



Numéro National de Thèse : 2019LYSEN017

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée par
l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire, Génétique
Discipline : Science de la Vie et de la Santé

Soutenue publiquement le 28/06/2019, par :
Marion HERBETTE

**Étude de la fonction de l'histone méthyltransférase SET-2
et de ses interacteurs dans le maintien de la lignée
germinale de *Caenorhabditis elegans***

Devant le jury composé de :

FEIL, Robert / Directeur de recherche / Université de Montpellier / Rapporteur
LANDMANN, Frédéric / Chargé de Recherche / Université de Montpellier / Rapporteur
CLOUAIRE, Thomas / Chargé de Recherche / Université Paul Sabatier / Examineur
PALLADINO, Francesca / Directrice de recherche / ENS de Lyon / Examinatrice
BERNARD, Pascal / Directeur de recherche / ENS de Lyon / Examineur
ROBERT, Valérie / Chargée de Recherche / ENS de Lyon / Directrice de thèse

Remerciements

J'aimerais exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui m'ont accompagné au cours de cette thèse.

Je souhaite tout d'abord adresser mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury, Robert Feil, Frédéric Landmann, Thomas Clouaire, Pascal Bernard, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et en particulier Robert Feil et Frédéric Landmann pour avoir évalué mon manuscrit. Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse Vincent Vanoosthuyse et Aymeric Bailly pour leurs nombreux conseils, leurs remarques avisées et leur bienveillance.

Tout le long de cette thèse j'ai eu la chance d'avoir à mes côtés mes deux mentors, Valérie Robert et Francesca Palladino. Je les remercie chaleureusement de m'avoir accueilli en thèse et de m'avoir fait confiance pour mener ces travaux de recherche. Et je les remercie pour leur encadrement scientifique tout au long de mes quatre années de thèse.

Valérie, c'est en me remémorant mes débuts de thèse que je vois le chemin parcouru, et les progrès réalisés à la paillasse, dans ma rigueur scientifique, mon organisation et aussi dans ma confiance en moi. Merci de m'avoir aidé pour mes présentations qui restent pour moi un exercice compliqué. Je te remercie pour tout le temps passé à relire mon manuscrit et toutes tes suggestions d'amélioration, ainsi que pour les corrections de mes trop nombreuses fautes d'orthographe.

Francesca, j'ai grandement apprécié nos discussions scientifiques (souvent tard le soir). Merci également, de m'avoir donné l'occasion de partir en congrès tout au long de ma thèse. Merci aussi de m'avoir aidé pendant les moments de doute et de m'avoir donné la confiance en moi nécessaire pour poursuivre dans la recherche.

Merci à tous nos collaborateurs : Gaël Yvert et Claire Burny, pour l'analyse bioinformatique des données de séquençage du génome. Je souhaite tout particulièrement remercier Claire Burny. Claire, tu as fait preuve d'une très grande pédagogie pour m'initier à LaTeX, R et Linux, j'ai vraiment apprécié de travailler avec toi.

Merci à David Lières, Aymeric Bailly et Robert Feil pour avoir fait les acquisitions et les analyses de Flim FRET du mutant *set-2*. Les dix jours passés à Montpellier ont été riches d'ensei-

gnements. Merci David pour les discussions scientifiques qui m'ont permis de prendre du recul sur mes résultats, et pour ton encadrement lors de mon séjour. Merci également à tous les membres de l'équipe de Robert Feil pour leur accueil très chaleureux.

J'ai particulièrement apprécié de passer ces années de thèse aux côtés des membres de l'équipe Palladino, et je les remercie pour leur accueil chaleureux, leur aide scientifique et technique, ainsi que pour tous les moments conviviaux vécus ensemble.

Je remercie Cécile Bedet pour m'avoir aidé pour les analyses de RNAseq à un moment où j'étais dans une impasse.

Matthieu Caron, un grand merci pour m'avoir appris les clonages, même si mes plasmides n'ont finalement pas servi, les connaissances que j'ai acquises elles ont bien servi et serviront encore.

Paola Fabrizio, merci pour ta précieuse aide pour les RT-qPCR qui m'ont permis d'être très efficace. J'ai apprécié nos discussions scientifiques et de l'après thèse.

Flore Beurton, merci pour tous tes conseils techniques, pour ton soutien permanent et amical.

Je remercie aussi Marine Mercier dont les cahiers de laboratoire m'ont été d'un précieux secours.

Merci à Steve Garvis et Fanny Michal pour leur précieuse aide en microscopie.

Et bonne chance Loïc pour ta thèse.

Je remercie Catherine Montchamp Moreau : le stage de Master 1 effectué dans son laboratoire a permis de confirmer mon intérêt pour la recherche fondamentale et m'a donné envie de poursuivre une thèse.

Mes remerciements vont également à Benjamin Loppin et Raphaëlle Dubruille, qui m'ont accueilli pour mon stage de Master 2, pour m'avoir soutenu dans ma recherche de thèse et pour m'avoir apportée les bases pour réussir cette thèse.

Je n'oublie pas les membres de l'équipe Delattre pour leur aide scientifique et technique, leur multiple dons ou prêts de matériel, et l'équipe Bernard pour leur très grande aide scientifique sur les condensines.

Mes remerciements vont également aux amis rencontrés au laboratoire : Angélique, Anissa, Alexis, Bénédicte, Charlotte, Claire, Clémence, Delphine et Djo, Élodie, Flore, Jean-Baptiste, Jérôme, Julieta, Lamy, Laurie-Anne, Léa, Loïc, Ludo, Manon, Marianne, Marine, Philippe, Sébastien, Séverin, Sophie, Thibault, Vincent, Xavier. Merci pour tous ces moments mémorables passé à vos côtés.

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans une pensée pour ma famille et mes amis de la fac (Axel, Camille, Cécile, Claire et Élise) dont la présence et les encouragements m'ont poussé à poursuivre mes études jusqu'à la thèse. Merci à mon père qui a toujours cru en moi et dont la persévérance a été un exemple et je remercie ma mère : correctrice d'une partie des fautes d'orthographe de cette thèse... et de beaucoup d'autres de mes écrits.

Table des matières

Index des figures	6
-------------------	---

Index des tableaux	8
--------------------	---

Partie I – Introduction	9
-------------------------	---

1 Organisation de la chromatine à différents niveaux	9
--	---

1.1 Architecture des chromosomes en interphase	9
1.1.1 Nucléosomes et fibre chromatinienne	9
1.1.2 Les interactions locales de la chromatine	11
1.1.3 L'organisation de la chromatine au niveau intermédiaire	11
1.1.4 L'organisation de la chromatine à large échelle	12
1.2 Architecture des chromosomes en mitose	13
1.2.1 Formation des chromosomes mitotiques	14
1.2.2 Les complexes Condensine I et II et leurs propriétés	15
1.2.3 La Topoisomérase II	19

2 Les modifications post-traductionnelles des histones et les enzymes qui les catalysent	21
--	----

2.1 Généralités	22
2.2 La méthylation et les enzymes HMT/HDM	23
2.3 L'Acétylation et les enzymes HAT/HDAC	25
2.4 Établissement de l'euchromatine et de l'hétérochromatine	27
2.5 Coopération fonctionnelle des marques d'histones	28
2.6 Rôle de H3K4me2/3 dans l'expression génique et dans la réparation de l'ADN	30
2.6.1 Rôle de H3K4me2/3 dans l'expression génique	30
2.6.2 Rôle de H3K4me2/3 dans la réparation de l'ADN	32

3 La lignée germinale de <i>C.elegans</i> comme modèle d'étude des régulations épigénétiques	33
--	----

3.1 Généralités sur <i>C. elegans</i>	33
3.2 Généralités sur la lignée germinale	36
3.2.1 Prolifération	38
3.2.2 La région mitotique	38
3.2.3 Structure des chromosomes en méiose	39

3.3 Organisation de la chromatine chez <i>C. elegans</i>	44
3.3.1 Organisation des chromosomes.....	44
3.3.2 Conservation et répartition des marques d'histones.....	45
3.3.3 Les complexes enzymatiques responsables de la méthylation de H3K4.....	48
3.4 Régulation épigénétique dans la lignée germinale.....	49
3.4.1 La répression du chromosome X dans la lignée germinale.....	50
3.4.2 L'inactivation des régulateurs épigénétiques est associée à une perte progressive de l'immortalité de la lignée germinale.....	56
4 Projet de thèse.....	58

Partie II – Résultats

60

1 Rôle des histones methyltransférases SET-2 et MET-1 dans la stabilité du génome	60
1.1 Contexte des travaux de thèse.....	60
1.2 Contribution au manuscrit.....	61
1.3 Manuscrit.....	63
1.4 Analyse de données de séquençage du mutant <i>msh-6</i>	63
1.4.1 Étapes du Pipeline d'analyse des séquences.....	64
1.4.2 Difficultés rencontrées.....	66
1.4.3 Résultats et conclusions.....	68
1.5 Rôle de <i>met-1</i> dans la stabilité du génome.....	69
1.5.1 Contexte des travaux de thèse.....	70
1.5.2 Caractérisation moléculaire de la mutation <i>n4337</i>	72
1.5.3 Caractérisation moléculaire de la mutation <i>tm1738</i>	74
1.5.4 Analyse comparative des deux mutations.....	77
2 Étude du rôle de <i>set-2</i> dans l'organisation de la chromatine de la lignée germinale	81
2.1 Contexte des travaux de thèse.....	81
2.2 Aggravation du phénotype associé à la perte du complexe Condensine II en l'absence de <i>set-2</i>	82
2.3 Un allèle hypomorphe de <i>hcp-6</i> montre la même interaction génétique.....	84
2.3.1 Le double mutant <i>hcp-6; set-2</i> présente une augmentation de l'apoptose.....	88
2.4 L'interaction génétique entre <i>set-2</i> et Condensine II semble être liée à la diminution de la marque H3K4me3.....	92
2.5 Interaction génétique entre <i>top-2</i> et <i>set-2</i> dans la lignée germinale.....	93
2.6 La compaction des noyaux en pachytène est réduite chez le mutant <i>cfp-1</i> et <i>set-2</i>	97
2.7 La fréquence des crossing-overs n'est pas altérée en l'absence de <i>set-2</i>	98
3 Étude du rôle de CFP-1 et SIN-3 dans la lignée germinale.....	100
3.1 Contexte des travaux de thèse.....	100
3.2 Rôle de <i>set-2</i> , <i>cfp-1</i> et <i>sin-3</i> dans l'homéostasie de la lignée germinale.....	100
3.3 Le mutant <i>cfp-1</i> présente des défauts de spermatogenèse.....	102
3.4 Rôle transcriptionnel de <i>set-2</i> , <i>cfp-1</i> et <i>sin-3</i> dans la lignée germinale.....	106
3.4.1 En absence de <i>set-2</i> et <i>sin-3</i> , les transcrits des ovocytes sont surexprimés dans la partie distale de la lignée germinale.....	115

3.4.2 Biais de la répartition des gènes différentiellement exprimés entre autosomes et chromosome X pour les mutants <i>cfp-1</i> et <i>sin-3</i>	116
3.4.3 SIN-3 réprime l'expression des mêmes gènes que MES/PRC2 sur le chromosome X.....	119
3.4.4 Les lignées germinales des mutants <i>sin-3</i> ont une taille réduite.....	120

Partie III – Discussion et perspectives

123

1 Rôle de <i>set-2</i> dans l'organisation de la chromatine dans la lignée germinale...	123
1.1 Modèle fonctionnel pour expliquer l'interaction génétique entre <i>set-2</i> et Condensine II.....	124
1.2 <i>set-2</i> a un effet suppresseur de la létalité embryonnaire du mutant <i>hcp-6(mr17)</i>	126
1.3 Spécificité de l'interaction génétique entre Condensine II et <i>set-2</i>	127
1.4 <i>set-2</i> interagit génétiquement avec <i>top-2</i>	127
1.5 <i>set-2</i> et <i>cfp-1</i> participent à la compaction des chromosomes en pachytène.....	129
2 CFP-1 joue un rôle au cours de la spermatogenèse.....	129
3 Coopération fonctionnelle entre SET-2, CFP-1 et SIN-3 dans la lignée germinale	131
4 Régulation du chromosome X chez les mutants <i>set-2</i> , <i>cfp-1</i> et <i>sin-3</i>	132
4.1 Phénotypes de <i>sin-3</i> et régulation du chromosome X.....	134
4.2 Comment SIN-3 et CFP-1 agissent sur la répression du chromosome X ?.....	134
4.3 Études de la localisation de CFP-1 et SIN-3 dans la lignée germinale : effet direct ou indirect sur le chromosome X ?.....	135
4.4 Effet de <i>cfp-1</i> et <i>sin-3</i> sur les marques d'histone dans la lignée germinale.....	137

Conclusion générale

139

Partie IV – Annexe

140

1 Nombre de variants par lignée pour les expériences d'accumulation de mutations	140
2 Étude phénotypique du mutant <i>met-1(n4337)</i>	142
2.1 L'arrêt du cycle cellulaire du mutant <i>met-1(n4337)</i> est normale après irradiation.....	142
2.2 Apoptose après irradiation du mutant <i>met-1(n4337)</i>	144
3 Étude de la dérégulation des petits ARN chez les mutants <i>set-2</i> et <i>met-1(tm1738)</i>	145
3.1 Les ARN piwi dans la lignée germinale de <i>C. elegans</i>	145

3.2 La voie des ARN 21U est dérégulée chez le mutant <i>met-1 (tm1738)</i> mais pas chez le mutant <i>set-2(bn129)</i>	151
3.3 La voie des ARN 22G n'est pas dérégulée chez les mutants <i>met-1(tm1738)</i> et <i>set-2(bn129)</i> ...	154
3.4 Conclusion.....	156
4 Description des allèles <i>set-2(bn129)</i> , <i>set-2(ok952)</i> , <i>cfp-1(tm6369)</i> et <i>sin-3(tm1276)</i>	157
5 Sauvetage de la stérilité de <i>cfp-1 dpy-13</i> par croisement avec des mâles sauvages	159
6 Résultats de séquençage de l'allèle <i>hcp-6(mr17)</i>	161
7 Niveau de H3K4me3 dans la lignée germinale des mutants <i>set-2(bn129)</i> et <i>set-2(ok952)</i>	162
8 Données de Flim FRET pour le mutant <i>set-2(bn129)</i>	163
9 Modèle de la recombinaison homologue.....	167

