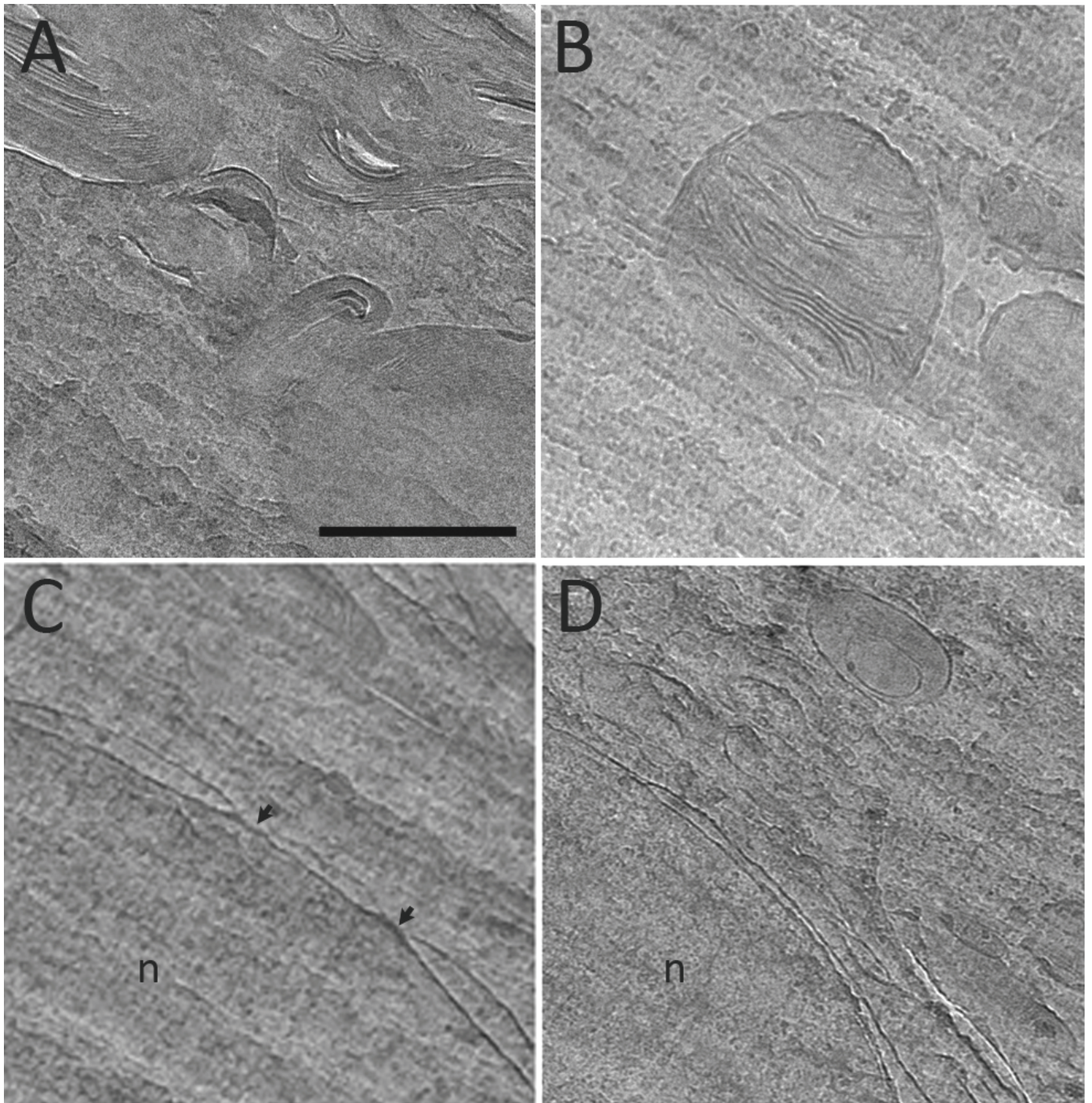


Figure 45 : Résultats préliminaires de CEMOVIS de rétine de souris normale.

Les rétines cryo-fixées par congélation haute pression sont coupées à -140°C dans le cryo-ultramicrotome. Le ruban de cryo-sections ultrafines (30-50 nm) est récupéré sur une grille recouverte de Formvar et de Carbone avant d'être observé dans un cryo-microscope électronique. (A) Coupe transverse de segments externes de photorécepteurs. (B) Mitochondrie dans les segments internes des photorécepteurs. (C) Noyau de bâtonnet (n) avec les pores de l'enveloppe nucléaire (flèches). (D) Noyaux de bâtonnets (n) entourés de l'enveloppe nucléaire. La barre d'échelle représente 500nm.

tissu simple : l'épiderme (Al-Amoudi et al., 2007; Al-Amoudi et al., 2004b).

Cependant, la superposition du matériel biologique dans l'épaisseur des cryo-sections de rétines constitue un obstacle pour l'identification des complexes macromoléculaires.

Cet obstacle peut être franchi si on combine le CEMOVIS à la cryo-tomographie électronique (TOVIS).

2) En route vers le TOVIS (Tomography of vitreous sections) :

La cryo-tomographie de sections vitreuses de rétine est un des rêves que nous souhaitons réaliser au laboratoire. En effet, le TOVIS est la seule technique qui puisse faire le lien entre l'étude des molécules isolées et la biologie cellulaire. Cette approche permet de visualiser les complexes moléculaires dans leur « habitat naturel » : la cellule (Leis et al., 2009).

Cette technique nous permettra par exemple de visualiser l'ARN polymérase II en cours de transcription directement dans le noyau. Les molécules seront identifiées en fonction de leur forme, de leur taille et de leur position dans le noyau. En association avec des outils informatiques puissants de traitements d'images, l'interprétation des tomogrammes pourra conduire à la création d'un atlas moléculaire décrivant le paysage moléculaire pour chaque territoire nucléaire.

ANNEXE

ANNEXE

Tableau 6 : Liste des gènes dérégulés dans les rétines de souris SCA7.

Comparaison du profil d'expression des gènes dans les rétines SCA7 versus rétines normales.

Les gènes dérégulés sont sélectionnés par GCRMA (FC : Fold Change ; FDR : False Discovery Rate)

FC = log (niveau d'expression du gène dans les rétines SCA7 / niveau d'expression du gène dans les rétines WT).

affyID	Gene Symbol	Gene Title	FC	FDR
1450779_at	Fabp7	fatty acid binding protein 7, brain	-56,52	3,75E-10
1423736_a_at	Dym	Dymeclin	3,65	3,78E-08
1454770_at	Cckbr	cholecystokinin B receptor	-4,26	4,03E-06
1425264_s_at	Mbp	myelin basic protein	-2,56	4,03E-06
1427282_a_at	Fxn	frataxin	-2,12	5,19E-06
1420401_a_at	Ramp3	cDNA sequence AB182283 /// similar to receptor activity modifying protein 3	2,15	1,44E-05
1437141_x_at	Dym	dymeclin	2,13	1,44E-05
1417953_at	Fam3c	family with sequence similarity 3, member C	2,23	7,74E-06
1448183_a_at	Hif1a	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	1,73	7,74E-06
1423239_at	Impdh1	inosine 5'-phosphate dehydrogenase 1	1,82	1,44E-05
1451311_a_at	Adipor1	adiponectin receptor 1	1,82	1,44E-05
1422090_a_at	Pfkfb2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	2,65	1,44E-05
1423783_at	Tor2a	torsin family 2, member A	-1,97	7,74E-06
1452913_at	Pcp4l1	Purkinje cell protein 4-like 1	1,86	2,52E-05
1421361_at	Grk1	G protein-coupled receptor kinase 1 /// similar to rhodopsin kinase	3,08	1,44E-05
1422092_at	Pfkfb2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	4,28	1,44E-05
1427003_at	Ppp2r5c	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma isoform	1,94	2,52E-05
1456088_at	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	2,31	2,52E-05
1425637_at	---	---	2,83	2,52E-05
1418250_at	Arl4d	ADP-ribosylation factor-like 4D /// hypothetical protein LOC100044157	1,94	1,44E-05
1451297_at	Gulo	gulonolactone (L-) oxidase	-3,46	1,44E-05
1424777_at	Wdr21	WD repeat domain 21	-2,3	5,19E-06
1421085_at	Rs1	retinoschisis (X-linked, juvenile) 1 (human)	3,41	2,52E-05
1419069_at	Rabgef1	RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	3,34	4,00E-05
1425784_a_at	Olfm1	olfactomedin 1	-1,95	2,52E-05
1425891_a_at	Grtp1	GH regulated TBC protein 1	2,11	2,52E-05
1460366_at	Eml3	echinoderm microtubule associated protein like 3	1,77	2,52E-05
1451210_at	Ppap2c	phosphatidic acid phosphatase type 2c	2,65	5,45E-05
1451636_at	Ankrd33	ankyrin repeat domain 33	1,71	4,00E-05
1452480_at	4930529M08Rik	RIKEN cDNA 4930529M08 gene	-1,84	4,00E-05
1429800_at	9130221H12Rik	RIKEN cDNA 9130221H12 gene /// zinc finger protein 526	1,06	NA
1423862_at	Plekhhf2	pleckstrin homology domain containing, family F	3,49	5,45E-05
1431010_a_at	Rdh12	retinol dehydrogenase 12	2,49	5,45E-05
1419366_at	Zmat5	zinc finger, matrin type 5	-1,97	5,45E-05