Partie V – Matériels et méthodes 168

1 Table des souches.....	168
2 Culture et méthodes usuelles.....	171
2.1 Milieu de culture et maintien.....	171
2.2 Synchronisation des vers.....	171
2.3 Croisement.....	171
2.4 Génotypage par PCR.....	172
2.5 Observations au microscope.....	172
2.5.1 Observations des vers vivants.....	172
2.5.2 Marquage de l'ADN par DAPI.....	172
3 Matériels et méthodes du chapitre 1.....	173
3.1 Étude des transcrits <i>met-1 (tm1738)</i> et <i>met-1 (n4337)</i>	173
3.2 Analyse bioinformatique des données <i>msh-6</i> et <i>polh-1</i>	173
3.3 Estimation du nombre de descendants.....	174
3.4 Sensibilité aux irradiations au stade L4.....	174

3.5 Essai de réversion <i>unc-93</i> et <i>unc-22::Tc1</i>	175
3.6 Mortal germline.....	175
4 Matériels et méthodes du chapitre 2.....	175
4.1 ARN interférence.....	175
4.1.1 Génotypage des bactéries.....	175
4.1.2 préparation des boites et culture ARNi.....	176
4.2 Acridine Orange (AO).....	176
4.3 Comptage des défauts de lignée germinale du mutant <i>top-2</i>	177
4.4 Détermination de la fréquence de recombinaison.....	177
4.5 Estimation du nombre de descendants et de la létalité embryonnaire.....	178
4.6 Étude des niveaux de transcrit <i>kle-2</i> et <i>capg-1</i> par RT qPCR.....	179
4.6.1 Extraction d'ARN.....	179
4.6.2 RT et qPCR.....	179
4.7 DAPI sur gonades disséquées.....	180
4.8 Flim Fret.....	180
4.9 Arrêt du développement embryonnaire.....	180
5 Matériels et méthodes du chapitre 3.....	180
5.1 Extraction d'ARN de gonades isolées.....	180
5.2 Analyse bioinformatique.....	181
5.3 Analyse des termes d'onthologie.....	182
5.4 Établissement des listes de gènes dérégulés chez les mutants <i>mes-2</i> et <i>mes-4</i>	182
5.5 Immunomarquage de SIN-3.....	182
5.6 Spermatogenèse.....	183
5.7 Estimation du nombre de descendants et de la létalité embryonnaire.....	184
6 Matériels et méthodes des Annexes.....	184
6.1 Apoptose et Arrêt du cycle cellulaire.....	184
6.2 Étude de la dérégulation des petits ARN.....	184
6.3 Séquençage du gène <i>hcp-6</i>	184
6.4 Immunomarquage de H3K4me3.....	185
7 Ressources.....	185

Bibliographie

190

Index des figures

Figure 1 Organisation de la chromatine interphasique dans le noyau.....	10
Figure 2 Organisation hiérarchique du génome en interphase.....	12
Figure 3 Modèle de formation des chromosomes mitotiques.....	15
Figure 4 Schéma des complexes Condensines.....	16
Figure 5 Modèle de contribution des Condensine I et II à l'architecture des chromosomes mitotiques.....	17
Figure 6 Modèle d'extrusion de boucles d'ADN par les Condensines.....	18
Figure 7 Modèle d'action de Condensine I et II, Cohésine et Topoisomérase II.....	21
Figure 8 Exemples de modifications post-traductionnelles de la queue des histones H2A, H2B, H3 et H4.	23
Figure 9 Cycle de vie de <i>C. elegans</i> à 20°C.....	34
Figure 10 Principales caractéristiques anatomiques et morphologiques d'un adulte hermaphrodite ou mâle.	35
Figure 11 Développement de la lignée germinale.....	37
Figure 12 Régulation de la mitose et de la transition vers la méiose chez l'adulte.....	39
Figure 13 Étape de la méiose dans la lignée germinale.....	41
Figure 14 Réorganisation structurale des chromosomes homologues depuis le stade pachytène jusqu'à la diakinèse.....	43
Figure 15 Défauts de ségrégation des chromosomes en méiose I et II chez le mutant thermosensible <i>hcp-6(mr17)</i> (Condensine II).....	44
Figure 16 Structure monocentrique des chromosomes de vertébrés et holocentrique des chromosomes de <i>C. elegans</i>	45
Figure 17 Organisation de la chromatine chez l'homme, la drosophile et <i>C. elegans</i>	47
Figure 18 Composition des complexes SET-2/SET1 et SET-16/MLL chez <i>C. elegans</i>	48
Figure 19 Stratégie de régulation du chromosome X chez l'hermaphrodite adulte.....	51
Figure 20 Répartition des marques d'histones sur les autosomes et le chromosome X dans les différentes régions de la lignée germinale.....	53
Figure 21 Distribution génomique de MES-4, H3K36me3 et H3K27me3.....	54
Figure 22 Modèle de régulation du chromosome X par les protéines MES.....	55
Figure 23 Représentation schématique du phénotype de stérilité progressive (<i>mrt</i>).....	57
Figure 24 Pipeline d'analyse des données de séquençage.....	65
Figure 25 Qualité des bases le long des séquences.....	67
Figure 26 Nombre de SNPs, Insertions et délétions par génération après utilisation de différents filtres.....	69
Figure 27 Sensibilité des mutants d'histone méthyltransférase aux irradiations.....	72
Figure 28 Caractérisation de la séquence génomique de l'allèle <i>n4337</i>	73
Figure 29 Caractérisation de la séquence génomique et codante de l'allèle <i>tm1738</i>	76
Figure 30 Sensibilité après irradiation aux rayons X des mutants <i>met-1(n4337)</i> et <i>met-1(tm1738)</i>	77
Figure 31 Le nombre de descendants est réduit chez le mutant <i>met-1(tm1738)</i>	79
Figure 32 Défauts de ségrégation chromosomique des cellules intestinales.....	81
Figure 33 Aggravation du phénotype associé à la perte de Condensines II en absence de <i>set-2</i>	83
Figure 34 L'allèle hypomorphique de <i>hcp-6</i> interagit génétiquement avec le mutant <i>set-2</i>	86
Figure 35 Le développement embryonnaire est arrêté plus tardivement chez les embryons <i>hcp-6;set-2</i>	88
Figure 36 Augmentation de l'apoptose dans le double mutant <i>hcp-6;set-2</i>	91
Figure 37 L'interaction génétique avec Condensine II semble être liée à la diminution de la marque H3K4me3.....	93
Figure 38 Interaction génétique entre <i>top-2</i> et <i>set-2</i> dans la lignée germinale.....	96
Figure 39 Réduction de la compaction de la chromatine dans les noyaux pachytènes chez le mutant <i>cfp-1</i>	98
Figure 40 Nombre de descendants et létalité embryonnaire.....	101
Figure 41 Défauts de spermatogenèse du mutant <i>cfp-1</i>	104
Figure 42 Transcriptomique des lignées germinales des mutants <i>set-2</i> , <i>cfp-1</i> et <i>sin-3</i>	109
Figure 43 Un sous-ensemble de gènes est positivement régulé par <i>set-2</i> , <i>cfp-1</i> et <i>sin-3</i>	112
Figure 44 Analyse en termes d'ontologie.....	114
Figure 45 Surreprésentation de catégories de gènes parmi les gènes différentiellement exprimés.....	116
Figure 46 Répartition des gènes différentiellement exprimés le long du génome.....	118

Figure 47 Diagrammes 3 à 3 entre les gènes liés à l'X surexprimés chez les mutants <i>mes</i> , <i>set-2</i> , <i>cfp-1</i> et <i>sin-3</i>	120
Figure 48 Localisation de la protéine SIN-3 dans la lignée germinale.....	121
Figure 49 L'arrêt du cycle cellulaire est fonctionnel chez les mutants <i>met-1</i>	143
Figure 50 L'apoptose est normale chez le mutant <i>met-1</i> (n4337).....	144
Figure 51 Voie de reconnaissance du soi et du non-soi par les petits ARN.....	148
Figure 52 Contrôle de l'expression des gènes par les voies HRDE-1 et CSR-1.....	149
Figure 53 MET-1 est requis pour la répression du transgène senseur par les ARN 21U.....	152
Figure 54 MET-1 est requis pour la répression du transgène senseur par les ARN 21U à 25°C de façon transgénérationnelle.....	153
Figure 55 MET-1 et SET-2 ne sont pas requises pour la répression du transgène senseur par les ARN 22G.....	155
Figure 56 Représentation des gènes et protéines de <i>set-2</i> , <i>cfp-1</i> et <i>sin-3</i> et des mutations utilisées dans cette étude.....	159
Figure 57 Nombre de descendants issus du croisement d'hermaphrodites <i>cfp-1 dpy-13</i> avec des mâles sauvages.....	161
Figure 58 Reséquençage de la mutation <i>mr17</i> du gène <i>hcp-6</i>	162
Figure 59 Niveau de H3K4me3 dans les lignées germinales des mutants <i>set-2</i> (bn129) et <i>set-2</i> (ok952)....	163
Figure 60 SET-2 est impliquée dans la compaction de la chromatine.....	166
Figure 61 Modèle de la recombinaison homologue.....	167
Figure 62 Schéma de croisement pour déterminer la fréquence de recombinaison entre <i>dpy-13</i> et <i>unc-5</i> .	178

Index des tableaux

Tableau 1 Histone-lysine méthyltransférases et histone déméthylases chez <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. elegans</i> et les mammifères. Adapté de (Ahringer and Gasser, 2018; Ang et al., 2011; Mozzetta et al., 2015) et Wormbase	24
Tableau 2 Histone acétyltransférases et histone déacétylases chez <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. elegans</i> , et les mammifères. Adapté de (Seto and Yoshida, 2014; Yang and Seto, 2008) et Wormbase	26
Tableau 3 Essai de réversion <i>unc-22::Tc1</i>	78
Tableau 4 mrt à 25°C des mutants <i>met-1(n4337)</i> et <i>met-1(tm1738)</i>	79
Tableau 5 La fréquence de recombinaison entre les loci <i>unc-5</i> et <i>dpy-13</i> chez le mutant <i>set-2</i> n'est pas altérée	99
Tableau 6 Pourcentage d'animaux présentant une absence de spermatozoïdes chez le mutant <i>cfp-1(tm6369)</i> à 20°C et 25°C	102
Tableau 7 Sauvetage de la stérilité de <i>cfp-1(tm6369) dpy-13(e184)</i> par croisement avec des mâles sauvages	106
Tableau 8 Nombre de variants bruts par lignée pour les données d'accumulation de mutations : <i>set-2</i>	140
Tableau 9 Nombre de variants bruts par lignée pour les données d'accumulation de mutations : <i>polh-1</i> et <i>msh-6</i>	140
Tableau 10 Nombre de variants filtrés avec une qualité supérieure à 10 par lignée pour les données d'accumulation de mutations : <i>set-2</i>	140
Tableau 11 Nombre de variants filtrés avec une qualité supérieure à 10 par lignée pour les données d'accumulation de mutations : <i>polh-1</i> et <i>msh-6</i>	141
Tableau 12 Nombre de variants filtrés avec une fréquence supérieure à 80 par lignée pour les données d'accumulation de mutations : <i>set-2</i>	141
Tableau 13 Nombre de variants filtrés avec une fréquence supérieure à 80 par lignée pour les données d'accumulation de mutation : <i>polh-1</i> et <i>msh-6</i>	141
Tableau 14 Tableau des souches utilisées	168
Tableau 15 Données de transcriptomique réalisées sur les mutants <i>mes</i> dans la lignée germinale	182

Partie I – Introduction

Le terme épigénétique du grec « epi » qui signifie « sur » ou « dessus » réfère, dans sa définition initiale, aux processus qui permettent le développement, à partir de l'information génétique présente dans un zygote, d'un organisme complexe composé d'une grande variété de types cellulaires (Felsenfeld, 2014; Waddington, 1953). Aujourd'hui, il est acquis que cette diversité cellulaire est obtenue à partir de l'expression différenciée et spécifique à chaque type cellulaire de l'unique information génétique contenue dans le zygote. Dans sa définition actuelle, le terme épigénétique réfère, plus précisément, à l'étude des mécanismes responsables de modifications réversibles de la lecture du génome et qui n'affectent pas la séquence primaire de l'ADN (Riggs and Porter, 1996; Riggs et al., 1996). Un des enjeux de la biologie est de comprendre comment l'architecture du génome et les mécanismes épigénétiques interagissent pour assurer l'expression correcte des gènes et le maintien de l'intégrité du génome et de sa structure, au cours des divisions cellulaires et des générations.

1 Organisation de la chromatine à différents niveaux

La chromatine désigne le complexe nucléoprotéique formé par l'ADN, des protéines histones et non-histones et des ARN associés. C'est la structure qui permet de compacter l'ADN au sein de l'espace limité du noyau des Eucaryotes.

1.1 Architecture des chromosomes en interphase

1.1.1 Nucléosomes et fibre chromatinienne

Les protéines les plus abondantes de la chromatine sont les histones et permettent l'empaquetage de l'ADN dans le noyau des cellules eucaryotes. L'ADN s'enroule sur 146 paires de bases autour d'un octamère d'histones composé de deux copies des quatre histones dits de « cœur » (H2A, H2B, H3 et H4), l'ensemble forme l'unité de base de la chromatine : le nucléosome (Kornberg, 1974). Les histones de cœur sont hautement conservées dans toutes les espèces eucaryotes. La succession des nucléosomes, positionnés à intervalle d'environ 200pb sur un brin d'ADN, constitue la fibre chromatinienne en « collier de perle » de 11 nm de diamètre (Figure 1) (Locklear et al., 1990). Ceci compose le premier niveau de compaction de la chromatine. Une

protéine histone additionnelle H1 ou « linker », participe à l'organisation supérieure de la fibre de chromatine en se liant aux nucléosomes.

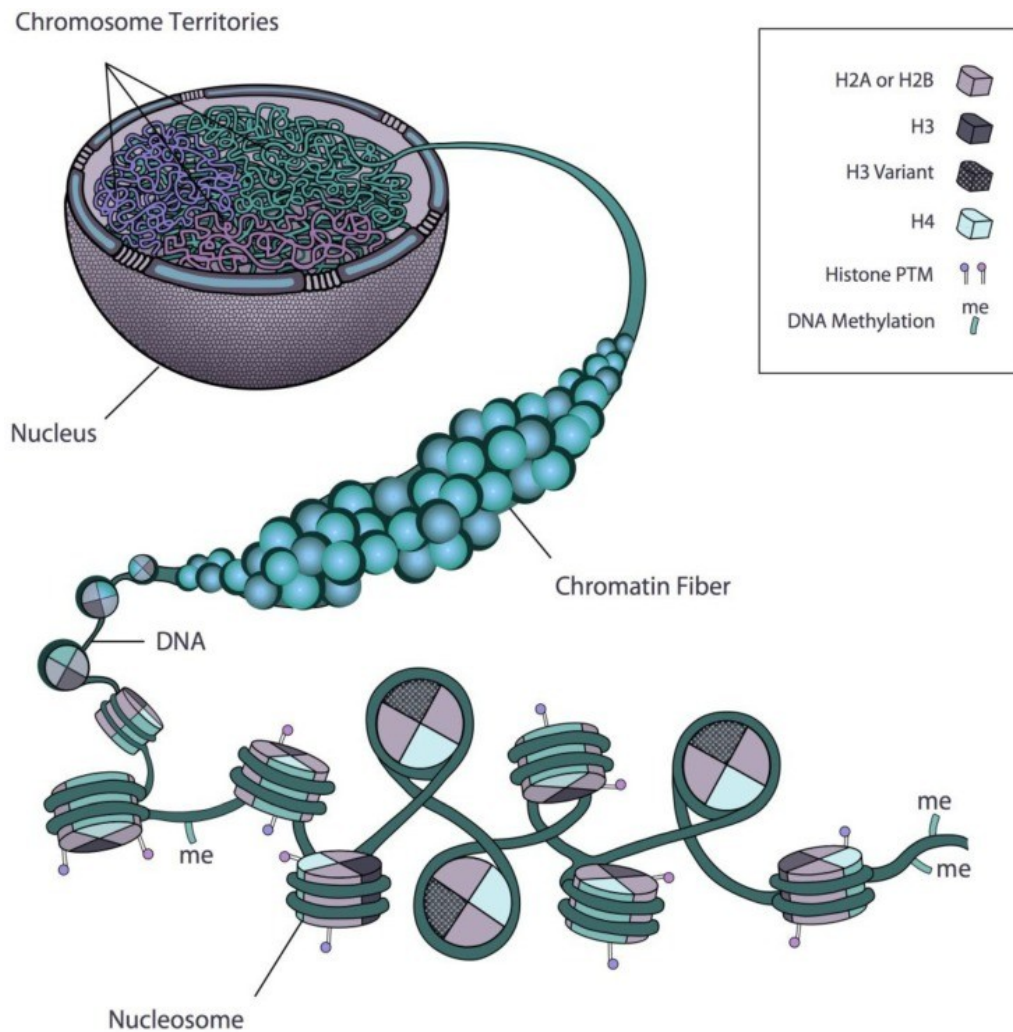


Figure 1 | Organisation de la chromatine interphasique dans le noyau

L'ADN entouré autour d'un octamère d'histones forme le nucléosome, l'unité de base de la chromatine. La fibre chromatinienne est composée de structures secondaires formées par l'arrangement des nucléosomes entre eux. Dans le noyau les chromosomes occupent des territoires distincts. D'après (Rosa and Shaw, 2013)

Il est proposé qu'un niveau de compaction secondaire existe sous la forme d'une fibre de 30 nm de diamètre. Plusieurs modèles existent pour décrire sa structure et sa formation (Robinson et al., 2006; Schalch et al., 2005; Song et al., 2014). L'arrangement des nucléosomes dans cette fibre reste inconnu, l'existence même de la fibre de 30 nm est remise en question (Fussner et al., 2011; Grigoryev and Woodcock, 2012; Joti et al., 2012; Maeshima et al., 2019; Razin and Gavrillov, 2014). Il est possible que plusieurs structures de la chromatine co-existent dans une cellule selon le

cycle cellulaire, le type de tissu ou la région du chromosome (Kruithof et al., 2009; Scheffer et al., 2011).

1.1.2 Les interactions locales de la chromatine

À petite échelle (de l'ordre de quelques kilobases), la chromatine est capable de former des interactions à longue distance dans lesquelles deux segments d'ADN sont rapprochés pour former une boucle. Les promoteurs interagissent avec d'autres séquences régulatrices via des interactions protéiques directes (Bulger and Groudine, 2011). Différents types de boucles existent qui rapprochent les promoteurs d'autres séquences régulatrices telles que les enhanceurs, les promoteurs, les terminateurs. Ces boucles ont pour rôle de réguler la transcription d'un gène ou de plusieurs gènes en mettant en contact leurs séquences régulatrices. Ces boucles sont souvent médiées par des facteurs de transcription, dont la protéine CTCF (CCTCF-binding Factor) qui agit conjointement avec le complexe de Cohésine (voir ci-dessous).

1.1.3 L'organisation de la chromatine au niveau intermédiaire

À l'échelle intermédiaire, la fibre de chromatine s'organise en domaines topologiques appelés TAD (Topologically Associated Domains) (pour revue (Dixon et al., 2016)). Les régions d'ADN d'un TAD sont plus à même d'être proches les unes des autres que de régions d'ADN en dehors du TAD considéré (Figure 2). La taille des TAD est de l'ordre de 100 kilobases et est stable dans le temps (à l'exception de la mitose) et entre les types cellulaires. Les gènes au sein d'un même TAD tendent à avoir une dynamique d'expression coordonnée au cours du processus de différenciation. Cela suggère que les TAD ont un rôle dans la coordination de l'expression des gènes adjacents (Bonev and Cavalli, 2016; Szalaj and Plewczynski, 2018). Les TAD possédant une activité transcriptionnelle similaire tendent à se regrouper pour former des compartiments (voir ci-après). La protéine CTCF et le complexe Cohésine sont responsables de cette organisation en TAD et ont une fonction insulatrice en séparant des domaines d'activités transcriptionnelles différentes (Herold et al., 2012). Cependant, cette organisation n'est pas conservée chez tous les eucaryotes. Par exemple, les TAD ne sont pas présents chez *Arabidopsis thaliana* (Crane et al., 2015; Gabdank et al., 2016; Liu et al., 2016; Wang et al., 2015a). Les premières observations faites chez *C. elegans*, montraient que seul le chromosome X des cellules somatiques présentait des TAD associés à la répression de ce chromosome par le complexe Condensine I^{DC} (Dosage Compensation) (Crane et al., 2015). Des expériences plus récentes montrent qu'il existe bien une organisation en TAD sur les

autosomes (Huang et al., 2018). De manière intéressante, le génome de *C. elegans* ne contient pas de gène codant CTCF (Heger et al., 2009). L'absence de CTCF chez *C. elegans* et chez les espèces du même clade correspond à l'apparition de gènes organisés en opéron (15 % des gènes chez *C. elegans*) (Heger et al., 2009). L'organisation transcriptionnelle en opéron semble avoir surpassée l'organisation d'unités transcriptionnelles par CTCF.

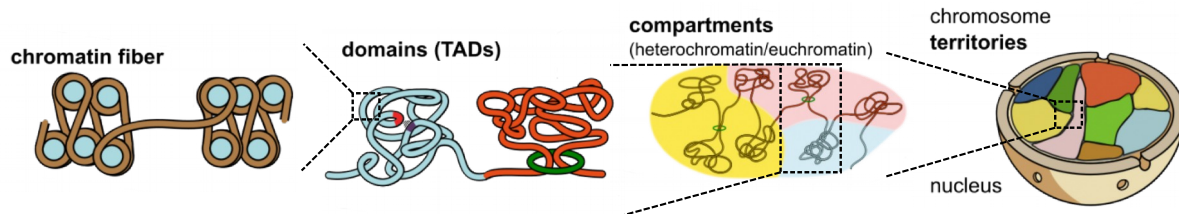


Figure 2| Organisation hiérarchique du génome en interphase

La fibre chromatinienne s'organise en régions qui interagissent préférentiellement entre elles, nommées TAD. Ces TAD sont délimités par l'action de Cohésine et CTCF (anneau vert). Les TAD s'associent à d'autres domaines aux propriétés similaires pour former des compartiments d'hétérochromatine ou d'euchromatine. A plus grande échelle, les chromosomes occupent des territoires distincts en interphase. Figure adaptée de schalchlab.org

1.1.4 L'organisation de la chromatine à large échelle

La chromatine est divisée en deux catégories morphologiques et fonctionnelles distinctes : l'euchromatine et l'hétérochromatine. Ces catégories réfèrent à des états de compaction différents de la chromatine dans le noyau, visibles par microscopie électronique (Passarge, 1979). Ces deux états sont également associés à des états transcriptionnels différents. L'euchromatine désigne une chromatine « ouverte » peu compacte et considérée comme accessible à la machinerie de transcription. À l'inverse, l'hétérochromatine est dite « fermée » : elle est très compacte et silencieuse du point de vue de l'expression des gènes (Sun et al., 2001). La localisation de ces deux types de chromatine est différente dans le noyau : l'hétérochromatine est périphérique tandis que l'euchromatine est interne (DeRisi et al., 1997; de Nooijer et al., 2009; Solovei et al., 2004). L'hétérochromatine est subdivisée en deux types : l'hétérochromatine constitutive et facultative. La première correspond aux télomères et aux régions péricentromériques des chromosomes dont le maintien de la compaction est essentiel pour la ségrégation des chromosomes en mitose. L'hétérochromatine facultative contient les gènes réprimés au cours du développement, son état peut changer selon les signaux développementaux et environnementaux (Trojer et al., 2007). De

nombreux facteurs moléculaires contribuent à la formation des 2 types de chromatine (voir partie 2.4).

Récemment les techniques de capture de la chromatine ont montré que chaque chromosome pouvait être subdivisé en deux compartiments : A et B. Les loci présents dans un compartiment interagissent de manière préférentielle avec les loci du même compartiment et évitent les interactions avec l'autre compartiment (Lieberman-Aiden et al., 2009; Rao et al., 2014). Alors que les TAD sont invariants, les compartiments A et B ne le sont pas et les TAD qui les composent changent d'un type cellulaire à l'autre (Lieberman-Aiden et al., 2009; Rao et al., 2014). La taille des compartiments A et B est de l'ordre de la mégabase, ils ressemblent très fortement à l'euchromatine et l'hétérochromatine concernant leur compaction, l'expression génique et d'autres caractéristiques (Gibcus and Dekker, 2013; Solovei et al., 2016). Pour unifier les différents modèles décrivant la compartimentation de la chromatine, il a été proposé que l'euchromatine correspond au compartiment A et l'hétérochromatine au compartiment B (Dong et al., 2017; Gibcus and Dekker, 2013; Solovei et al., 2016).

En plus de la distinction du niveau de compaction de la chromatine, un niveau d'organisation supplémentaire concerne les chromosomes. Ceux-ci occupent dans le noyau des territoires distincts (Figure 1 et 2) (Cremer and Cremer, 2010; Lau et al., 2016; Nabeshima et al., 2011). Cette hypothèse a pu être vérifiée par des techniques de FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) (Manuelidis, 1985) et plus tard par les techniques de capture de la chromatine (3C, 4C, HiC et autres dérivés). Ces nouvelles techniques d'analyse des interactions chromatinienne ont permis de montrer que les régions d'un chromosome s'associent préférentiellement entre elles (Simonis et al., 2006). Cette organisation non aléatoire pourrait influencer la fonction du génome et notamment l'expression des gènes (Bacher et al., 2006).

1.2 Architecture des chromosomes en mitose

En interphase, les chromosomes sont relativement décondensés et acquièrent une organisation spatiale spécifique au type cellulaire. Lors de la progression des cellules en mitose, les chromosomes subissent un remodelage important menant à un très fort degré de compaction, afin de permettre l'individualisation des chromosomes et la séparation des chromatides sœurs. Les chromosomes vont apparaître sous forme de « bâtonnets » ou de « cylindres » individualisés. La mitose se déroule en plusieurs étapes qui ont été décrites pour la première fois par Walther

Flemming (Flemming, 1965). Ces étapes comprennent la prophase (réorganisation et condensation de la chromatine pour former des chromosomes longilignes), la pro-métaphase (rupture de l'enveloppe nucléaire, raccourcissement des chromosomes et attachement des chromosomes au fuseau mitotique), la métaphase (les chromosomes sont très condensés et s'alignent sur la plaque métaphasique), l'anaphase (c'est l'étape où les chromosomes sont les plus condensés (Mora-Bermúdez et al., 2014), la cohésion entre les chromatides sœurs est rompue), et la télophase (migration des chromosomes aux pôles opposés de la cellule et formation de deux cellules filles après la cytokinèse).

1.2.1 Formation des chromosomes mitotiques

Afin d'expliquer le changement de conformation drastique de la chromatine en chromosomes individuels cylindriques, plusieurs modèles ont été proposés. Le premier prévoit, la condensation des chromosomes par le repliement de la fibre chromatinienne en structures secondaires de plus en plus complexes (Felsenfeld and Groudine, 2003; Moraru and Schalch, 2019). Un second modèle, propose la mise en place d'un axe central et la formation de boucles de chromatine autour de cet axe (Kschonsak and Haering, 2015).