Annexe

1419068_at	Rabgef1	RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	2,63	8,34E-05
1422563_at	Cr1l	complement component (3b/4b) receptor 1-like	-2,46	5,45E-05
1416444_at	Elovl2	elongation of very long chain fatty acids	-2,44	8,34E-05
1422986_at	Esrrb	estrogen related receptor, beta	3,16	8,34E-05
1416203_at	Aqp1	aquaporin 1	3,21	8,34E-05
1424312_at	Adipor1	adiponectin receptor 1	2,42	8,34E-05
1424964_at	Rp1h	retinitis pigmentosa 1 homolog (human)	2,09	8,34E-05
1434500_at	Ttyh2	tweety homolog 2 (Drosophila)	-2,77	5,45E-05
1451763_at	Cnga1	cyclic nucleotide gated channel alpha 1	1,84	5,45E-05
1435321_at	Limch1	LIM and calponin homology domains 1	-1,73	0,000160704
1426782_at	Gpr125	G protein-coupled receptor 125	-1,92	8,34E-05
1435376_at	Ddhd2	DDHD domain containing 2	-2,11	8,34E-05
1424895_at	Gpsm2	G-protein signalling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans)	2,04	0,000160704
1450162_at	Dpf3	D4, zinc and double PHD fingers, family 3	3,12	0,000160704
1448894_at	Akr1b8	aldo-keto reductase family 1, member B8	-3,69	4,03E-06
1417884_at	Slc16a6	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)	2,44	0,000160704
1421394_a_at	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	3,24	0,000160704
1425696_at	Nxn1	similar to Thioredoxin-like 6 /// nucleoredoxin-like 1	2,81	0,000160704
1450504_a_at	Agpat3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	1,94	0,000160704
1452490_a_at	Ap2a2	adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	1,83	0,000160704
1449490_at	Mbd4	methyl-CpG binding domain protein 4	-2,15	1,89E-07
1423165_a_at	Mta2	metastasis-associated gene family, member 2	2,17	4,71E-05
1426223_at	Ttc39c	tetratricopeptide repeat domain 39C	1,87	5,45E-05
1419694_at	St8sia1	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	3,03	2,52E-05
1422731_at	Limd1	LIM domains containing 1	-1,93	0,000309378
1421119_at	Kif21b	kinesin family member 21B	2,21	0,000160704
1422091_at	Pfkfb2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	2,86	5,09E-05
1451617_at	Rho	rhodopsin	1,86	8,34E-05
1432418_a_at	Ckmt1	creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous	2,19	5,45E-05
1455915_at	Galnt4	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine	1,81	5,45E-05
1417089_a_at	Ckmt1	creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous	1,9	0,000309378
1418345_at	Tnfsf12	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	1,93	0,000309378
1425171_at	Rho	rhodopsin	2	8,34E-05
1428197_at	Tspan9	tetraspanin 9	-1,75	8,34E-05
1437667_a_at	Bach2	BTB and CNC homology 2	-2,27	0,000275592
1415802_at	Slc16a1	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)	1,82	0,000275592
1421084_at	Rs1	retinoschisis (X-linked, juvenile) 1 (human)	2,23	0,000275592
1425408_a_at	2610034M16Rik	RIKEN cDNA 2610034M16 gene	2,33	0,000275592
1430128_a_at	Reep6	receptor accessory protein 6	2,52	0,000160704
1450863_a_at	Dclk1	doublecortin-like kinase 1	2,14	0,000160704
1455098_a_at	Vtn	vitronectin	1,9	0,000275592
1430989_a_at	1700020I14Rik	RIKEN cDNA 1700020I14 gene	2,29	1,44E-05
1417719_at	Sap30	sin3 associated polypeptide	1,87	0,000309378

1449522_at	Unc5c	unc-5 homolog C (C. elegans)	-1,8	0,000315317
1419067_a_at	Rabgef1	RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	2,67	0,000160704
1428071_at	1110038D17Rik	RIKEN cDNA 1110038D17 gene	1,88	0,000160704
1428306_at	Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	2,21	0,000160704
1455482_at	Ap2a2	adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	1,78	0,000160704
1439017_x_at	Adipor1	adiponectin receptor 1	1,76	2,52E-05
1431107_at	Stk35	serine/threonine kinase 35	2,74	5,45E-05
1421385_a_at	Myo7a	myosin VIIa	-1,9	0,000275592
1425288_at	Samd11	sterile alpha motif domain containing 11	2,64	0,000275592
1417432_a_at	Gnb1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 1	2,5	0,000275592
1424256_at	Rdh12	retinol dehydrogenase 12	2,11	0,000275592
1424646_at	Uck1	uridine-cytidine kinase 1-like 1	1,9	0,000275592
1417396_at	Podxl	podocalyxin-like	1,98	0,000275592
1423980_at	Slc25a29	solute carrier family 25	1,76	0,000275592
1420484_a_at	Vtn	vitronectin	1,81	0,000309378
1418092_s_at	Trip10	thyroid hormone receptor interactor 10	1,81	0,000309378
1455152_at	Al462493	expressed sequence Al462493	1,71	0,000315317
1426754_x_at	Ckap4	cytoskeleton-associated protein 4	-1,79	0,000275592
1435106_at	Limch1	LIM and calponin homology domains 1	-1,78	0,000309378
1439255_s_at	Gpr137b	G protein-coupled receptor 137B	-1,9	0,000649263
1422159_at	Ppef2	protein phosphatase, EF hand calcium-binding domain 2	1,91	0,000315317
1424395_at	Asrgl1	asparaginase like 1	1,79	8,34E-05
1417430_at	Cdr2	cerebellar degeneration-related 2	2,12	0,000585717
1453063_at	Cltb	clathrin, light polypeptide (Lcb)	-1,99	0,000585717
1416101_a_at	Hist1h1c	histone cluster 1, H1c	1,91	0,000444942
1452243_at	Kcnj14	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 14	2,18	0,000444942
1420518_a_at	Igsf9	immunoglobulin superfamily, member 9	1,94	0,000649263
1421124_at	Cdk5r1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	1,31	0,000444942
1450770_at	3632451O06Rik	RIKEN cDNA 3632451O06 gene	1,89	0,000447995
1416825_at	Snta1	syntrophin, acidic 1	1,86	0,000649263
1423861_at	Plekhf2	pleckstrin homology domain containing	1,57	0,000649263
1423179_at	Kcnb1	potassium voltage gated channel, Shab-related subfamily	1,94	0,00074699
1450231_a_at	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	4,35	0,000585717
1426035_at	RP23-433P19.11	serine incorporator 4	2,49	0,000649263
1417911_at	Ccna2	cyclin A2	3,33	0,000649263
1422193_at	Gucy2e	guanylate cyclase 2e	2,97	0,000649263
1424650_at	Pdia5	protein disulfide isomerase associated 5	2,46	0,000649263
1436926_at	Esrrb	estrogen related receptor, beta	2,08	0,000649263
1417886_at	1810009A15Rik	RIKEN cDNA 1810009A15 gene	1,97	0,000444942
1425878_at	Cabp4	calcium binding protein 4	2,35	0,000315317
1421793_at	Fgf11	fibroblast growth factor 11	1,72	0,000649263
1450660_at	Pts	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase	-1,72	0,000649263
1453321_at	Fndc1	fibronectin type III domain containing 1	2,28	0,000649263

Annexe

1422640_at	Pcdhb9	protocadherin beta 9	-1,92	0,001286435
1417309_at	Tob2	transducer of ERBB2, 2	1,74	0,000160704
1419835_s_at	Plec1	plectin 1	-1,84	0,000649263
1429711_at	Styx	predicted gene, OTTMUSG00000017743 /// serine/threonine	1,84	0,000649263
1437626_at	Zfp3612	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	1,9	0,000649263
1453016_at	Hspb11	heat shock protein family B (small), member 11	-1,77	0,000585717
1419647_a_at	Ier3	immediate early response 3	2,1	0,000649263
1425138_at	Guca1b	guanylate cyclase activator 1B	2	0,000649263
1449005_at	Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)	2,12	0,000649263
1450500_at	LOC677213	similar to U2AF homology motif (UHM) kinase 1	2,13	0,000649263
1456310_a_at	2610002J02Rik	RIKEN cDNA 2610002J02 gene	-2,38	0,001334648
1452656_at	Zdhhc2	zinc finger, DHHC domain containing 2	-1,81	0,001286435
1448996_at	Rom1	rod outer segment membrane protein 1	1,86	0,000315317
1418789_at	Sntg2	syntrophin, gamma 2	1,89	0,001334648
1419695_at	St8sia1	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	2,17	0,001286435
1436382_at	Zbtb12	zinc finger and BTB domain containing 12	-1,86	0,001286435
1449519_at	Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	2,37	0,001286435
1415860_at	ENSMUSG00000066878	predicted gene/// karyopherin (importin) alpha 2	2,43	0,000315317
1419879_s_at	Trim25	tripartite motif-containing 25	-1,91	0,000444942
1425168_at	Gngt1	guanine nucleotide binding protein (G protein),	1,95	0,000444942
1426562_a_at	Olfm1	olfactomedin 1	-2,09	0,000275592
1436994_a_at	Hist1h1c	histone cluster 1, H1c	1,87	0,000275592
1437533_at	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	1,74	0,000160704
1426287_at	Atxn7	ataxin 7	-1,11	NA
1419740_at	Pde6b	phosphodiesterase 6B, cGMP, rod receptor, beta polypeptide	1,77	0,001334648
1425441_at	---	---	2,6	0,001334648
1449578_at	Supt16h	suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)	4,19	0,000585717
1451062_a_at	Pex5l	peroxisomal biogenesis factor 5-like	1,78	0,000649263
1450816_at	Polg2	polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit	2,23	0,002306067
1420727_a_at	Tmlhe	trimethyllysine hydroxylase, epsilon	2,05	0,001245426
1421028_a_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	2,55	0,001571874
1425197_at	Ptpn2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	-1,72	0,001334648
1455182_at	Kif1b	kinesin family member 1B	2,23	0,001286435
1420543_at	Dnajc28	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 28	1,94	0,001286435
1423631_at	Nr2e3	nuclear receptor subfamily 2, group E, member 3	1,78	0,001286435
1424900_at	LOC100048058 /// Slc29a4	similar to Solute carrier family 29 (nucleoside transporters),	2,24	0,002306067
1451762_a_at	Kif1b	kinesin family member 1B	1,82	0,001286435
1422136_at	LOC677213 /// Uhmk1	similar to U2AF homology motif (UHM) kinase 1	2,43	0,001571874
1424118_a_at	Spc25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component	1,82	0,001245426
1438547_x_at	Tor2a	torsin family 2, member A	-1,69	0,001245426
1451158_at	Trip12	thyroid hormone receptor interactor 12	1,75	0,000275592
1453768_a_at	Fam110a	family with sequence similarity 110, member A	1,71	0,001286435
1417280_at	Slc17a1	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 1	2,09	0,002306067

1453287_at	Ankrd33b	ankyrin repeat domain 33B	2,37	0,002228819
1434507_at	Npepl1	aminopeptidase-like 1	-1,93	0,000649263
1421027_a_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	2,71	0,003020927
1420542_at	Dnajc28	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 28	2	0,003020927
1423475_at	Cnnm2	cyclin M2	-1,95	0,000649263
1417910_at	Ccna2	cyclin A2	3,4	0,002538634
1450946_at	Nrl	neural retina leucine zipper gene	1,74	0,001286435
1455796_x_at	Olfm1	olfactomedin 1	-1,82	0,001286435
1448594_at	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	2,66	0,002501642
1429775_a_at	Gpr137b /// Gpr137b-ps	G protein-coupled receptor 137B	-1,88	0,002228819
1424977_at	Lrrc67	leucine rich repeat containing 67	1,87	0,001334648
1448602_at	Pygm	muscle glycogen phosphorylase	-2,52	0,002501642
1422785_at	Rasa2	RAS p21 protein activator 2	-1,74	0,003020927
1451506_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	2,02	0,003020927
1431981_at	Hif1a	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	1,78	0,002538634
1455908_a_at	Scpep1	serine carboxypeptidase 1	-1,9	0,001892294
1415977_at	Isyna1	myo-inositol 1-phosphate synthase A1	1,77	0,003020927
1417310_at	Tob2	transducer of ERBB2, 2	2,1	8,34E-05
1418396_at	Gpsm3	G-protein signalling modulator 3 (AGS3-like, C. elegans)	2,78	0,002501642
1452181_at	Ckap4	cytoskeleton-associated protein 4	-1,86	0,000315317
1422155_at	Hist2h3c2	histone cluster 2, H3c2	2,1	0,001286435
1451507_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	3,15	0,004589193
1425919_at	Ndufa12	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12	3,34	0,003020927
1418964_at	Pigm	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class M	1,78	0,000649263
1426511_at	Susd2	sushi domain containing 2	-1,83	0,000649263
1450415_at	Pde6a	phosphodiesterase 6A, cGMP-specific, rod, alpha	1,76	0,00074699
1438009_at	Hist1h2ab /// Hist1h2ac	histone cluster 1, H2ab	-2,07	0,00489165
1460663_at	Cckbr	cholecystokinin B receptor	-2,69	0,006476983
1418029_at	Faim	Fas apoptotic inhibitory molecule	1,72	0,004589193
1418946_at	St3gal1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	1,81	0,001015841
1423865_at	Slc44a1	solute carrier family 44, member 1	-1,33	NA
1438841_s_at	Arg2	arginase type II	2,08	0,00489165
1452534_a_at	Hmgb2	high mobility group box 2	2,19	0,005583331
1460314_s_at	Hist1h3a /// Hist1h3b	histone cluster 1, H3a	2,18	0,002501642
1424852_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	2,47	0,004717974
1448593_at	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	2,37	0,004717974
1425123_at	Klhl36	kelch-like 36 (Drosophila)	1,71	0,004717974
1417859_at	Gas7	growth arrest specific 7	3,05	0,002501642
1449159_at	Gnb3	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 3	-1,71	0,002501642
1450804_at	Kif5c	kinesin family member 5C	1,91	0,000160704
1460605_at	Crxos1	Crx opposite strand transcript 1	1,99	0,007543263
1426989_at	Clstn3	calsyntenin 3	-2,16	0,007543263
1424644_at	Tbcc	tubulin-specific chaperone c	1,78	0,001334648

Annexe

1430283_s_at	Lrrc67	leucine rich repeat containing 67	1,95	0,000649263
1418086_at	Ppp1r14a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	-4,37	0,009245098
1420725_at	Tmlhe	trimethyllysine hydroxylase, epsilon	1,86	0,009245098
1418847_at	Arg2	arginase type II	2,1	0,006476983
1420655_at	Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3	1,75	0,001245426
1418152_at	Nsbp1	nucleosome binding protein 1	-2,04	0,001334648
1423637_at	Galnt4	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine	1,78	7,74E-06
1426636_a_at	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	3,84	0,000649263
1420726_x_at	Tmlhe	trimethyllysine hydroxylase, epsilon	1,72	0,014636541
1456590_x_at	Akr1b3	aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)	-2,55	0,000275592
1421145_at	Slc26a2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	2,01	0,000315317
1439150_x_at	Grtp1	GH regulated TBC protein 1	1,38	0,015188217
1434003_a_at	Dhps	deoxyhypusine synthase	1,94	0,019865428
1448664_a_at	Speg	SPEG complex locus	-2,01	0,019865428
1438187_at	Slc25a29	solute carrier family 25	1,88	0,001334648
1423125_at	Dclk1	doublecortin-like kinase 1	1,86	0,000275592
1419592_at	Unc5c	unc-5 homolog C (C. elegans)	-2,77	0,002501642
1427734_a_at	Dscaml1	Down syndrome cell adhesion molecule-like 1	1,83	0,001245426

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A:

- Abou-Sleymane, G., F. Chalmel, D. Helmlinger, A. Lardenois, C. Thibault, C. Weber, K. Merienne, J.L. Mandel, O. Poch, D. Devys, and Y. Trottier.** 2006. Polyglutamine expansion causes neurodegeneration by altering the neuronal differentiation program. *Hum Mol Genet.* 15:691-703.
- Agalioti, T., G. Chen, and D. Thanos.** 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell.* 111:381-92.
- Akhtar, A., and S.M. Gasser.** 2007. The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet.* 8:507-17.
- Al-Amoudi, A., J.J. Chang, A. Leforestier, A. McDowall, L.M. Salamin, L.P. Norlen, K. Richter, N.S. Blanc, D. Studer, and J. Dubochet.** 2004a. Cryo-electron microscopy of vitreous sections. *Embo J.* 23:3583-8.
- Al-Amoudi, A., D.C. Diez, M.J. Betts, and A.S. Frangakis.** 2007. The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature.* 450:832-7.
- Al-Amoudi, A., L.P. Norlen, and J. Dubochet.** 2004b. Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues. *J Struct Biol.* 148:131-5.
- Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky.** 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 51:786-94.
- Allfrey, V.G., and A.E. Mirsky.** 1964. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science.* 144:559.
- Atanassov, B.S., Y.A. Evrard, A.S. Multani, Z. Zhang, L. Tora, D. Devys, S. Chang, and S.Y. Dent.** 2009. Gcn5 and SAGA regulate shelterin protein turnover and telomere maintenance. *Mol Cell.* 35:352-64.

B:

- Baker, S.P., and P.A. Grant.** 2007. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene.* 26:5329-40.
- Bao, Z.Z., and C.L. Cepko.** 1997. The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye. *J Neurosci.* 17:1425-34.

- Barbaric, S., J. Walker, A. Schmid, J.Q. Svejstrup, and W. Horz.** 2001. Increasing the rate of chromatin remodeling and gene activation--a novel role for the histone acetyltransferase Gcn5. *Embo J.* 20:4944-51.
- Bassett, A., S. Cooper, C. Wu, and A. Travers.** 2009. The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 19:159-65.
- Bauer, P.O., and N. Nukina.** 2009. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem.* 110:1737-65.
- Baumeister, W., R. Grimm, and J. Walz.** 1999. Electron tomography of molecules and cells. *Trends Cell Biol.* 9:81-5.
- Bellard, M., F. Gannon, and P. Chambon.** 1978. Nucleosome structure III: the structure and transcriptional activity of the chromatin containing the ovalbumin and globin genes in chick oviduct nuclei. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 42 Pt 2:779-91.
- Belliveau, M.J., and C.L. Cepko.** 1999. Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development.* 126:555-66.
- Belmont, A.S.** 2006. Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr Opin Cell Biol.* 18:632-8.
- Benn, C.L., C. Landles, H. Li, A.D. Strand, B. Woodman, K. Sathasivam, S.H. Li, S. Ghazi-Noori, E. Hockly, S.M. Faruque, J.H. Cha, P.T. Sharpe, J.M. Olson, X.J. Li, and G.P. Bates.** 2005. Contribution of nuclear and extranuclear polyQ to neurological phenotypes in mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 14:3065-78.
- Benton, C.S., R. de Silva, S.L. Rutledge, S. Bohlega, T. Ashizawa, and H.Y. Zoghbi.** 1998. Molecular and clinical studies in SCA-7 define a broad clinical spectrum and the infantile phenotype. *Neurology.* 51:1081-6.
- Berger, S.L.** 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature.* 447:407-12.
- Berndsen, C.E., and J.M. Denu.** 2008. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr Opin Struct Biol.* 18:682-9.
- Bernhard, W.** 1968. [A method of regressive colaration with use of the electron microscope]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 267:2170-3.
- Bernstein, B.E., M. Kamal, K. Lindblad-Toh, S. Bekiranov, D.K. Bailey, D.J. Huebert, S. McMahan, E.K. Karlsson, E.J. Kulbokas, 3rd, T.R. Gingeras, S.L. Schreiber, and E.S. Lander.** 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell.* 120:169-81.