Récemment, l'étude de Gibcus *et al.* (2018), unifie les observations réalisées jusqu'à présent. Par des approches de capture de la chromatine et de microscopie, les auteurs ont montré que dans les cellules de poulet synchronisées DT40, l'organisation en compartiment et en TAD est perdue à l'entrée en mitose. À la place, des boucles de chromatine consécutives sont formées. La base de ces boucles forme un axe hélicoïdal central dont la structure est dynamique. Au cours de la progression de la pro-métaphase, l'axe s'enroule sur lui-même, le nombre et la taille des boucles augmentent pour former des chromosomes cylindriques (Figure 3) (Gibcus et al., 2018). Ce processus fait intervenir quatre complexes acteurs protéiques conservés : Condensine I et II (présentés ci-après), Cohésine et l'homodimère topoisomérase II (présenté ci-après). Condensine II forme les boucles centrales et constitue l'axe central (Gibcus et al., 2018; Walther et al., 2018). Condensine I forme des boucles de chromatine à l'intérieur des boucles formées par Condensine II (Gibcus et al., 2018). Cohésine maintient les chromatides sœurs appariées jusqu'en métaphase (Michaelis et al., 1997; Uhlmann and Nasmyth, 1998). Enfin la topoisomérase II est requise pour la compaction axiale et la résolution des chromatides sœurs (Uemura et al., 1987).

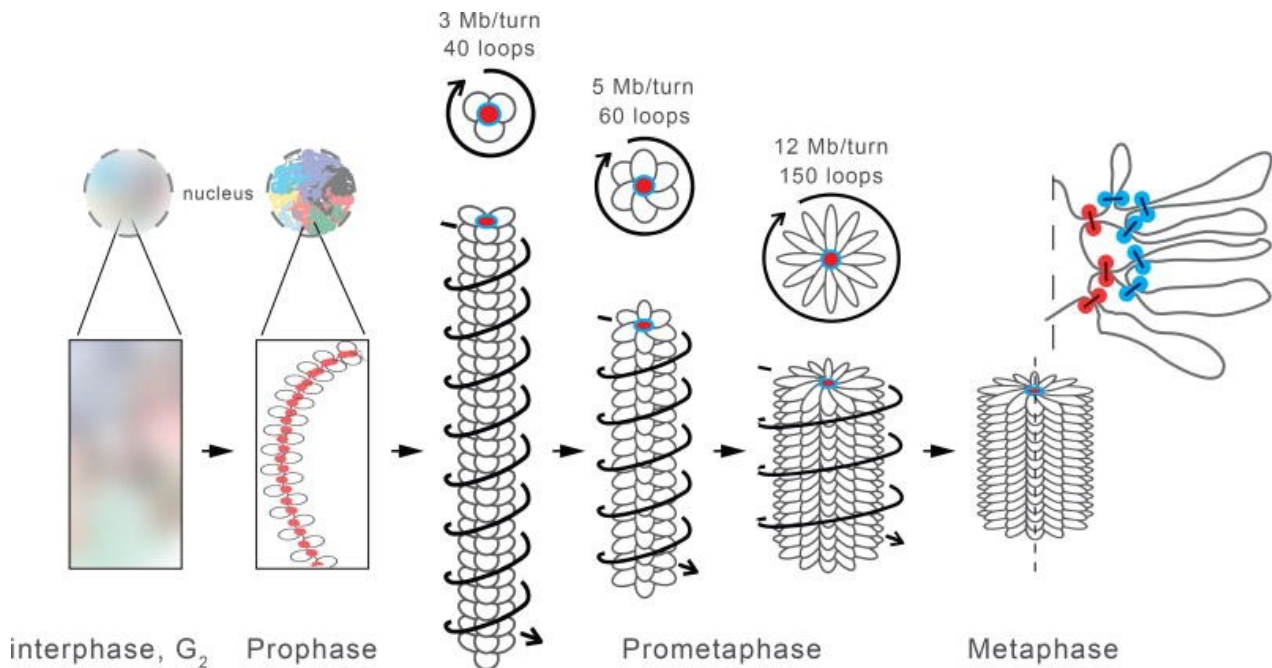


Figure 3|Modèle de formation des chromosomes mitotiques

En prophase, Condensine II compacte les chromosomes en boucles consécutives. L'axe défini par la base des boucles construites par Condensine II est indiqué en rouge. Au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire en prométaphase, les boucles de chromatine créées par Condensine II deviennent plus larges puis sont subdivisées en plus petites boucles par Condensine I (bleu). Haut : coupe latérale des chromosomes. Bas : vue longitudinale des chromosomes. Pour plus de clarté, les chromosomes sont représentés par une série de boucles pointant dans une direction ce qui n'est pas le cas en réalité. En prométaphase, l'axe central acquiert une forme hélicoïdale avec des boucles qui tournent autour de cet axe (flèches). Au cours de la progression en prométaphase, les boucles externes s'agrandissent, le nombre de boucles par tour augmente, et les chromosomes se raccourcissent pour former un chromosome mitotique cylindrique en métaphase. Figure tirée de (Gibcus et al., 2018).

1.2.2 Les complexes Condensine I et II et leurs propriétés

Les complexes Condensine sont hautement conservés de la bactérie à l'homme, et jouent un rôle fondamental pour l'organisation structurale du génome. Ils comprennent deux sous-unités *smc* (structurale maintenance of chromosome) qui ont une activité ATPase et une sous-unité klésine qui forme avec les *smc* une structure en anneau (Kinoshita et al., 2015). Enfin, deux sous-unités régulatrices à répétitions HEAT (Huntingtin Elongation factor 3 Protein phosphatase 2A TOR1) viennent s'ajouter pour former le complexe Condensine. Les eucaryotes supérieurs possèdent généralement deux complexes Condensine : I et II. Ces deux complexes possèdent les mêmes sous-unités SMC2/4 mais diffèrent par leurs sous-unités régulatrices qui leur confèrent leur localisation

et leur spécificité (CAP-H, CAP-D2 et CAP-G pour Condensine I ; CAP-H2, CAP-D3 et CAP-G2 pour Condensine II) (Figure 4).

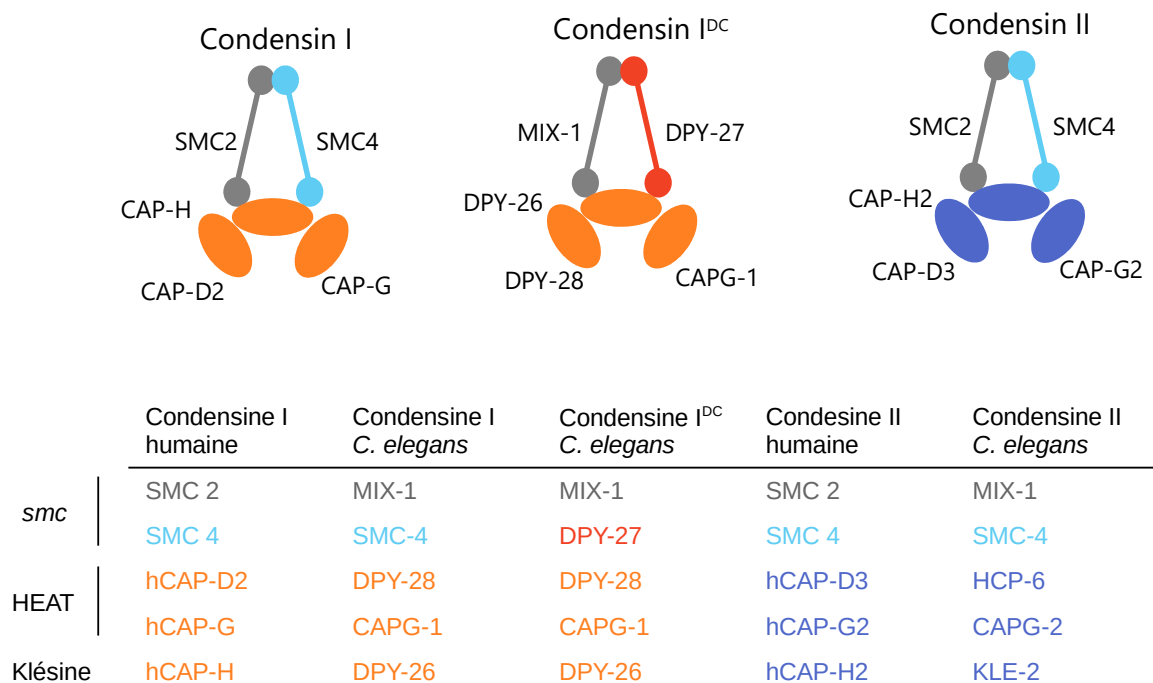


Figure 4| Schéma des complexes Condensines

Les complexes Condensine I et II ont les mêmes sous-unités *smc* (SMC2 et 4) et varient par leurs sous-unités klésine et à domaine HEAT. Le complexe Condensine I^{DC} spécifique de *C. elegans* possède les mêmes sous-unités que Condensine I à l'exception de SMC-4 qui est remplacée par la protéine *smc* DPY-27. Les protéines présentes dans les complexes de mammifères et de *C. elegans* sont présentées dans le tableau.

Condensine II est nucléaire, et se concentre sur les chromosomes en prophase (Gerlich et al., 2006; Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004). À l'inverse, Condensine I est cytoplasmique et se localise sur les chromosomes après la rupture de l'enveloppe nucléaire en pro-métaphase (Gerlich et al., 2006; Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004). Condensine II précède donc Condensine I sur les chromosomes en mitose. En accord avec une localisation distincte de ces deux complexes, Condensines I et II participent à des aspects différents de la condensation des chromosomes : Condensine II initie la condensation des chromosomes en participant à leur compaction axiale, tandis que Condensine I compacte latéralement les chromosomes (Green et al., 2012; Hirota et al., 2004; Ono et al., 2003, 2004). Ainsi l'absence de Condensine II résulte en la formation de chromosomes allongés, tandis qu'en l'absence de Condensine I, les chromosomes formés sont élargis (Figure 5).

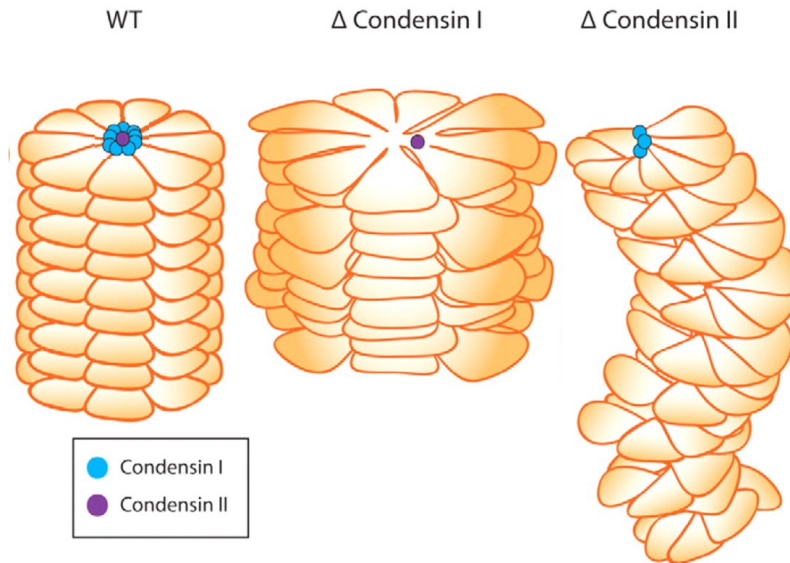


Figure 5| Modèle de contribution des Condensine I et II à l'architecture des chromosomes mitotiques

En absence de Condensine I, la compaction latérale n'est plus assurée, Condensine II assure la compaction axiale des chromosomes. A l'inverse, en absence de Condensine II, la compaction axiale ne s'opère pas et Condensine I assure une compaction latérale. Figure adaptée de (Green et al., 2012)

Les Condensines I et II sont à l'origine des boucles de chromatine qui permettent la condensation des chromosomes en mitose. Le modèle actuel de formation de ces boucles est le modèle « d'extrusion de boucles », dans lequel, Condensine organiserait la chromatine en faisant passer des boucles de chromatine par leur anneau et les agrandirait de manière processive (Nasmyth, 2001). Récemment une étude a montré *in vitro* cette activité d'extrusion de boucles sur de l'ADN nu en utilisant le complexe de Condensine purifié de la levure, en présence d'ATP et de Mg^{2+} (Figure 6) (Ganji et al., 2018).

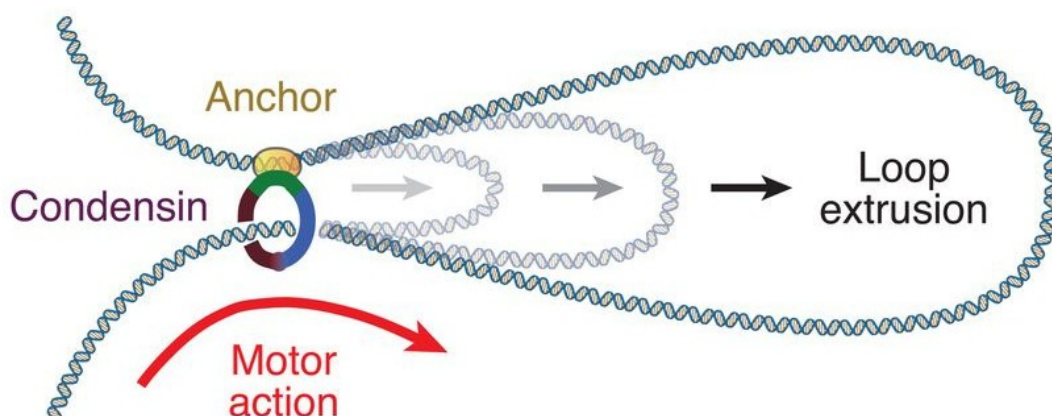


Figure 6 | Modèle d'extrusion de boucles d'ADN par les Condensines

Condensine s'ancore sur l'ADN, une action motrice permettrait de former et d'agrandir la boucle d'ADN par l'hydrolyse de l'ATP. Figure adaptée de (Ganji et al., 2018)

Cette expérience a été réalisée en utilisant un ADN nu dépourvu de nucléosomes. La question se pose de savoir comment les condensines s'accommodent de la présence des nucléosomes. Des expériences de reconstitution de la chromatine *in vitro*, montrent que condensine est capable de former des chromosomes en absence des nucléosomes (Shintomi et al., 2015). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, plusieurs gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine et dans l'acétylation des nucléosomes, ont été identifiés comme des interacteurs facilitant l'association de Condensine à la chromatine (Robellet et al., 2014; Toselli-Mollereau et al., 2016). Ces deux classes de protéines influencent la stabilité des nucléosomes, leur absence mène à l'augmentation de l'occupation de l'ADN par les nucléosomes et à la diminution du recrutement de Condensine (Robellet et al., 2014; Toselli-Mollereau et al., 2016). Il semblerait donc que les nucléosomes constituent une barrière à l'association des condensines avec l'ADN (Robellet et al., 2017). Dans les expériences de reconstitution de la chromatine *in vitro*, la présence des nucléosomes est pourtant nécessaire pour atteindre le plus haut degré de compaction des chromosomes (Shintomi et al., 2015). D'autres expériences montrent des interactions physiques entre les condensines et les histones (Ball et al., 2002; Liu et al., 2010; Tada et al., 2011; Yuen et al., 2017). Notamment, hCAP-D2 (Condensine I) possède un domaine de reconnaissance de l'histone H1 et de la queue de l'histone H3 (Ball et al., 2002), hCAP-D3 (Condensine II) reconnaît l'histone H4 mono-méthylé sur la lysine 20 (Liu et al., 2010). Chez l'homme et la levure la sous-unité klésine (Condensine I) interagit avec le variant d'histone H2AZ. Plus récemment, il a été montré que la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 aide à l'ancrage de Condensine II sur l'ADN dans les cellules de mammifères (Yuen et al., 2017). Des expériences de ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)

montrent que l'association à la chromatine des condensines se fait dans des régions pauvres en nucléosomes, mais également au niveau des gènes fortement transcrits (aux sites d'initiation de la transcription (TSS) et aux promoteurs). De plus, le profil d'association à la chromatine de Condensine II se superpose à celui de H3K4me3 chez plusieurs espèces dont *C. elegans* (Kranz et al., 2013; Yuen et al., 2017). L'importance des marques d'histones et de la mobilité des nucléosomes pour la fonction de Condensine *in vivo* reste une question ouverte.