- Bernstein, B.E., T.S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S.L. Schreiber, and E.S. Lander.** 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 125:315-26.
- Blackshaw, S., R.E. Fraioli, T. Furukawa, and C.L. Cepko.** 2001. Comprehensive analysis of photoreceptor gene expression and the identification of candidate retinal disease genes. *Cell*. 107:579-89.
- Blackwell, J.S., Jr., S.T. Wilkinson, N. Mosammamaparast, and L.F. Pemberton.** 2007. Mutational analysis of H3 and H4 N termini reveals distinct roles in nuclear import. *J Biol Chem*. 282:20142-50.
- Bouchet-Marquis, C., J. Dubochet, and S. Fakan.** 2006. Cryoelectron microscopy of vitrified sections: a new challenge for the analysis of functional nuclear architecture. *Histochem Cell Biol*. 125:43-51.
- Bouchet-Marquis, C., and S. Fakan.** 2009. Cryoelectron microscopy of vitreous sections: a step further towards the native state. *Methods Mol Biol*. 464:425-39.
- Brand, M., C. Leurent, V. Mallouh, L. Tora, and P. Schultz.** 1999. Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC. *Science*. 286:2151-3.
- Brookes, E., and A. Pombo.** 2009. Modifications of RNA polymerase II are pivotal in regulating gene expression states. *EMBO Rep*. 10:1213-9.
- Brownell, J.E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D.G. Edmondson, S.Y. Roth, and C.D. Allis.** 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 84:843-51.
- Bu, P., Y.A. Evrard, G. Lozano, and S.Y. Dent.** 2007. Loss of Gcn5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos. *Mol Cell Biol*. 27:3405-16.
- Buratowski, S.** 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell*. 77:1-3.
- buser, P., and M. Imbert. 1987. Neurophysiologie - Fonctionnelle.

C:

- Cabal, G.G., A. Genovesio, S. Rodriguez-Navarro, C. Zimmer, O. Gadal, A. Lesne, H. Buc, F. Feuerbach-Fournier, J.C. Olivo-Marin, E.C. Hurt, and U. Nehrbass.** 2006. SAGA interacting factors confine sub-diffusion of transcribed genes to the nuclear envelope. *Nature*. 441:770-3.
- Candau, R., and S.L. Berger.** 1996. Structural and functional analysis of yeast putative adaptors. Evidence for an adaptor complex in vivo. *J Biol Chem*. 271:5237-45.

- Carter-Dawson, L.D., and M.M. LaVail.** 1979. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol.* 188:245-62.
- Cepko, C.L., C.P. Austin, X. Yang, M. Alexiades, and D. Ezzeddine.** 1996. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:589-95.
- Cha, J.H.** 2007. Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 83:228-48.
- Chau, K.Y., N. Munshi, A. Keane-Myers, K.W. Cheung-Chau, A.K. Tai, G. Manfioletti, C.K. Dorey, D. Thanos, D.J. Zack, and S.J. Ono.** 2000. The architectural transcription factor high mobility group I(Y) participates in photoreceptor-specific gene expression. *J Neurosci.* 20:7317-24.
- Chen, C.K.** 2005. The vertebrate phototransduction cascade: amplification and termination mechanisms. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 154:101-21.
- Cheng, L., and W.W. Hung.** 2003. DNA-Chip Analyser.
- Cook, P.R.** 1995. A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. *J Cell Sci.* 108 (Pt 9):2927-35.
- Costa Lima, M.A., and M.M. Pimentel.** 2004. Dynamic mutation and human disorders: the spinocerebellar ataxias (review). *Int J Mol Med.* 13:299-302.
- Couture, J.F., and R.C. Trievel.** 2006. Histone-modifying enzymes: encrypting an enigmatic epigenetic code. *Curr Opin Struct Biol.* 16:753-60.
- Cramer, P., D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg.** 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science.* 292:1863-76.

D:

- Daniel, J.A., M.S. Torok, Z.W. Sun, D. Schieltz, C.D. Allis, J.R. Yates, 3rd, and P.A. Grant.** 2004. Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J Biol Chem.* 279:1867-71.
- Davey, C.A., D.F. Sargent, K. Luger, A.W. Maeder, and T.J. Richmond.** 2002. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *J Mol Biol.* 319:1097-113.
- David, G., N. Abbas, G. Stevanin, A. Durr, G. Yvert, G. Cancel, C. Weber, G. Imbert, F. Saudou, E. Antoniou, H. Drabkin, R. Gemmill, P. Giunti, A. Benomar, N. Wood, M. Ruberg, Y. Agid, J.L. Mandel, and A. Brice.** 1997. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet.* 17:65-70.

de la Cruz, X., S. Lois, S. Sanchez-Molina, and M.A. Martinez-Balbas. 2005. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays*. 27:164-75.

Dubochet, J., M. Adrian, J.J. Chang, J.C. Homo, J. Lepault, A.W. McDowell, and P. Schultz. 1988. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*. 21:129-228.

Dyer, M.A., and C.L. Cepko. 2001. Regulating proliferation during retinal development. *Nat Rev Neurosci*. 2:333-42.

E:

Eltsov, M., K.M. Maclellan, K. Maeshima, A.S. Frangakis, and J. Dubochet. 2008. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:19732-7.

Ezzeddine, Z.D., X. Yang, T. DeChiara, G. Yancopoulos, and C.L. Cepko. 1997. Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. *Development*. 124:1055-67.

F:

Fan, Y., T. Nikitina, E.M. Morin-Kensicki, J. Zhao, T.R. Magnuson, C.L. Woodcock, and A.I. Skoultchi. 2003. H1 linker histones are essential for mouse development and affect nucleosome spacing in vivo. *Mol Cell Biol*. 23:4559-72.

Fang, J., T. Chen, B. Chadwick, E. Li, and Y. Zhang. 2004. Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem*. 279:52812-5.

Felsenfeld, G., J. Boyes, J. Chung, D. Clark, and V. Studitsky. 1996. Chromatin structure and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:9384-8.

Felsenfeld, G., and M. Groudine. 2003. Controlling the double helix. *Nature*. 421:448-53.

Fernandez-Moran, H. 1960. Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II. *Ann N Y Acad Sci*. 85:689-713.

Filetici, P., C. Aranda, A. Gonzalez, and P. Ballario. 1998. GCN5, a yeast transcriptional coactivator, induces chromatin reconfiguration of HIS3 promoter in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 242:84-7.

Finch, J.T., and A. Klug. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:1897-901.

Furukawa, T., E.M. Morrow, and C.L. Cepko. 1997. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell*. 91:531-41.

G:

Garcia, B.A., J. Shabanowitz, and D.F. Hunt. 2007. Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 11:66-73.

Geerts, W., B. Humbel, and A. Verkleij. 2008. 3-D electron tomography of cells and organelles.

Geng, F., and B.C. Laurent. 2004. Roles of SWI/SNF and HATs throughout the dynamic transcription of a yeast glucose-repressible gene. *Embo J*. 23:127-37.

Gilbert, N., S. Boyle, H. Fiegler, K. Woodfine, N.P. Carter, and W.A. Bickmore. 2004. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell*. 118:555-66.

Gnatt, A.L., P. Cramer, J. Fu, D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg. 2001. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*. 292:1876-82.

Godde, J.S., and K. Ura. 2009. Dynamic alterations of linker histone variants during development. *Int J Dev Biol*. 53:215-24.

Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein. 2007. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 128:635-8.

Govind, C.K., S. Yoon, H. Qiu, S. Govind, and A.G. Hinnebusch. 2005. Simultaneous recruitment of coactivators by Gcn4p stimulates multiple steps of transcription in vivo. *Mol Cell Biol*. 25:5626-38.

Govind, C.K., F. Zhang, H. Qiu, K. Hofmeyer, and A.G. Hinnebusch. 2007. Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Mol Cell*. 25:31-42.

Graham, D.R., P.A. Overbeek, and J.D. Ash. 2005. Leukemia inhibitory factor blocks expression of Crx and Nrl transcription factors to inhibit photoreceptor differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46:2601-10.

Grant, P.A., L. Duggan, J. Cote, S.M. Roberts, J.E. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C.D. Allis, F. Winston, S.L. Berger, and J.L. Workman. 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones:

characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* 11:1640-50.

Grant, P.A., D. Schieltz, M.G. Pray-Grant, D.J. Steger, J.C. Reese, J.R. Yates, 3rd, and J.L. Workman. 1998. A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell.* 94:45-53.

Grewal, S.I., and S. Jia. 2007. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet.* 8:35-46.

Griffiths, G. 1993. Quantitative aspects of immunocytochemistry. In *Fine structure immunocytochemistry*. G. Griffiths, editor. Springer-Verlag. 371-445.

Grigoryev, S.A., G. Arya, S. Correll, C.L. Woodcock, and T. Schlick. 2009. Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:13317-22.