Chez *C. elegans*, un complexe Condensine supplémentaire existe, il s'agit de Condensine I^{DC} pour « Dosage Compensation ». Ce complexe agit dans le soma et réprime, par deux, les gènes liés à l'X chez l'hermaphrodite. Condensine I^{DC} partage toutes les sous unités de Condensine I mis à part la sous-unité SMC-4 qui est remplacée par la sous-unité spécifique de ce complexe DPY-27 (Figure 4) (Csankovszki et al., 2009). Cette sous-unité est exprimée uniquement dans le soma et confère ainsi la spécificité somatique de ce complexe. La répression du chromosome X par Condensine I^{DC}, se fait par sa fixation au niveau de séquences spécifiques *rex* (recruitment element on X) présentes sur l'X (McDonel et al., 2006). Le complexe Condensine I^{DC} recrute alors des effecteurs DPY-30, DPY-21, SDC-1/2/3, pour former le complexe DCC (Dosage Compensation Complexe) (Strome et al., 2014). Ce complexe s'étend sur le chromosome X et fait intervenir la déméthylase DPY-21 qui déméthyle la marque H4K20me2 en H4K20me1 (Brejc et al., 2017). Cette dernière joue un rôle dans la compaction de la chromatine chez *C. elegans* et les vertébrés (Kohlmaier et al., 2004; Vielle et al., 2012). Le mécanisme complet de répression du X par le DCC n'est pas entièrement connu (Meyer, 2010; Strome et al., 2014).

1.2.3 La Topoisomérase II

Le changement de conformation de la chromatine lors de la mitose et d'autres processus cellulaires comme la réplication ou la transcription, induisent un sur-enroulement de l'ADN double brin qui crée un stress topologique. Les topoisomérases permettent de résoudre ces difficultés en introduisant une cassure momentanée dans l'ADN. Cette cassure permet d'induire un changement dans la topologie de l'ADN et d'éliminer le sur-enroulement. Deux types de topoisomérase existent : les topoisomérases I qui introduisent une cassure simple brin et les topoisomérases II qui introduisent une cassure double brin (Champoux, 2001; Wang, 1998). Les topoisomérases II jouent un rôle essentiel lors de la mitose. En effet, elles sont capables de réaliser une cassure double brin et de faire passer un autre brin d'ADN par cette cassure puis de la refermer (Wang, 1998). Ce passage de brin est essentiel pour la séparation des chromatides sœurs en mitose. Les topoisomérases II sont

des homodimères, hautement conservées. Deux topoisomérases II existent chez les vertébrés (TOPO II α et β) et chez *C. elegans* (*top-2* et *cin-4*). Il est à noter que CIN-4 a perdu son activité de passage de brins d'ADN (Stanvitch and Moore, 2008). TOPO II α se localise au niveau de l'axe des chromosomes en mitose (Maeshima and Laemmli, 2003). La déplétion de TOPO II α dans les cellules de poulet résulte en des chromosomes allongés en métaphase, TOPO II α est donc requise pour la compaction axiale des chromosomes (Samejima et al., 2012). La contribution de la topoisomérase II à la compaction axiale n'est pas encore complètement expliquée. Un modèle possible est que la topoisomérase II introduit un enchevêtrement (ou « self-entanglements ») dans une même molécule d'ADN qui permettrait la compaction axiale des chromosomes (Figure 7) (Bauer et al., 2012; Kawamura et al., 2010).

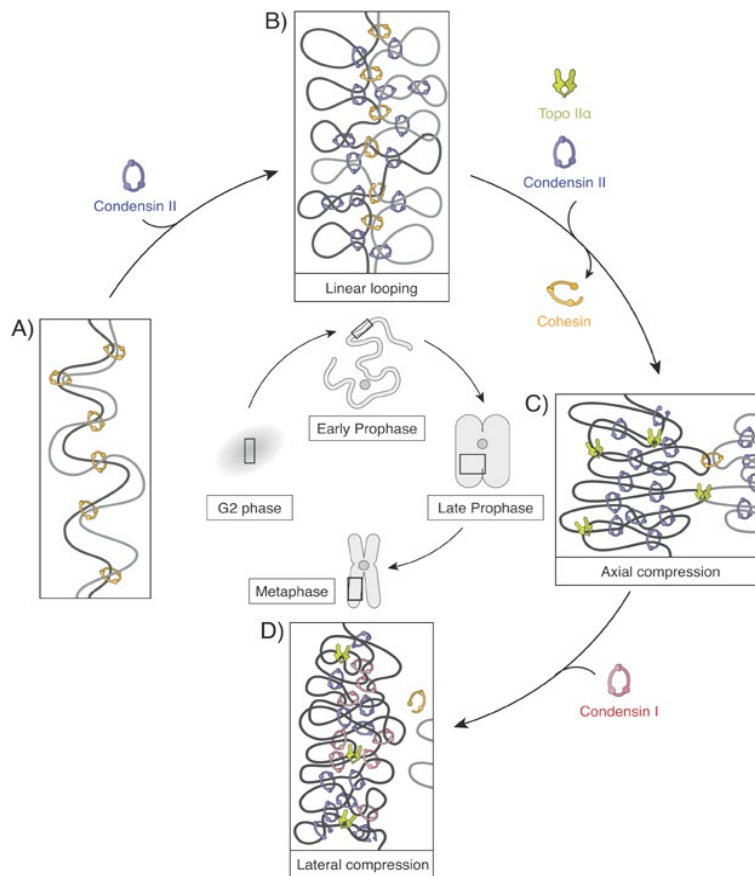


Figure 7 | *Modèle d'action de Condensine I et II, Cohésine et Topoisomérase II*

(A). Les chromatides sœurs (en gris foncé et gris clair) sont maintenues ensemble par le complexe Cohésine (en jaune). (B) Organisation en boucles par Condensine II (en violet) en prophase. Les cohésines sont libérées ce qui permet la formation de liens entre les boucles par Condensine II résultant en une compaction axiale le long de l'axe longitudinal du chromosome. (C) La topoisomérase II (Topo II α) (en vert) aide à ce processus de compaction axiale en catalysant des passages de brin intra-chromatide. (D) Condensine I (en rouge) se lie après la rupture de l'enveloppe nucléaire et permet la compaction latérale en formant des boucles internes. D'après (Kschonsak and Haering, 2015)

2 Les modifications post-traductionnelles des histones et les enzymes qui les catalysent

L'expression des gènes est régulée par leur distribution dans l'hétérochromatine et l'euchromatine et par l'ensemble des mécanismes épigénétiques. Ces derniers sont multiples et variés (Yung and Elsässer, 2017) et, au niveau moléculaire peuvent dépendre de :

- la méthylation de l'ADN impliquée dans la répression de l'expression des gènes,
- les variants d'histones impliqués dans des processus variés,

- les complexes de remodelage de la chromatine permettant de modifier la position des nucléosomes et de ce fait l'accessibilité de l'ADN,
- les modifications biochimiques des histones impliquées dans des processus variés,
- la machinerie des petits ARN non-codant impliquée dans le contrôle de l'expression génique d'éléments génomiques étrangers et de certains gènes endogènes.

Dans cette partie je me focaliserai uniquement sur les modifications post-traductionnelles des histones.

2.1 Généralités

Les histones possèdent une extrémité flexible N-terminale appelée « queue des histones » qui s'étend en dehors du nucléosome. Celle-ci fait l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles catalysées par des enzymes hautement conservés. Différents types de modifications existent et viennent s'apposer sur différents résidus de la queue des histones. Au total, 12 types de modifications ont été décrits parmi lesquels l'acétylation (lysine), la méthylation (lysine et arginine), la phosphorylation (sérine et thréonine), la sumoylation (lysine) et l'ubiquitination (lysine) (Adamietz and Rudolph, 1984; DeLange et al., 1973; Hymes et al., 1995; Liebich et al., 1993; Tan et al., 2011; Wondrak et al., 2000). La nomenclature utilisée pour nommer ces marques est la suivante : dans le cas de H3K4Ac, H3 définit l'histone de cœur dont la queue est modifiée, K désigne l'acide aminé modifié, le nombre 4 se réfère à la position du résidu lysine dans l'histone, enfin Ac désigne le type de modification (dans ce cas, l'acétylation) (Figure 8). À noter que dans le cas de la méthylation des lysines, jusqu'à trois groupes méthyles peuvent être apposés définissant la mono-, di- et tri- méthylation.

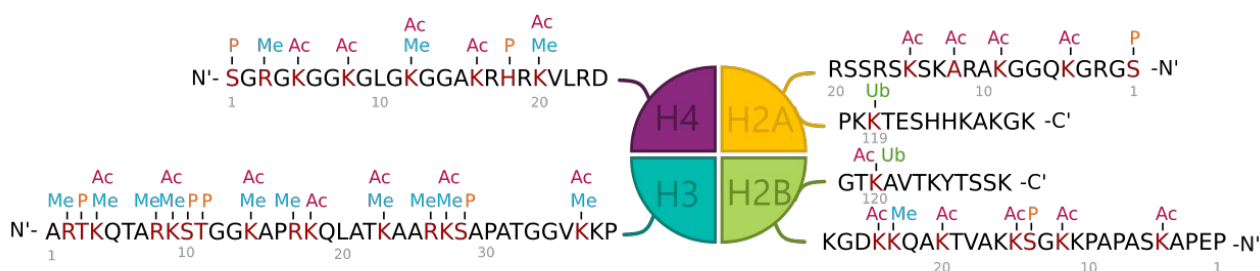


Figure 8| Exemples de modifications post-traductionnelles de la queue des histones H2A, H2B, H3 et H4

Acides aminés pouvant subir une modification post-traductionnelle (en rouge) de différents types : Acétylation (Ac), Méthylation (Me), Ubiquitination (Ub) et Phosphorylation (P). Certains acides aminés peuvent être porteurs de deux types de modifications (Acétylation ou méthylation ; Acétylation ou Ubiquitination). Position des acides aminés (numéros gris). N' : queue Nter ; C' : queue Cter. Adaptée de (Rosa and Shaw, 2013).

Les modifications post-traductionnelles des histones sont réversibles et dynamiques, elles jouent un rôle dans tous les processus nécessitant que l'ADN soit accessible tels que la réplication, la réparation de l'ADN et la transcription (Bellush and Whitehouse, 2017; Hauer and Gasser, 2017). Certaines de ces modifications sont transmises au cours des divisions cellulaires et des générations et confèrent une mémoire épigénétique (D'Urso and Brickner, 2017). Un intérêt particulier sera apporté à l'acétylation et à la méthylation des histones ainsi qu'aux enzymes catalysant ou éliminant ces marques.

2.2 La méthylation et les enzymes HMT/HDM

La méthylation des arginines est catalysée par les protéines arginine méthyltransférases (PRMT, protein arginine methyltransferase) (Gary and Clarke, 1998). L'arginine possède deux groupements amides (NH_2) qui peuvent recevoir un groupe méthyle. Ainsi l'arginine peut être mono- ou di- méthylée, la diméthylation pouvant se produire de manière asymétrique : lorsque le deuxième groupe méthyle est déposé sur le même groupe amide que le premier méthyle ; ou de manière symétrique lorsque le groupement méthyle est catalysé sur le groupement amide libre (Bedford and Clarke, 2009). D'autres part, les lysines peuvent également être mono-, di- ou tri-méthylées, et ces trois formes ont des fonctions différentes. La méthylation des lysines est catalysée par des histones méthyltransférases (HMT) qui possèdent toutes, à l'exception de Dot1 chez la levure, un domaine catalytique SET (S(u(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax) conservé (Nguyen and Zhang, 2011). Toutes ces enzymes ont une spécificité de substrats et de formes

(mono-, di- ou tri-méthylées) et la plupart agissent dans des complexes multiprotéiques (Tableau 1). Une même lysine peut être méthylée par plusieurs HMT suggérant une redondance de fonctions.

Tableau 1 | Histone-lysine méthyltransférases et histone déméthylases chez S. cerevisiae, C. elegans et les mammifères. Adapté de (Ahringer and Gasser, 2018; Ang et al., 2011; Mozzetta et al., 2015) et Wormbase

Histone méthyltransférases				
<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	Mammifères	Complexe associé	Substrats
-	MES-2	EZH1/2	PRC2	H3K27
Set1	SET-2	SET1A/B	SET1/MLL	H3K4
	SET-16	MLL1/2/3/4		
-	MET-2	SETDB1	Eset/mAM	H3K9
	SET-25	EHMT1/2	G9a-GLP	
			Suv39H1/2	
Set2	MET-1	SETDB2		H3K36
	MES-4	NSD1		
Histone déméthylases				
<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	Mammifères	Complexe associé	Substrats
-	SPR-5/LSD1	KDMA1/LSD1		H3K4me2/3
-	JMJD-1.2	KDM2A/PHF8		H3K9me2 H3K27me2
Jhd1/Rph1	JMJD-2	KDM4A		H3K36me2/3
Jhd2	RBR-2	KDM5/LID		H3K4me2/3
-	UTX-1	KDM6A/UTX		H3K27me2/3
-	JMJD-3.1	KDM6B/JMJD3		

Les Histones Déméthylases (HMD) ont pour fonction d'éliminer, de manière spécifique ou non, les groupements méthylés déposés sur les lysines et les arginines (Accari and Fisher, 2015; Zhang et al., 2019). La première à avoir été découverte est LSD1 qui déméthyle H3K4me1/2 (Shi et al., 2004). Par la suite, une famille de protéines HDM à domaine conservé « Jumonji C » JmjC a été découverte (Tableau 1) (Accari and Fisher, 2015; Shi et al., 2004; Tsukada et al., 2006). L'enzyme à domaine Jumonji JMJD6, et la famille d'enzyme PADI (Peptidylarginine Deiminase) déméthyle spécifiquement la méthylation des arginines (Accari and Fisher, 2015).

La méthylation des résidus arginines et lysines des histones H2B, H3 et H4 permet le recrutement de protéines « lectrices » qui vont intervenir sur la structure de la chromatine. Les marques d'histone sont reconnues par des protéines comportant des domaines conservés : « PHD »

(Plant Homeodomain), « MBT » (Malignant Brain Tumor), « Tudor », ou « Chromodomain » (Bannister and Kouzarides, 2011). La méthylation de H3K4 est reconnue par des protéines contenant un domaine PHD, Tudor ou Chromodomain. Les protéines à chromodomaine sont aussi capables de reconnaître les marques H3K36me3 et les marques répressives H3K27me3 et H3K9me3. Les protéines à domaine MBT reconnaissent la méthylation de H4K20 et H3K9.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au complexe HMT SET1/MLL qui catalyse la di- et tri- méthylation de H3K4. Ce complexe se compose d'une protéine catalytique à domaine SET : SET1A/B ou MLL1-4 chez l'humain, de sous-unités de cœur WRAD (WRD5, ASH2, RBP5, DPY30) et de sous-unités spécifiques telles que CFP1 (Spp1 chez la levure) (Howe et al., 2017). La sous-unité CFP1 possède un domaine CXXC qui permet de reconnaître les îlots CpG : dinucléotides CG dont la fréquence est forte au niveau des promoteurs, formant ainsi un îlot (Klose and Bird, 2006). Chez les mammifères, CFP-1 permet le recrutement du complexe au niveau des îlots CpG et dont les cytosines ne présentent pas de méthylation (Carlone and Skalnik, 2001; Carlone et al., 2002; Lee et al., 2001; Voo et al., 2000). Chez *C. elegans*, CFP-1 est également enrichie au niveau de promoteurs riches en CpG (Chen et al., 2014).

2.3 L'Acétylation et les enzymes HAT/HDAC

L'acétylation peut avoir lieu sur de nombreuses lysines telles que les lysines K4, K9, K14, K18, K23, K27 de l'histone H3, et sur les lysines K5, K12, K16 de l'histone H4 entre autre (Figure 8). Les « histones acétyltransférases » (HAT) catalysent l'acétylation des histones alors que les « histones déacétylases » (HDAC) les effacent (Tableau 2). L'acétylation des résidus lysines de la queue des histones neutralise la charge positive portée par celle-ci. La neutralisation de cette charge positive réduit l'affinité de l'histone qui porte la lysine avec l'ADN qui est chargé négativement (Bannister and Kouzarides, 2011; Prakash and Fournier, 2017). Ainsi, l'acétylation influence directement la structure de la chromatine en favorisant un état ouvert accessible à la machinerie de transcription, mais également indirectement en recrutant des facteurs à bromodomains capables de reconnaître les lysines acétylées (Eberharther and Becker, 2002; Prakash and Fournier, 2017).

Tableau 2| Histone acétyltransférases et histone déacétylases chez *S. cerevisiae*, *C. elegans*, et les mammifères. Adapté de (Seto and Yoshida, 2014; Yang and Seto, 2008) et Wormbase

Histone acétyltransférases			
<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	Mammifères	Complexes associés
Gcn5	PCAF-1	GCN5, PCAF	SAGA, ATAC
Sas3	LSY-12	KAT6A	NuA3
	MYS-2	KAT8/MOF	MSL, NSL
Esa1	MYS-1	KAT5/TIP60	TIP60
Bdf1	CBP-1	CBP/p300	CBP/p300
Taf1	TAF-1	TAF1	TFIID
Histone déacétylases			
<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. elegans</i>	Mammifères	Complexes associés
Rpd3 (classe I)	HDA-1	HDAC1	Rpd3/Sin3-HDAC, Mi2/NURD, CoREST
	HDA-2	HDAC2	
	HDA-3	HDAC3/8	N-CoR/SMRT
Hda1 (classe II)	HDA-4/5/6	HDAC4/5/6/7/9	
	HDA-10	HDAC10	
Sir2 (classe III)	SIR-2.1	SIRT1-7	
(classe IV)	HDA-11	HDAC11	

Les histone déacétylases restaurent la charge positive des lysines et par conséquent, stabilisent l'interaction entre les histones et l'ADN. La chromatine passe alors d'une structure ouverte à une structure plus fermée. Les HDAC sont des répresseurs de la transcription. Sur la base de la phylogénie et de l'homologie de séquences, 4 classes d'enzymes HDAC peuvent être définies, la classe : I, II, III et IV (Tableau 2) (Hodawadekar and Marmorstein, 2007). Tandis que les membres des classes I, II et IV possèdent des homologies de séquences pour leur domaine catalytique, la classe III se distingue par un mécanisme de déacétylation différent utilisant un co-facteur NAD⁺ et non une molécule d'eau, et ne possède pas d'homologie de séquences avec les autres classes (Yang and Seto, 2008).

Ces enzymes sont conservés de la levure aux mammifères et font partie de complexes multiprotéiques, appartenant parfois à plusieurs complexes différents (Hodawadekar and Marmorstein, 2007). De manière générale, la spécificité de substrats des HAT et HDAC n'est pas connue. De plus, la spécificité de substrat est déterminée par le complexe dont elles font partie. Ainsi, la protéine MOF (HAT) acétyle la lysine 16 de l'histone H4 lorsqu'elle fait partie du complexe MSL, et la lysine K5 et K8 de l'histone H4 lorsqu'elle fait partie du complexe NSL (Tableau 2) (Cai et al., 2010; Chen et al., 2015; Smith et al., 2005; Zhao et al., 2013). À noter que

les histones ne sont pas les uniques substrats de ces enzymes, elles sont capables de réaliser des modifications post-traductionnelles d'autres protéines (Yoshida et al., 2017).

Au cours de mon travail de thèse, j'ai été amené à étudier la protéine SIN-3 chez *C. elegans*. Son homologue chez la levure fait partie de deux complexes Rpd3L et Rpd3S qui sont associés à la sous-unité catalytique HDAC : Rpd3 (Kadamb et al., 2013). Chez l'homme, SIN3 est associée à plusieurs complexes hétérogènes d'histones déacétylases avec comme sous-unité catalytique HDAC1 ou HDAC2 (Banks et al., 2018; Kadamb et al., 2013; Laherty et al., 1997; van Oevelen et al., 2010). Les complexes SIN3/HDAC (Rpd3L chez la levure) sont classiquement associés à une répression transcriptionnelle via le recrutement de facteurs de répression et la déacétylation des nucléosomes au niveau des régions promotrices (Kadamb et al., 2013; McDonel et al., 2006; van Oevelen et al., 2010; Sahu et al., 2008; Wang et al., 2011). Chez la levure, Rpd3S inhibe la répression au niveau de sites cryptiques de transcription (Carrozza et al., 2005; Kadamb et al., 2013; Keogh et al., 2005). Cependant, plusieurs études révèlent un rôle activateur de SIN3 dans de nombreux modèles (Alland et al., 1997; Gajan et al., 2016; Laherty et al., 1997; van Oevelen et al., 2010; Saha et al., 2016; Shi et al., 2006).

2.4 Établissement de l'euchromatine et de l'hétérochromatine

Comme décrit précédemment, le génome des eucaryotes est divisé en deux domaines : l'euchromatine et l'hétérochromatine qui diffèrent par leurs états transcriptionnel et qui occupent des zones du noyau distinctes. L'hétérochromatine peut être subdivisée en hétérochromatine constitutive et facultative. Ces catégories sont définies par les marques épigénétiques, et les facteurs chromatinien qui y sont associés.

Ainsi, l'hétérochromatine constitutive est transcriptionnellement silencieuse, elle est enrichie en marques H3K9me2/3 et en protéines HP1 (Heterochromatin Protein 1) qui possède un chromodomaine capable de reconnaître la marque H3K9me3 (Allshire and Madhani, 2018). Elle est fortement condensée et se localise au niveau des séquences répétées et pauvres en gène que l'on retrouve principalement au niveau des télomères et des régions péri-centromériques. Le maintien de sa structure condensée est nécessaire lors de la division mitotique pour permettre la ségrégation correcte des chromatides sœurs (Ahringer and Gasser, 2018; Allshire and Madhani, 2018).

L'hétérochromatine facultative est caractérisée par la présence de la marque H3K27me3 et par le recrutement du complexe PRC2 qui catalyse cette marque (Bannister and Kouzarides, 2011).

La structure de l'hétérochromatine facultative est dynamique, elle comprend des gènes potentiellement actifs, dont l'activité dépend du contexte spatio-temporel, ou d'autres contextes spécifiques (Trojer and Reinberg, 2007). La marque H3K27me3 est parfois retrouvée associée à la marque H3K4me3 au niveau des promoteurs « bivalents », ce qui permettrait une activation rapide et transitoire de la transcription (Bernstein et al., 2005; Harikumar and Meshorer, 2015; Voigt et al., 2013).

L'euchromatine est riche en gènes transcriptionnellement actifs, et possède une structure ouverte à la machinerie de transcription. Sa composition est hétérogène, avec des régions riches en histones acétylées et en marques H3K4me3 et H3K36me3, ainsi que d'autres régions pauvres en gène au niveau du promoteur nucléosomes « nucleosome depleted region » (Ernst and Kellis, 2010; Prakash and Fournier, 2017). À l'échelle du gène transcriptionnellement actif, le TSS (pour Transcription Start Site) est enrichi en marques acétylées et en H3K4me3, la région codante du gène est enrichie en H3K36me3 sur toute sa longueur (Ernst and Kellis, 2010; Prakash and Fournier, 2017). La marque H3K4me2 est retrouvée au niveau des promoteurs et des enhanceurs de ces gènes. La marque H3K4me1 est associée aux enhanceurs, aux promoteurs et aux régions de terminaison de la transcription (Bernstein et al., 2005; Heintzman et al., 2007; Ramakrishnan et al., 2016).

Les techniques de capture de la chromatine étudiant la répartition de nombreuses marques épigénétiques (Dixon et al., 2012), ont mis en évidence que les TAD possèdent des combinaisons en modifications d'histones spécifiques selon le type cellulaire. Il semblerait que les domaines possédant un marquage épigénétique semblable pourraient interagir et repousseraient les régions possédant un marquage épigénétique différent. Ceci permettrait de séparer les domaines actifs ou inactifs de la chromatine (Huang et al., 2015; Prakash and Fournier, 2017; Rao et al., 2014; Tabuchi et al., 2018).

2.5 Coopération fonctionnelle des marques d'histones

Dans les années 2000, Jenuwein et Allis ont proposé l'existence d'un « code des histones » : les marques d'histones et leurs combinaisons seraient capables de s'influencer entre elles et également influenceraient l'affinité d'interaction des complexes protéiques capables de les lire. Ceci permettrait d'établir un état transcriptionnel actif ou inactif (Jenuwein and Allis, 2001). Les connaissances concernant les coopérations fonctionnelles des marques se complexifient d'année en

année, notamment grâce au progrès des techniques permettant d'étudier ces processus, c'est pourquoi cette notion de « code des histones » est remise en question (Rando, 2012). Ainsi, la fonction de certaines marques semble dépendre du contexte chromatinien dans lequel elles se trouvent.

Des avancées technologiques tels que l'immunoprécipitation de la chromatine et le séquençage (ChIP-seq) ont permis d'établir des cartes de la distribution et de la co-localisation de nombreuses marques d'histones. Par ailleurs, les techniques de spectrométrie de masse ont permis d'analyser les modifications présentes sur une même histone. La réactivité croisée des marques peut s'effectuer en *cis* lorsque les modifications post-traductionnelles en jeu sont situées sur la même queue d'histone ; ou en *trans* lorsque les marques sont situées sur des histones appartenant au même nucléosome ou sur des nucléosomes voisins. Les modifications peuvent jouer un rôle antagoniste entre elles ou au contraire synergique.

Un rôle antagoniste en *cis* est observé entre la diméthylation de H3R2 et la triméthylation de H3K4. H3R2me2 inhibe la déposition de la marque H3K4me3 par les complexes Set1/COMPASS chez la levure, ou SET1/MLL chez les mammifères (Guccione et al., 2007; Kirmizis et al., 2007). Un exemple de coopération synergique a lieu entre la mono-ubiquitination de l'histone H2B (sur la lysine 120) et H3K4me3, cette modification est requise pour la méthylation correcte en *trans* de H3K4 chez la levure et chez les mammifères (Kim et al., 2009; Shilatifard, 2006). Un autre exemple suggère que la présence de l'acétylation de H3K14 est importante pour la tri-méthylation de H3K4 (Nakanishi et al., 2008). Cette association entre H3K4me3 et l'acétylation est retrouvée dans les cellules de *Drosophila*, où les histones H3 portant la marque K4me3 sont pour la plupart dynamiquement acétylés en position K9, K14 et K18 et jouent un rôle essentiel dans la transcription des gènes régulateurs de la différenciation cellulaire (Crump et al., 2011). Un autre exemple de coopération a été mis en évidence pour les résidus H4K16, H4K5 et H4K8 acétylés qui facilitent la diméthylation de H3K4 (Zhao et al., 2013).