Guelman, S., T. Suganuma, L. Florens, V. Weake, S.K. Swanson, M.P. Washburn, S.M. Abmayr, and J.L. Workman. 2006. The essential gene *wda* encodes a WD40 repeat subunit of Drosophila SAGA required for histone H3 acetylation. *Mol Cell Biol.* 26:7178-89.

H:

Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson. 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* 10:32-42.

Hamel, C.P. 2007. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis.* 2:7.

Hamiche, A., P. Schultz, V. Ramakrishnan, P. Oudet, and A. Prunell. 1996. Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes. *J Mol Biol.* 257:30-42.

Hancock, R. 2004. A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus. *J Struct Biol.* 146:281-90.

Harding, A.E. 1993. Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv Neurol.* 61:1-14.

Hashimoto, H., Y. Takami, E. Sonoda, T. Iwasaki, H. Iwano, M. Tachibana, S. Takeda, T. Nakayama, H. Kimura, and Y. Shinkai. 2010. Histone H1 null vertebrate cells exhibit altered nucleosome architecture. *Nucleic Acids Res.*

Hassan, A.H., P. Prochasson, K.E. Neely, S.C. Galasinski, M. Chandy, M.J. Carrozza, and J.L. Workman. 2002. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell.* 111:369-79.

- Heintzman, N.D., R.K. Stuart, G. Hon, Y. Fu, C.W. Ching, R.D. Hawkins, L.O. Barrera, S. Van Calcar, C. Qu, K.A. Ching, W. Wang, Z. Weng, R.D. Green, G.E. Crawford, and B. Ren.** 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet.* 39:311-8.
- Heitz.** 1928a. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik.* 69.
- Heitz, E.** 1928b. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik.* 69:762–818.
- Helmlinger, D., G. Abou-Sleymane, G. Yvert, S. Rousseau, C. Weber, Y. Trottier, J.L. Mandel, and D. Devys.** 2004a. Disease progression despite early loss of polyglutamine protein expression in SCA7 mouse model. *J Neurosci.* 24:1881-7.
- Helmlinger, D., S. Hardy, G. Abou-Sleymane, A. Eberlin, A.B. Bowman, A. Gansmuller, S. Picaud, H.Y. Zoghbi, Y. Trottier, L. Tora, and D. Devys.** 2006a. Glutamine-expanded ataxin-7 alters TFTC/STAGA recruitment and chromatin structure leading to photoreceptor dysfunction. *PLoS Biol.* 4:e67.
- Helmlinger, D., S. Hardy, S. Sasorith, F. Klein, F. Robert, C. Weber, L. Miguet, N. Potier, A. Van-Dorsseleer, J.M. Wurtz, J.L. Mandel, L. Tora, and D. Devys.** 2004b. Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Hum Mol Genet.* 13:1257-65.
- Helmlinger, D., L. Tora, and D. Devys.** 2006b. Transcriptional alterations and chromatin remodeling in polyglutamine diseases. *Trends Genet.* 22:562-70.
- Henry, K.W., A. Wyce, W.S. Lo, L.J. Duggan, N.C. Emre, C.F. Kao, L. Pillus, A. Shilatifard, M.A. Osley, and S.L. Berger.** 2003. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* 17:2648-63.
- Hill, D.A.** 2001. Influence of linker histone H1 on chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol.* 79:317-24.
- Hochstrasser, M.** 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet.* 30:405-39.
- Hojo, M., T. Ohtsuka, N. Hashimoto, G. Gradwohl, F. Guillemot, and R. Kageyama.** 2000. Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina. *Development.* 127:2515-22.
- Holstege, F.C., U. Fiedler, and H.T. Timmers.** 1997. Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *Embo J.* 16:7468-80.

- Holstege, F.C., P.C. van der Vliet, and H.T. Timmers.** 1996. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *Embo J.* 15:1666-77.
- Horowitz-Scherer, R.A., and C.L. Woodcock.** 2006. Organization of interphase chromatin. *Chromosoma.* 115:1-14.
- Horowitz, R.A., D.A. Agard, J.W. Sedat, and C.L. Woodcock.** 1994. The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J Cell Biol.* 125:1-10.
- Huang, Y., J. Fang, M.T. Bedford, Y. Zhang, and R.M. Xu.** 2006. Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science.* 312:748-51.
- Hughes, R.E., R.S. Lo, C. Davis, A.D. Strand, C.L. Neal, J.M. Olson, and S. Fields.** 2001. Altered transcription in yeast expressing expanded polyglutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13201-6.
- Huisinga, K.L., and B.F. Pugh.** 2004. A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 13:573-85.
- Humbel, B.** 2007. Freeze-substitution. In *Handbook of cryo-preparation methods for electron microscopy.* A. Cavalier, D. Spehner, and B.M. Humbel, editors. CRC Press. 321-341.
- Hyland, E.M., M.S. Cosgrove, H. Molina, D. Wang, A. Pandey, R.J. Cottee, and J.D. Boeke.** 2005. Insights into the role of histone H3 and histone H4 core modifiable residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 25:10060-70.

I:

- Ingvarsdottir, K., N.J. Krogan, N.C. Emre, A. Wyce, N.J. Thompson, A. Emili, T.R. Hughes, J.F. Greenblatt, and S.L. Berger.** 2005. H2B ubiquitin protease Ubp8 and Sgf11 constitute a discrete functional module within the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell Biol.* 25:1162-72.

J:

- Jackson, D.A.** 1997. Chromatin domains and nuclear compartments: establishing sites of gene expression in eukaryotic nuclei. *Mol Biol Rep.* 24:209-20.
- Jadhav, A.P., H.A. Mason, and C.L. Cepko.** 2006. Notch 1 inhibits photoreceptor production in the developing mammalian retina. *Development.* 133:913-23.

Jason, L.J., R.M. Finn, G. Lindsey, and J. Ausio. 2005. Histone H2A ubiquitination does not preclude histone H1 binding, but it facilitates its association with the nucleosome. *J Biol Chem.* 280:4975-82.

Jeanmougin, F., J.M. Wurtz, B. Le Douarin, P. Chambon, and R. Losson. 1997. The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci.* 22:151-3.

Jenuwein, T., and C.D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science.* 293:1074-80.

Jeon, C.J., E. Strettoi, and R.H. Masland. 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci.* 18:8936-46.

K:

Kaytor, M.D., L.A. DuVick, P.J. Skinner, M.D. Koob, L.P. Ranum, and H.T. Orr. 1999. Nuclear localization of the spinocerebellar ataxia type 7 protein, ataxin-7. *Hum Mol Genet.* 8:1657-64.

Khochbin, S. 2001. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene.* 271:1-12.

Kingston, R.E., and G.J. Narlikar. 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13:2339-52.

Klement, I.A., P.J. Skinner, M.D. Kaytor, H. Yi, S.M. Hersch, H.B. Clark, H.Y. Zoghbi, and H.T. Orr. 1998. Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell.* 95:41-53.

Kobayashi, M., S. Takezawa, K. Hara, R.T. Yu, Y. Umesono, K. Agata, M. Taniwaki, K. Yasuda, and K. Umesono. 1999. Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4814-9.

Kohler, A., P. Pascual-Garcia, A. Llopis, M. Zapater, F. Posas, E. Hurt, and S. Rodriguez-Navarro. 2006. The mRNA export factor Sus1 is involved in Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase-mediated H2B deubiquitylation through its interaction with Ubp8 and Sgf11. *Mol Biol Cell.* 17:4228-36.

Kohler, A., M. Schneider, G.G. Cabal, U. Nehrbass, and E. Hurt. 2008. Yeast Ataxin-7 links histone deubiquitination with gene gating and mRNA export. *Nat Cell Biol.* 10:707-15.

Komissarova, N., and M. Kashlev. 1997. RNA polymerase switches between inactivated and activated states by translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem.* 272:15329-38.

Kornberg, R.D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 184:868-71.

- Kornberg, R.D., and Y. Lorch.** 1999. Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 9:148-51.
- Koshy, B.T., and H.Y. Zoghbi.** 1997. The CAG/polyglutamine tract diseases: gene products and molecular pathogenesis. *Brain Pathol.* 7:927-42.
- Koster, A.J., R. Grimm, D. Typke, R. Hegerl, A. Stoschek, J. Walz, and W. Baumeister.** 1997. Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *J Struct Biol.* 120:276-308.
- Kouzarides, T.** 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128:693-705.
- Kristjuhan, A., J. Walker, N. Suka, M. Grunstein, D. Roberts, B.R. Cairns, and J.Q. Svejstrup.** 2002. Transcriptional inhibition of genes with severe histone h3 hypoacetylation in the coding region. *Mol Cell.* 10:925-33.
- Krogan, N.J., M. Kim, A. Tong, A. Golshani, G. Cagney, V. Canadien, D.P. Richards, B.K. Beattie, A. Emili, C. Boone, A. Shilatifard, S. Buratowski, and J. Greenblatt.** 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 23:4207-18.
- L:**
- La Spada, A.R., Y.H. Fu, B.L. Sopher, R.T. Libby, X. Wang, L.Y. Li, D.D. Einum, J. Huang, D.E. Possin, A.C. Smith, R.A. Martinez, K.L. Koszdin, P.M. Treuting, C.B. Ware, J.B. Hurley, L.J. Ptacek, and S. Chen.** 2001. Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron.* 31:913-27.
- La Spada, A.R., and J.P. Taylor.** 2003. Polyglutamines placed into context. *Neuron.* 38:681-4.
- Lan, F., A.C. Nottke, and Y. Shi.** 2008. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol.* 20:316-25.
- Lan, F., and Y. Shi.** 2009. Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Sci China C Life Sci.* 52:311-22.
- Langmore, J.P., and J.R. Paulson.** 1983. Low angle x-ray diffraction studies of chromatin structure in vivo and in isolated nuclei and metaphase chromosomes. *J Cell Biol.* 96:1120-31.
- Laribee, R.N., S.M. Fuchs, and B.D. Strahl.** 2007. H2B ubiquitylation in transcriptional control: a FACT-finding mission. *Genes Dev.* 21:737-43.
- Lebre, A.S., L. Jamot, J. Takahashi, N. Spassky, C. Leprince, N. Ravise, C. Zander, H. Fujigasaki, P. Kussel-Andermann, C. Duyckaerts, J.H. Camonis, and A. Brice.** 2001.