Les complexes catalysant ces marques contiennent également des protéines lectrices capables de lier des marques pré-existantes. Ces enzymes peuvent être associés à plusieurs complexes distincts et peuvent ainsi cibler plusieurs marques de manière successive ou simultanée. Ainsi le complexe SAGA est constitué de l'histone acétyltransférase Gcn5 qui possède un Bromodomaine capable de reconnaître les lysines acétylées (Cieniewicz et al., 2014). Ce complexe contient également la protéine SGF29 dont le domaine Tudor est capable de se lier à H3K4me3 (Lu and

Wang, 2013). Par ailleurs, de nombreuses protéines à domaine PHD reconnaissant H3K4me3, font partie de complexes HDAC ou HAT (Doyon et al., 2006).

2.6 Rôle de H3K4me2/3 dans l'expression génique et dans la réparation de l'ADN

2.6.1 Rôle de H3K4me2/3 dans l'expression génique

La tri- méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 est une marque épigénétique conservée de la levure à l'homme. Elle a été pour la première fois identifiée chez le cilié *Tetrahymena thermophila*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez les cellules HeLa (Strahl et al., 1999). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que cette marque est universellement présente au niveau du site TSS des gènes transcriptionnellement actifs (Howe et al., 2017). Il a également été montré que le niveau de cette marque est fortement corrélé avec le niveau de transcrit naissant des gènes transcriptionnellement actifs (Bernstein et al., 2005; Heintzman et al., 2007; Howe et al., 2017; Nojima et al., 2015). Compte-tenu de sa présence au niveau des TSS des gènes transcriptionnellement actifs et sur la base d'observations initiales réalisées à un petit nombre de loci, il avait été proposé que la méthylation de H3K4 soit une marque activatrice de la transcription. Néanmoins, depuis la première étude qui a proposé un lien entre H3K4me3 et la transcription en 2002 (Santos-Rosa et al., 2002), aucun mécanisme n'a permis de montrer en quoi H3K4me3 possède un rôle instructif sur l'activation de la transcription. Des expériences plus récentes menées sur génome entier remettent ce modèle en question.

En effet, des expériences réalisées chez la levure ont montré que l'absence de H3K4me3 n'a que peu d'effet sur la transcription basale ou dynamique des gènes, même pour les gènes où la marque H3K4me3 est la plus abondante (Guillemette et al., 2011; Lenstra et al., 2011; Margaritis et al., 2012; Miller et al., 2001; Santos-Rosa et al., 2002; Venkatasubrahmanyam et al., 2007; Weiner et al., 2012). De plus, en l'absence de la déméthylase Jhd2 qui est capable de démétyler tous les états méthylés de H3K4, les niveaux de H3K4me3 augmentent sans provoquer une augmentation de la quantité de transcrits (Lenstra et al., 2011). Par ailleurs, une activité répressive de H3K4me3 est observée en réponse à un stress chez la levure (Weiner et al., 2012). De la même manière, dans les cellules de mammifères, la délétion de CFP1 provoque la perte de la majorité de H3K4me3 observée au niveau des gènes associés à des îlots CpG dans les cellules embryonnaires de souris sans pour autant perturber la présence de l'ARN polymérase II sur ces gènes ainsi que leur niveau

d'expression (Clouaire et al., 2012, 2014). La même observation a été réalisée dans les cellules embryonnaires souches, où un nombre non négligeable de gènes sont réprimés par CFP1 (Brown et al., 2017).

Sur la base de ces observations, il est proposé que le rôle de H3K4me3 sur la transcription soit dépendant du contexte chromatinien et des protéines recrutées par la marque. La marque H3K4me3 est reconnue par des protéines comportant des domaines PHD, Tudor ou chromodomaine (Bannister and Kouzarides, 2011; Ruthenburg et al., 2007). Le recrutement de certains facteurs peut également dépendre de modifications environnantes. Ainsi, la protéine BPTF du complexe de remodelage NURF possède un domaine PHD et un chromodomaine et se lie préférentiellement à H3K4me3 lorsque la marque H4K16Ac est présente sur le même nucléosome (Ruthenburg et al., 2011). La présence de la diméthylation asymétrique de H3R2 au voisinage de H3K4me3 inhibe le recrutement de Spp1 et empêche Set1 de trimétyler H3K4 (Kirmizis et al., 2007).

D'autres rôles de H3K4me3 ont été proposés dans plusieurs processus en lien avec la transcription. Par exemple, chez l'humain, des défauts d'épissage des ARN pré-messagers ont été observés après la déplétion de la protéine ASH2, une sous-unité des complexes Set1/MLL. Cette fonction pourrait être médiée par la protéine CHD1 qui joue un rôle essentiel dans l'épissage et qui reconnaît H3K4me3. Chez la Levure, le recrutement de la machinerie de terminaison est dépendant de H3K4me3 (Terzi et al., 2011). L'épissage et la terminaison de la transcription dépendent de la vitesse de transcription (Hazelbaker et al., 2013; de la Mata et al., 2003; Naftelberg et al., 2015) et par conséquent le rôle de H3K4me3 dans ces deux processus pourrait être un effet indirect de l'altération de la vitesse de transcription (Howe et al., 2017).

Un nombre d'études croissant pointe vers un rôle de H3K4me2/3 dans la mémoire transcriptionnelle. Ce phénomène est défini par une réponse transcriptionnelle plus rapide après la réexposition à un changement environnemental ou à un stress et qui est hérité au cours des divisions mitotiques (Fabrizio et al., 2019). Le maintien de H3K4me3 permettrait un réajustement de la réponse transcriptionnelle plus rapide. L'un des exemples de mémoire transcriptionnelle a été décrit dans des levures qui ont été soumis à une privation en inositol. Le manque d'inositol déclenche l'expression de INO1 (Inositol-1-phosphatase synthase). Les levures soumises à un stress initial par manque d'inositol sont capables de déclencher plus rapidement l'expression de INO1 lorsqu'elles sont à nouveau soumises à un manque d'inositol. Cette mémoire est transmise mitotiquement

jusqu'à 4 générations et requiert la marque H3K4me2 (D'Urso et al., 2016). De manière intéressante, chez la levure, certains gènes présentent une mémoire transcriptionnelle répressive (Lee et al., 2018). D'autres exemples existent chez la levure, comme la mémoire transcriptionnelle du gène Gal1 après une absence de galactose. Ce processus fait également intervenir la marque H3K4me2 (Sood et al., 2017). Cette mémoire est médiée par le complexe d'histone déacétylase Rpd3L. L'interaction entre Rpd3L et H3K4me3 via le domaine PHD de la sous-unité Pho23 est essentielle pour la mémoire répressive (Lee et al., 2018). Chez les plantes, la di- et tri- méthylation de H3K4 sont associées à la mémoire somatique de stress et sont enrichies au niveau des gènes de « mémoire » impliqués dans la réponse au stress salin, de dessiccation, de chaleur et dans la défense contre les bactéries (Bäurle, 2018). Au cours des divisions clonales chez *Dictyostelium discoideum* le statut transcriptionnel du gène *act5* (Actine 5) persiste et dépend de la méthylation de H3K4 (Muramoto et al., 2010). Cependant, certains systèmes soumis à mémoire transcriptionnelle n'impliquent pas la marque H3K4me2/3 mais d'autres marques tel que la méthylation de H3K27 (Iberg-Badeaux et al., 2017).

2.6.2 Rôle de H3K4me2/3 dans la réparation de l'ADN

De nombreux processus faisant intervenir l'ADN sont affectés par la perte de marques d'histones, comme la recombinaison ou la réparation de l'ADN. Pour certaines marques, leur rôle dans ces différents processus est bien documenté. Après un dommage à l'ADN, la cellule active la réponse aux dommages à l'ADN (DDR : DNA Damage Response). La condensation et décondensation de la chromatine ont été impliquées dans la régulation du DDR. Au niveau moléculaire, les variants d'histones, et les modifications des histones, les protéines chaperons d'histones et les complexes de remodelage sont importants pour cette régulation (Burgess et al., 2014; Lukas et al., 2011; Price and D'Andrea, 2013; Shi and Oberdoerffer, 2012). Les marques d'histones peuvent être constitutives ou induites par la présence de lésions de l'ADN et recrutent des effecteurs. Ainsi, la phosphorylation de la sérine 139 du variant d'histone H2AX, appelée « γ H2AX » est induite par une cassure double brin et agit comme senseur pour la cellule. Elle permet de recruter des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN au niveau de la cassure (Kuo and Yang, 2008). Par ailleurs le complexe PRC2 qui catalyse la marque répressive H3K27me2/3 est recruté au niveau des cassures dans les cellules de mammifères. La déplétion de ce complexe entraîne une augmentation de la sensibilité aux radiations et une diminution de l'efficacité de réparation des cassures double brin (Campbell et al., 2013). H3K9me2/3 établissent

des domaines chromatinien répressifs transitoires aux sites des cassures (Ayrapetov et al., 2014). La méthylation de H3K36 joue un rôle important dans le DDR. Les protéines SET2 chez la levure, et SETD2 chez l'humain, sont nécessaires à l'activation du point de contrôle de la réparation de l'ADN (Aymard et al., 2014; Carvalho et al., 2014; Jha and Strahl, 2014; Pai et al., 2014; Pfister et al., 2014).

Le rôle de H3K4me3 dans ce processus est moins connu. Les mutants de *set1* chez la levure sont sensibles aux agents endommageant l'ADN (Faucher and Wellinger, 2010; Pan et al., 2012). Par ailleurs, les mutants *set1* présentent une augmentation de l'apoptose et une accumulation de dommages à l'ADN (Walter et al., 2014). À l'inverse les mutants de la déméthylase *jhjd2* ont une meilleure survie, indiquant que la méthylation de H3K4 joue un rôle dans la régulation de l'apoptose et de la réponse aux dommages de l'ADN (Walter et al., 2014). Chez la levure, Spp1 promeut les cassures double brin en méiose en interagissant d'une part avec les protéines responsables de ces cassures et d'autres part par son interaction avec la marque H3K4me2/3. Le rapprochement de ces régions marquées par H3K4me2/3 par Spp1 à l'axe chromosomique permettrait la formation de cassures double brin dans les régions déplétées en nucléosomes proches (Sommermeyer et al., 2013). Dans les cellules HeLa, les cassures double brin induites par des irradiations perdent la marque H3K4me3 et forment une chromatine répressive au niveau de la cassure (Seiler et al., 2011). Au contraire, une étude montre que les activités apoptotiques et de réparation de l'ADN de ING1 (Inhibitor of growth 1, un suppresseur tumoral) nécessitent l'interaction de son domaine PHD avec H3K4me3 (Peña et al., 2008). Plus récemment, il a été montré qu'après exposition au benzène de lymphocytes primaires, le niveau de H3K4me3 est augmenté et transactive des facteurs du DDR (Li et al., 2018). Par ailleurs, au cours du développement lymphocytaire, la famille des méthyltransférases SET1/MLL joue un rôle bien décrit dans la recombinaison V(D)J (Daniel and Nussenzweig, 2012).

3 La lignée germinale de *C.elegans* comme modèle d'étude des régulations épigénétiques

3.1 Généralités sur *C. elegans*

Caenorhabditis elegans a été isolé par Émile Maupas dans les années 1900. Mais, ce n'est que dans les années 1970 que *C. elegans* acquiert le statut d'organisme modèle, notamment grâce aux travaux de Sydney Brenner, John Sulston et Robert Horvitz. Le nom de *Caenorhabditis elegans*

provient du grec « *caenor* » nouveau, « *rhabditis* » bâton et du latin « *elegans* » élégant. C'est un ver rond de la famille des nématodes qui vit à l'état naturel dans des racines ou des fruits en décomposition. Au laboratoire il est cultivé sur des boîtes de pétri, sur un milieu solide constitué d'agar et il est nourri avec des bactéries *Escherichia coli*. À l'âge adulte il mesure 1 mm de long. Son cycle de vie dure 3 jours à 20°C (température utilisée pour la culture en laboratoire) de la ponte de l'embryon à l'adulte fertile. Il est caractérisé par 4 stades larvaires successifs (L1, L2, L3, L4) séparés par des mues (Figure 9). De plus dans des conditions environnementales d'absence de nourriture, les larves L2 sont capables d'entrer dans un stade de résistance (Dauer) où le développement est arrêté jusqu'à retrouver des conditions environnementales favorable (Figure 9).

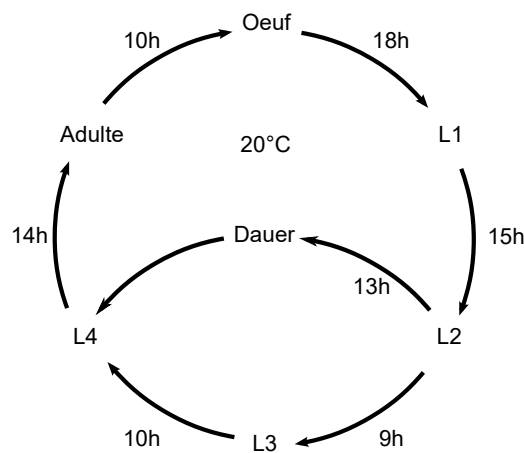


Figure 9| Cycle de vie de *C. elegans* à 20°C

Les adultes existent sous deux formes sexuées : la forme hermaphrodite et la forme mâle (<0.2 % de la population) qui présentent des caractéristiques morphologiques différentes (Figure 10). Les hermaphrodites possèdent deux ovotestis qui produisent les deux types de gamètes : les spermatozoïdes amiboïdes au stade L4 (ils sont stockés dans les spermathèques), puis des ovocytes à l'âge adulte. Les hermaphrodites sont autofécondants : les spermatozoïdes produits par un animal fécondent les ovocytes du même animal. Les hermaphrodites produisent environ 200 à 300 descendants isogéniques grâce à leur stock de spermatozoïdes qui est alors le facteur limitant à leur fertilité. Les deux sexes sont diploïdes et possèdent cinq paires d'autosomes et deux chromosomes X dans le cas de l'hermaphrodite (XX) et un unique chromosome X pour le mâle (XO). Le sexe est

déterminé par le ratio entre le nombre de chromosome X par rapport aux autosomes (X:A) (Zarkower, 2006). Les mâles proviennent de la rare non-disjonction du chromosome X au moment de la méiose I de l'ovocyte. Ils peuvent féconder les hermaphrodites, permettant ainsi l'échange de matériel génétique entre deux animaux.