- Ataxin-7 interacts with a Cbl-associated protein that it recruits into neuronal intranuclear inclusions. *Hum Mol Genet.* 10:1201-13.
- Lee, J.S., A. Shukla, J. Schneider, S.K. Swanson, M.P. Washburn, L. Florens, S.R. Bhaumik, and A. Shilatifard.** 2007. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell.* 131:1084-96.
- Lee, K.K., L. Florens, S.K. Swanson, M.P. Washburn, and J.L. Workman.** 2005. The deubiquitylation activity of Ubp8 is dependent upon Sgf11 and its association with the SAGA complex. *Mol Cell Biol.* 25:1173-82.
- Lee, T.I., H.C. Causton, F.C. Holstege, W.C. Shen, N. Hannett, E.G. Jennings, F. Winston, M.R. Green, and R.A. Young.** 2000. Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature.* 405:701-4.
- Legube, G., and D. Trouche.** 2003. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep.* 4:944-7.
- Leis, A., B. Rockel, L. Andrees, and W. Baumeister.** 2009. Visualizing cells at the nanoscale. *Trends Biochem Sci.* 34:60-70.
- Levine, M., and E.H. Davidson.** 2005. Gene regulatory networks for development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:4936-42.
- Li, Q., G. Barkess, and H. Qian.** 2006. Chromatin looping and the probability of transcription. *Trends Genet.* 22:197-202.
- Libby, R.T., D.G. Monckton, Y.H. Fu, R.A. Martinez, J.P. McAbney, R. Lau, D.D. Einum, K. Nichol, C.B. Ware, L.J. Ptacek, C.E. Pearson, and A.R. La Spada.** 2003. Genomic context drives SCA7 CAG repeat instability, while expressed SCA7 cDNAs are intergenerationally and somatically stable in transgenic mice. *Hum Mol Genet.* 12:41-50.
- Lin, X., B. Antalffy, D. Kang, H.T. Orr, and H.Y. Zoghbi.** 2000. Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat Neurosci.* 3:157-63.
- Liu, C.L., T. Kaplan, M. Kim, S. Buratowski, S.L. Schreiber, N. Friedman, and O.J. Rando.** 2005. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol.* 3:e328.
- Livesey, F.J., and C.L. Cepko.** 2001. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci.* 2:109-18.
- Lu, X., S.N. Wontakal, A.V. Emelyanov, P. Morcillo, A.Y. Konev, D.V. Fyodorov, and A.I. Skoultchi.** 2009. Linker histone H1 is essential for *Drosophila* development, the

establishment of pericentric heterochromatin, and a normal polytene chromosome structure. *Genes Dev.* 23:452-65.

Lucic, V., F. Forster, and W. Baumeister. 2005. Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu Rev Biochem.* 74:833-65.

Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 1997a. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 389:251-60.

Luger, K., T.J. Rechsteiner, A.J. Flaus, M.M. Waye, and T.J. Richmond. 1997b. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol.* 272:301-11.

M:

Maeshima, K., S. Hihara, and M. Eltsov. 2010. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr Opin Cell Biol.*

Malik, H.S., and S. Henikoff. 2003. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol.* 10:882-91.

Margueron, R., P. Trojer, and D. Reinberg. 2005. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev.* 15:163-76.

Marino-Ramirez, L., M.G. Kann, B.A. Shoemaker, and D. Landsman. 2005. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics.* 2:719-29.

Marmorstein, R. 2001. Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci.* 58:693-703.

Marsden, M.P., and U.K. Laemmli. 1979. Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell.* 17:849-58.

Martin, C., and Y. Zhang. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:838-49.

Martinez, E. 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol.* 50:925-47.

Martinez, E., T.K. Kundu, J. Fu, and R.G. Roeder. 1998. A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem.* 273:23781-5.

McDowall, A.W., J.M. Smith, and J. Dubochet. 1986. Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes in situ. *Embo J.* 5:1395-402.

- McMahon, S.J., M.G. Pray-Grant, D. Schieltz, J.R. Yates, 3rd, and P.A. Grant.** 2005. Polyglutamine-expanded spinocerebellar ataxia-7 protein disrupts normal SAGA and SLIK histone acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8478-82.
- Meinhart, A., T. Kamenski, S. Hoepfner, S. Baumli, and P. Cramer.** 2005. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.* 19:1401-15.
- Michalik, A., J.J. Martin, and C. Van Broeckhoven.** 2004. Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 12:2-15.
- Milne, T.A., S.D. Briggs, H.W. Brock, M.E. Martin, D. Gibbs, C.D. Allis, and J.L. Hess.** 2002. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell.* 10:1107-17.
- Morrow, E.M., T. Furukawa, and C.L. Cepko.** 1998. Vertebrate photoreceptor cell development and disease. *Trends Cell Biol.* 8:353-8.
- Mujtaba, S., L. Zeng, and M.M. Zhou.** 2007. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene.* 26:5521-7.
- Myers, L.C., and R.D. Kornberg.** 2000. Mediator of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem.* 69:729-49.
- N:**
- Nagy, Z., A. Riss, C. Romier, X. le Guezennec, A.R. Dongre, M. Orpinell, J. Han, H. Stunnenberg, and L. Tora.** 2009. The human SPT20-containing SAGA complex plays a direct role in the regulation of endoplasmic reticulum stress-induced genes. *Mol Cell Biol.* 29:1649-60.
- Nagy, Z., and L. Tora.** 2007. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene.* 26:5341-57.
- Nakagawa, T., T. Kajitani, S. Togo, N. Masuko, H. Ohdan, Y. Hishikawa, T. Koji, T. Matsuyama, T. Ikura, M. Muramatsu, and T. Ito.** 2008. Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev.* 22:37-49.
- Ng, H.H., F. Robert, R.A. Young, and K. Struhl.** 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell.* 11:709-19.
- Nielsen, A.L., M. Oulad-Abdelghani, J.A. Ortiz, E. Remboutsika, P. Chambon, and R. Losson.** 2001. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell.* 7:729-39.

Nijman, S.M., M.P. Luna-Vargas, A. Velds, T.R. Brummelkamp, A.M. Dirac, T.K. Sixma, and R. Bernards. 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. 123:773-86.

O:

Ogryzko, V.V., T. Kotani, X. Zhang, R.L. Schiltz, T. Howard, X.J. Yang, B.H. Howard, J. Qin, and Y. Nakatani. 1998. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell*. 94:35-44.

Osborne, C.S., L. Chakalova, K.E. Brown, D. Carter, A. Horton, E. Debrand, B. Goyenechea, J.A. Mitchell, S. Lopes, W. Reik, and P. Fraser. 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet*. 36:1065-71.

Osley, M.A., A.B. Fleming, and C.F. Kao. 2006. Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. *Results Probl Cell Differ*. 41:47-75.

Oudet, P., M. Gross-Bellard, and P. Chambon. 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*. 4:281-300.

Ozawa, Y., K. Nakao, T. Shimazaki, J. Takeda, S. Akira, K. Ishihara, T. Hirano, Y. Oguchi, and H. Okano. 2004. Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. *Mol Cell Neurosci*. 26:258-70.

P:

Palancade, B., and O. Bensaude. 2003. Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem*. 270:3859-70.

Palhan, V.B., S. Chen, G.H. Peng, A. Tjernberg, A.M. Gamper, Y. Fan, B.T. Chait, A.R. La Spada, and R.G. Roeder. 2005. Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:8472-7.

Pardue, M.L., and J.G. Gall. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*. 168:1356-8.

Pascual-Garcia, P., C.K. Govind, E. Queralt, B. Cuenca-Bono, A. Llopis, S. Chavez, A.G. Hinnebusch, and S. Rodriguez-Navarro. 2008. Sus1 is recruited to coding regions and functions during transcription elongation in association with SAGA and TREX2. *Genes Dev*. 22:2811-22.

Paulson, H.L. 2000. Toward an understanding of polyglutamine neurodegeneration. *Brain Pathol*. 10:293-9.

Paulson, J.R., and J.P. Langmore. 1983. Low angle x-ray diffraction studies of HeLa metaphase chromosomes: effects of histone phosphorylation and chromosome isolation procedure. *J Cell Biol.* 96:1132-7.

Pavri, R., B. Zhu, G. Li, P. Trojer, S. Mandal, A. Shilatifard, and D. Reinberg. 2006. Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell.* 125:703-17.

Pray-Grant, M.G., J.A. Daniel, D. Schieltz, J.R. Yates, 3rd, and P.A. Grant. 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature.* 433:434-8.

Proudfoot, N.J., A. Furger, and M.J. Dye. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell.* 108:501-12.

Q:

Qiu, H., C. Hu, S. Yoon, K. Natarajan, M.J. Swanson, and A.G. Hinnebusch. 2004. An array of coactivators is required for optimal recruitment of TATA binding protein and RNA polymerase II by promoter-bound Gcn4p. *Mol Cell Biol.* 24:4104-17.

R:

Ramakrishnan, V., J.T. Finch, V. Graziano, P.L. Lee, and R.M. Sweet. 1993. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature.* 362:219-23.

Rhee, K.D., O. Goureau, S. Chen, and X.J. Yang. 2004. Cytokine-induced activation of signal transducer and activator of transcription in photoreceptor precursors regulates rod differentiation in the developing mouse retina. *J Neurosci.* 24:9779-88.

Richard, P., and J.L. Manley. 2009. Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* 23:1247-69.

Ringrose, L., and R. Paro. 2004. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet.* 38:413-43.

Robinson, P.J., W. An, A. Routh, F. Martino, L. Chapman, R.G. Roeder, and D. Rhodes. 2008. 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. *J Mol Biol.* 381:816-25.

Robinson, P.J., L. Fairall, V.A. Huynh, and D. Rhodes. 2006. EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:6506-11.

- Robinson, P.J., and D. Rhodes.** 2006. Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol.* 16:336-43.
- Rodriguez-Navarro, S.** 2009. Insights into SAGA function during gene expression. *EMBO Rep.* 10:843-50.
- Rodriguez-Navarro, S., T. Fischer, M.J. Luo, O. Antunez, S. Brettschneider, J. Lechner, J.E. Perez-Ortin, R. Reed, and E. Hurt.** 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell.* 116:75-86.
- Rose, S.M., and W.T. Garrard.** 1984. Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J Biol Chem.* 259:8534-44.
- Ross, C.A., and M.A. Poirier.** 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 10 Suppl:S10-7.
- Routh, A., S. Sandin, and D. Rhodes.** 2008. Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:8872-7.
- Rudd, M.D., M.G. Izban, and D.S. Luse.** 1994. The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8057-61.

S:

- Sancho, M., E. Diani, M. Beato, and A. Jordan.** 2008. Depletion of human histone H1 variants uncovers specific roles in gene expression and cell growth. *PLoS Genet.* 4:e1000227.
- Sasaki, H., and Y. Matsui.** 2008. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet.* 9:129-40.
- Schalch, T., S. Duda, D.F. Sargent, and T.J. Richmond.** 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature.* 436:138-41.
- Schneider, R., and R. Grosschedl.** 2007. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev.* 21:3027-43.
- Schotta, G., M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg, and T. Jenuwein.** 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18:1251-62.

- Schubeler, D., D.M. MacAlpine, D. Scalzo, C. Wirbelauer, C. Kooperberg, F. van Leeuwen, D.E. Gottschling, L.P. O'Neill, B.M. Turner, J. Delrow, S.P. Bell, and M. Groudine.** 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* 18:1263-71.
- Schuettengruber, B., D. Chourrout, M. Vervoort, B. Leblanc, and G. Cavalli.** 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell.* 128:735-45.
- Sermwittayawong, D., and S. Tan.** 2006. SAGA binds TBP via its Spt8 subunit in competition with DNA: implications for TBP recruitment. *Embo J.* 25:3791-800.
- Sexton, T., H. Schober, P. Fraser, and S.M. Gasser.** 2007a. Gene regulation through nuclear organization. *Nat Struct Mol Biol.* 14:1049-1055.
- Sexton, T., D. Umlauf, S. Kurukuti, and P. Fraser.** 2007b. The role of transcription factories in large-scale structure and dynamics of interphase chromatin. *Semin Cell Dev Biol.* 18:691-7.
- Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstone, P.A. Cole, R.A. Casero, and Y. Shi.** 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 119:941-53.
- Shi, Y., and J.R. Whetstone.** 2007. Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell.* 25:1-14.
- Shilatifard, A.** 2008. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 20:341-8.
- Shilatifard, A., R.C. Conaway, and J.W. Conaway.** 2003. The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem.* 72:693-715.
- Shogren-Knaak, M., H. Ishii, J.M. Sun, M.J. Pazin, J.R. Davie, and C.L. Peterson.** 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science.* 311:844-7.
- Shukla, A., P. Chaurasia, and S.R. Bhaumik.** 2009. Histone methylation and ubiquitination with their cross-talk and roles in gene expression and stability. *Cell Mol Life Sci.* 66:1419-33.
- Sikorski, T.W., and S. Buratowski.** 2009. The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol.* 21:344-51.
- Smallwood, A., P.O. Esteve, S. Pradhan, and M. Carey.** 2007. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev.* 21:1169-78.
- Smith, R.D., R.L. Seale, and J. Yu.** 1983. Transcribed chromatin exhibits an altered nucleosomal spacing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:5505-9.

- Solovei, I., M. Kreysing, C. Lanctot, S. Kosem, L. Peichl, T. Cremer, J. Guck, and B. Joffe.** 2009. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell*. 137:356-68.
- Stehr, R., N. Kepper, K. Rippe, and G. Wedemann.** 2008. The effect of internucleosomal interaction on folding of the chromatin fiber. *Biophys J*. 95:3677-91.
- Steinbrecht, R.A.** 1980. Cryofixation without cryoprotectants. Freeze substitution and freeze etching of an insect olfactory receptor. *Tissue Cell*. 12:73-100.
- Sterner, D.E., and S.L. Berger.** 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64:435-59.
- Strom, A.L., J. Jonasson, P. Hart, T. Brannstrom, L. Forsgren, and M. Holmberg.** 2002. Cloning and expression analysis of the murine homolog of the spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) gene. *Gene*. 285:91-9.
- Sugars, K.L., and D.C. Rubinsztein.** 2003. Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet*. 19:233-8.
- Sullivan, S.A., and D. Landsman.** 2003. Characterization of sequence variability in nucleosome core histone folds. *Proteins*. 52:454-65.
- Sun, Z.W., and C.D. Allis.** 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*. 418:104-8.
- Surani, M.A., K. Hayashi, and P. Hajkova.** 2007. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 128:747-62.
- Svejstrup, J.Q.** 2007. Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation. *Trends Biochem Sci*. 32:165-71.
- Swaroop, A., J.Z. Xu, H. Pawar, A. Jackson, C. Skolnick, and N. Agarwal.** 1992. A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:266-70.

T:

- Tamkun, J.W., R. Deuring, M.P. Scott, M. Kissinger, A.M. Pattatucci, T.C. Kaufman, and J.A. Kennison.** 1992. brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*. 68:561-72.
- Tanny, J.C., H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and C.D. Allis.** 2007. Ubiquitylation of histone H2B controls RNA polymerase II transcription elongation independently of histone H3 methylation. *Genes Dev*. 21:835-47.

- Tarlac, V., and E. Storey.** 2003. Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J Neurosci Res.* 74:406-16.
- Taverna, S.D., H. Li, A.J. Ruthenburg, C.D. Allis, and D.J. Patel.** 2007. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol.* 14:1025-40.
- Thoma, F., and T. Koller.** 1977. Influence of histone H1 on chromatin structure. *Cell.* 12:101-7.
- Thoma, F., T. Koller, and A. Klug.** 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol.* 83:403-27.
- Timmermann, S., H. Lehrmann, A. Poleskaya, and A. Harel-Bellan.** 2001. Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci.* 58:728-36.
- Timmers, H.T., and L. Tora.** 2005. SAGA unveiled. *Trends Biochem Sci.* 30:7-10.
- Tokuyasu, K.T.** 1973. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol.* 57:551-65.
- Tokuyasu, K.T.** 1980. Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *Histochem J.* 12:381-403.
- Tomita, K., M. Ishibashi, K. Nakahara, S.L. Ang, S. Nakanishi, F. Guillemot, and R. Kageyama.** 1996. Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. *Neuron.* 16:723-34.
- Tremethick, D.J.** 2007. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell.* 128:651-4.
- Trojer, P., G. Li, R.J. Sims, 3rd, A. Vaquero, N. Kalakonda, P. Boccuni, D. Lee, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S.D. Nimer, Y.H. Wang, and D. Reinberg.** 2007. L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell.* 129:915-28.
- Trojer, P., and D. Reinberg.** 2007. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell.* 28:1-13.
- Tse, C., T. Sera, A.P. Wolffe, and J.C. Hansen.** 1998. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol.* 18:4629-38.
- Tsukada, Y., J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M.E. Warren, C.H. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang.** 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature.* 439:811-6.

Turner, B.M. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*. 22:836-45.

U:

Uptain, S.M., C.M. Kane, and M.J. Chamberlin. 1997. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem*. 66:117-72.

V:

Vakoc, C.R., S.A. Mandat, B.A. Olenchock, and G.A. Blobel. 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*. 19:381-91.

van de Warrenburg, B.P., C.W. Frenken, M.G. Ausems, T. Kleefstra, R.J. Sinke, N.V. Knoers, and H.P. Kremer. 2001. Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: the infantile phenotype. *J Neurol*. 248:911-4.

Verdone, L., M. Caserta, and E. Di Mauro. 2005. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol*. 83:344-53.

Volkel, P., and P.O. Angrand. 2007. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*. 89:1-20.

W:

Wang, J., K. Scully, X. Zhu, L. Cai, J. Zhang, G.G. Prefontaine, A. Krones, K.A. Ohgi, P. Zhu, I. Garcia-Bassets, F. Liu, H. Taylor, J. Lozach, F.L. Jayes, K.S. Korach, C.K. Glass, X.D. Fu, and M.G. Rosenfeld. 2007. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature*. 446:882-7.

Wang, Z.F., A.M. Sirotkin, G.M. Buchold, A.I. Skoultchi, and W.F. Marzluff. 1997. The mouse histone H1 genes: gene organization and differential regulation. *J Mol Biol*. 271:124-38.

Weake, V.M., K.K. Lee, S. Guelman, C.H. Lin, C. Seidel, S.M. Abmayr, and J.L. Workman. 2008. SAGA-mediated H2B deubiquitination controls the development of neuronal connectivity in the Drosophila visual system. *Embo J*. 27:394-405.

Weake, V.M., and J.L. Workman. 2008. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell*. 29:653-63.

- Weintraub, H., and M. Groudine.** 1976. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science*. 193:848-56.
- Wilson, M.T., M.A. Farmer, and C.J. Karwoski.** 1998. Ultrastructure of the frog retina after high-pressure freezing and freeze substitution. *J Microsc.* 189:219-35.
- Wolffe, A.P.** 1997. Histone H1. *Int J Biochem Cell Biol.* 29:1463-6.
- Wolffe, A.P., and D. Pruss. 1996. Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell*. 84:817-9.
- Woodcock, C.L.** 2006. Chromatin architecture. *Curr Opin Struct Biol.* 16:213-20.
- Woodcock, C.L., S.A. Grigoryev, R.A. Horowitz, and N. Whitaker.** 1993. A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9021-5.
- Wu, J., L.T. Smith, C. Plass, and T.H. Huang.** 2006. ChIP-chip comes of age for genome-wide functional analysis. *Cancer Res.* 66:6899-902.
- Wu, P.Y., C. Ruhlmann, F. Winston, and P. Schultz.** 2004. Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell.* 15:199-208.
- Wu, S., R.C. Trievel, and J.C. Rice.** 2007. Human SFMBT is a transcriptional repressor protein that selectively binds the N-terminal tail of histone H3. *FEBS Lett.* 581:3289-96.
- Wu Zhijin , Rafael A Irizarry, Robert Gentleman, Francisco Martinez-Murillo, and F. Spencer.** 2004. A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *Journal of the American Statistical Association.* 99:909-917.
- Wyce, A., T. Xiao, K.A. Whelan, C. Kosman, W. Walter, D. Eick, T.R. Hughes, N.J. Krogan, B.D. Strahl, and S.L. Berger.** 2007. H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Mol Cell.* 27:275-88.

X:

- Xiao, T., C.F. Kao, N.J. Krogan, Z.W. Sun, J.F. Greenblatt, M.A. Osley, and B.D. Strahl.** 2005. Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* 25:637-51.
- Xu, W., D.G. Edmondson, Y.A. Evrard, M. Wakamiya, R.R. Behringer, and S.Y. Roth.** 2000. Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nat Genet.* 26:229-32.

Y:

- Yamaguchi, Y., N. Inukai, T. Narita, T. Wada, and H. Handa.** 2002. Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol.* 22:2918-27.
- Yang, X.J.** 2004. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays.* 26:1076-87.
- Yaniv, M., and S. Cereghini.** 1986. Structure of transcriptionally active chromatin. *CRC Crit Rev Biochem.* 21:1-26.
- Yoo, S.Y., M.E. Pennesi, E.J. Weeber, B. Xu, R. Atkinson, S. Chen, D.L. Armstrong, S.M. Wu, J.D. Sweatt, and H.Y. Zoghbi.** 2003. SCA7 knockin mice model human SCA7 and reveal gradual accumulation of mutant ataxin-7 in neurons and abnormalities in short-term plasticity. *Neuron.* 37:383-401.
- Young, J.E., L. Gouw, S. Propp, B.L. Sopher, J. Taylor, A. Lin, E. Hermel, A. Logvinova, S.F. Chen, S. Chen, D.E. Bredesen, R. Truant, L.J. Ptacek, A.R. La Spada, and L.M. Ellerby.** 2007. Proteolytic cleavage of ataxin-7 by caspase-7 modulates cellular toxicity and transcriptional dysregulation. *J Biol Chem.* 282:30150-60.
- Young, R.A.** 1991. RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem.* 60:689-715.
- Young, T.L., and C.L. Cepko.** 2004. A role for ligand-gated ion channels in rod photoreceptor development. *Neuron.* 41:867-79.
- Yudkovsky, N., J.A. Ranish, and S. Hahn.** 2000. A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature.* 408:225-9.
- Yvert, G., K.S. Lindenberg, D. Devys, D. Helmlinger, G.B. Landwehrmeyer, and J.L. Mandel.** 2001. SCA7 mouse models show selective stabilization of mutant ataxin-7 and similar cellular responses in different neuronal cell types. *Hum Mol Genet.* 10:1679-92.
- Yvert, G., K.S. Lindenberg, S. Picaud, G.B. Landwehrmeyer, J.A. Sahel, and J.L. Mandel.** 2000. Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Hum Mol Genet.* 9:2491-506.

Z:

- Zander, C., J. Takahashi, K.H. El Hachimi, H. Fujigasaki, V. Albanese, A.S. Lebre, G. Stevanin, C. Duyckaerts, and A. Brice.** 2001. Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase-3. *Hum Mol Genet.* 10:2569-79.

- Zeng, L., and M.M. Zhou.** 2002. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.* 513:124-8.
- Zhang, S.S., X.Y. Fu, and C.J. Barnstable.** 2002. Tissue culture studies of retinal development. *Methods.* 28:439-47.
- Zhang, S.S., J. Wei, H. Qin, L. Zhang, B. Xie, P. Hui, A. Deisseroth, C.J. Barnstable, and X.Y. Fu.** 2004. STAT3-mediated signaling in the determination of rod photoreceptor cell fate in mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:2407-12.
- Zhang, X.Y., M. Varthi, S.M. Sykes, C. Phillips, C. Warzecha, W. Zhu, A. Wyce, A.W. Thorne, S.L. Berger, and S.B. McMahon.** 2008. The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression. *Mol Cell.* 29:102-11.
- Zhao, Y., G. Lang, S. Ito, J. Bonnet, E. Metzger, S. Sawatsubashi, E. Suzuki, X. Le Guezennec, H.G. Stunnenberg, A. Krasnov, S.G. Georgieva, R. Schule, K. Takeyama, S. Kato, L. Tora, and D. Devys.** 2008. A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell.* 29:92-101.
- Zhou, J., J.Y. Fan, D. Rangasamy, and D.J. Tremethick.** 2007. The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat Struct Mol Biol.* 14:1070-6.
- Zhou, Y.B., S.E. Gerchman, V. Ramakrishnan, A. Travers, and S. Muyltermans.** 1998. Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature.* 395:402-5.
- Zhu, P., W. Zhou, J. Wang, J. Puc, K.A. Ohgi, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld.** 2007. A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Mol Cell.* 27:609-21.
- Zoghbi, H.Y., and H.T. Orr.** 2000. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.* 23:217-47.

Résumé

Les noyaux de bâtonnets de rétines de souris saines présentent une organisation caractéristique dans laquelle la chromatine condensée occupe 70% de leurs volumes. Chez des souris SCA7, modèle de la maladie humaine Ataxie-SpinoCérébelleuse de type 7, les noyaux de bâtonnets présentent une décondensation de la chromatine associée à des défauts transcriptionnels. Les gènes fortement transcrits dans les bâtonnets de souris saines sont sous-exprimés chez les souris SCA7. La protéine ataxine 7 mutée, responsable de cette maladie, appartient au complexe SAGA qui facilite la transcription notamment en acétylant les histones. La structure de la chromatine est connue pour réguler la transcription et il est généralement admis que la chromatine décondensée est transcriptionnellement active. Le phénotype observé dans les noyaux SCA7 est donc paradoxal. Pour comprendre ce phénotype, des techniques de cryo-préparation des rétines pour la microscopie électronique sont optimisées. L'organisation 3D de la chromatine est déterminée par tomographie. Les ARN polymérase II et les histones modifiées sont cartographiées par immunomarquage à l'or colloïdal. À l'aide de ces méthodes, l'organisation structurale de la chromatine est corrélée *in vivo* aux modifications des histones et à l'activité transcriptionnelle. La comparaison des noyaux d'animaux SCA7 à ceux d'animaux sains, permet de caractériser des remaniements chromatiniens. L'étude des protéines associées à la chromatine montre une diminution drastique de l'histone H1 dans les noyaux SCA7. Nos travaux suggèrent que l'histone H1, connue pour favoriser la compaction de la chromatine, joue un rôle clé dans le phénotype des souris SCA7.

Summary

The nuclei of rod photoreceptors in the retina of mice display a characteristic organization with condensed chromatin occupying 70% of their volume. In SCA7 mice, which are models for human type 7 SpinoCerebellar Ataxia, rod nuclei display decondensed chromatin which is associated with defects in transcription. Highly expressed genes in rods of healthy mice are poorly expressed in SCA7 mice. The ataxin 7 protein which is mutated in SCA7 disease belongs to the SAGA complex which enhances transcription in particular through histone acetyltransferase activity. Chromatin structure is known to regulate transcription and it is generally thought that decondensed chromatin is transcriptionally active. The phenotype of SCA7 nuclei is therefore paradoxical. To understand this phenotype, methods for the cryo-preparation of retinas and their visualization by electron microscopy were optimized. The 3D organization of chromatin is determined by electron tomography. RNA polymerase II molecules and modified histones are mapped by immuno-gold labeling. Using these techniques, the structural organization of chromatin is correlated *in vivo* with histone modifications and transcriptional activity. The comparison of nuclei from SCA7 animals to those of healthy animals allows the characterization of chromatin reorganization. The analysis of proteins associated with chromatin demonstrates a drastic decrease in histone H1 in the nuclei of SCA7 mice. Our studies suggest that histone H1, known to be involved in chromatin compaction, plays a key role in the phenotype of SCA7 mice.