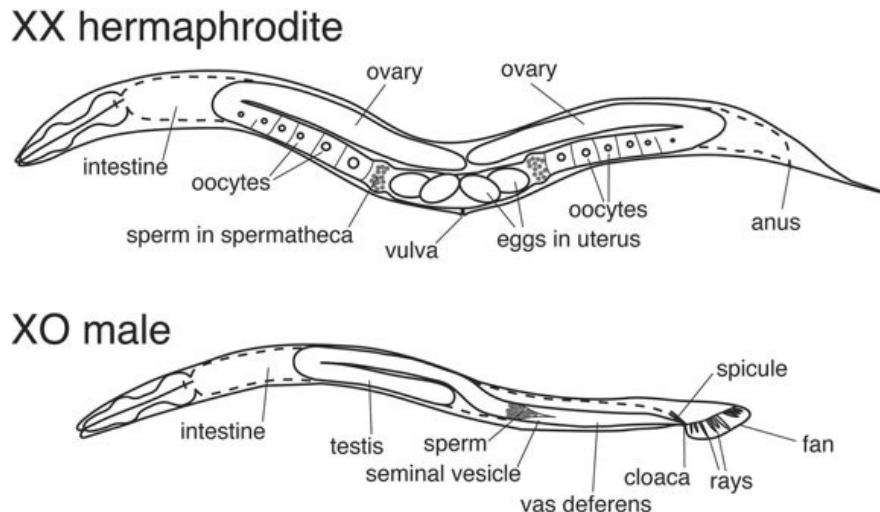


Figure 10| Principales caractéristiques anatomiques et morphologiques d'un adulte hermaphrodite ou mâle.

L'adulte hermaphrodite (haut) possède deux bras de gonades qui sont des ovotestis produisant les spermatozoïdes stockés dans la spermathèque et les ovocytes. L'utérus contient les embryons qui seront pondus par la vulve. L'adulte mâle (bas) possède un bras de gonades (testis) qui produit les spermatozoïdes. Au moment de l'accouplement les spermatozoïdes passent par la vésicule séminale et le vase déférent avant d'être transmis par la vulve à l'hermaphrodite. Wormbook

C. elegans possède un nombre de cellules fixe à la fin de son développement, soit 959 cellules somatiques pour l'hermaphrodite et 1031 cellules somatiques pour les mâles. Seule la lignée germinale produit des cellules par division mitotique à l'âge adulte (Sulston and Horvitz, 1977 ; Sulston et al., 1980).

C. elegans est le premier organisme modèle multicellulaire dont le génome a été séquencé. Ce travail réalisé par le « *C. elegans* sequencing Consortium » et publié en 1998 a permis le séquençage de 97 millions de paires de bases réparties sur 6 chromosomes et l'ADN mitochondrial et codant 19 099 gènes. L'annotation du génome est régulièrement mise à jour, la version WS254 utilisée pour la suite de cette étude comprend : 20 257 gènes codant des protéines, 26 515 gènes non codant, dont 15 365 ARN piwi. Le restant des gènes non-codant est constitué de pseudogènes, d'ARN ribosomique, d'ARN de transfert, et d'ARN régulateurs (snoRNA, miRNA, lincRNA).

Des outils génétiques variés ont été développés pour l'étude fonctionnelle de cet organisme. D'une part, de nombreux mutants sont disponibles. Ils sont issus de mutagenèse du génome par divers agents chimiques, par radiations ou par insertions d'éléments transposables. D'autre part l'ARN interférence qui permet de dépléter les ARNm d'un gène cible, est facilement utilisable chez *C. elegans* (Fire et al., 1998). Il se fait, par exemple, en nourrissant des animaux avec des bactéries *E. coli*. Ces bactéries contiennent un plasmide contenant un fragment de la séquence du gène à cibler et peuvent produire l'ARN double brin correspondant. Des banques bactériennes ciblant la quasi-totalité des gènes sont disponibles. La transgénèse peut être réalisée par injection (Stinchcomb et al., 1985) ou par bombardement (Praitis et al., 2001). L'insertion ciblée de transgènes en copie unique peut être réalisée par mobilisation d'éléments transposables (Frøkjær-Jensen et al., 2008) ou par CRISPR/Cas9. Des mutations ciblées d'un gène peuvent se faire, entre autre, par la technique CRISPR/Cas9 (Dickinson and Goldstein, 2016). De nouveaux outils sont disponibles comme la méthode AID (Auxin-Inductible Degradation) (Zhang et al., 2015) qui permet la dégradation tissu-spécifique d'une protéine de façon inductible et réversible.

3.2 Généralités sur la lignée germinale

Les hermaphrodites possèdent deux bras de gonades organisées de manière spatio-temporelle. La partie dite « distale » contient les cellules mitotiques qui progressent le long du bras vers la partie « proximale » (Figure 11 A). Ces cellules passent par les phases successives de la prophase de méiose I, jusqu'à devenir un ovocyte mature bloqué en diakinèse (prométaphase de méiose I) à l'entrée de la spermathèque. La suite de la méiose I et II se déroule après l'activation de l'ovocyte par l'entrée d'un spermatozoïde (Marcello et al., 2013), elle produit deux globules polaires contenant un lot de chromosomes homologues issu de la division équationnelle, ou les chromatides sœurs issues de la division réductionnelle (Yang et al., 2003).

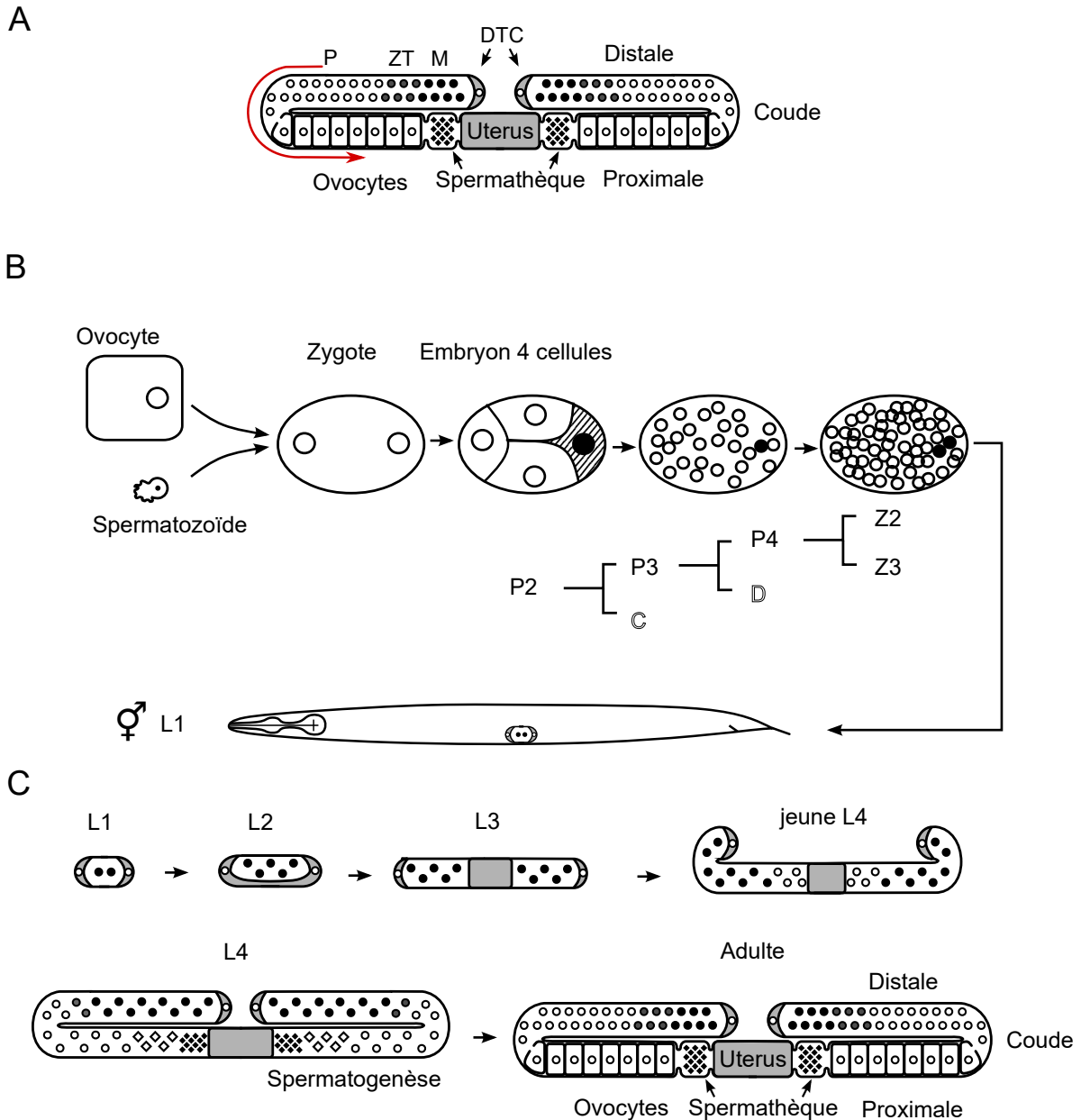


Figure 11 | Développement de la lignée germinale

(A) Schéma d'une lignée germinale adulte. Elle est composée d'une partie distale et proximale, dans laquelle les noyaux (rond) progressent (flèche rouge : sens de la progression de la partie distale à proximale). La partie distale comprend les noyaux en mitose (M) (rond noir), la zone de transition (ZT) (rond gris) qui correspond à l'entrée en méiose, puis les cellules passent au stade pachytène (P) (rond blanc). Dans la partie distale, après le coude, la gamétogenèse a lieu avec la maturation en ovocytes. Les spermatozoïdes produits plus tôt au cours du développement sont stockés dans les spermatophores. La cellule la plus distale (DTC pour distal tip cell) maintient la prolifération. (B) Genèse de la lignée germinale depuis la fécondation jusqu'au stade L1 : au stade « 4 cellules » le blastomère postérieur (P2) conserve la potentialité germinale tandis que les autres cellules s'engagent dans la voie somatique. La cellule P4 générée au stade « 20 cellules » ne se divise plus jusqu'au stade « 100 cellules », où elle donne les deux cellules Z2 et Z3 précurseurs de la lignée germinale. Ces deux cellules restent quiescentes jusqu'à éclosion. (C) Développement de la lignée germinale au cours des stades larvaires. Sont représentés : la partie somatique de la lignée germinale (fond gris), les cellules mitotiques (rond noir), les cellules en transition (rond gris), les cellules en pachytène (rond blanc), les ovocytes (rond blanc entouré), les spermatocytes (losange blanc), les spermatozoïdes (losange noir).

3.2.1 Prolifération

La lignée germinale de *C. elegans* prolifère à partir d'une cellule primordiale : PGC (Primordial Germ Cell) pour produire environ 1000 cellules par bras de gonade (Kimble and White, 1981). Les deux PGC d'où prolifèrent les deux bras de gonades proviennent du blastomère postérieur P, qui engendrera le lignage P. Le blastomère P accumule des P-granules apportés par l'ovocyte qui sont des particules riboprotéiques trouvées spécifiquement dans la lignée germinale (Kawasaki et al., 1998; Kuznicki et al., 2000; Seydoux, 2018). La présence des P-granules est nécessaire à la spécification de la lignée germinale. La cellule P4 est la cellule fondatrice de toutes les cellules de la lignée germinale et ne contribue pas au soma, elle se divise en deux cellules Z2 et Z3 qui forment les PGC (Figure 11 B) (Sulston et al., 1983). Celles-ci restent quiescentes jusqu'à l'éclosion. Le déclenchement de la prolifération au stade L1 est sensible à des signaux de présence de nourriture ; en sa présence la lignée germinale prolifère jusqu'au stade L4 à partir duquel la gamétogenèse commence (Figure 11 C). Tout d'abord la spermatogenèse a lieu produisant 300 spermatozoïdes, puis l'ovogenèse débute après un changement de programme « sperm-to-oocyte switch » qui fait intervenir une cascade de transduction (Zanetti and Puoti, 2013).

3.2.2 La région mitotique

La lignée germinale de l'adulte possède une région « mitotique » dans la partie la plus distale et une zone dite de « transition » plus proximale (Figure 11 A, Figure 12). Les cellules germinales dans la zone mitotique sont des cellules souches qui se renouvellent et produisent des cellules qui vont se différencier, entrer en méiose, puis progresser jusqu'à la gamétogenèse. Ce processus fait intervenir la voie Notch/Delta qui s'oppose aux facteurs de régulation méiotique Nanos/NOS-1/3 et GLD-1/2/3 (Eckmann et al., 2004; Hansen et al., 2004a, 2004b; Kadyk and Kimble, 1998). Chez l'adulte la région mitotique comprend entre 225 et 250 cellules (Crittenden et al., 1994; Hansen et al., 2004b; Maciejowski et al., 2006). La zone mitotique est définie par un gradient de NOTCH/GLP-1 (Crittenden et al., 1994, 2003; Kimble and Simpson, 1997), qui est restreint par l'accessibilité de son ligand DELTA/LAG-2 exprimé par la « Distal Tip Cell » (DTC) une cellule somatique située à l'extrémité distale de la lignée germinale (Henderson et al., 1994). Par conséquent les cellules les plus proches de la DTC activent le récepteur NOTCH/GLP-1, tandis que les cellules distantes ne l'activent plus (Figure 12).

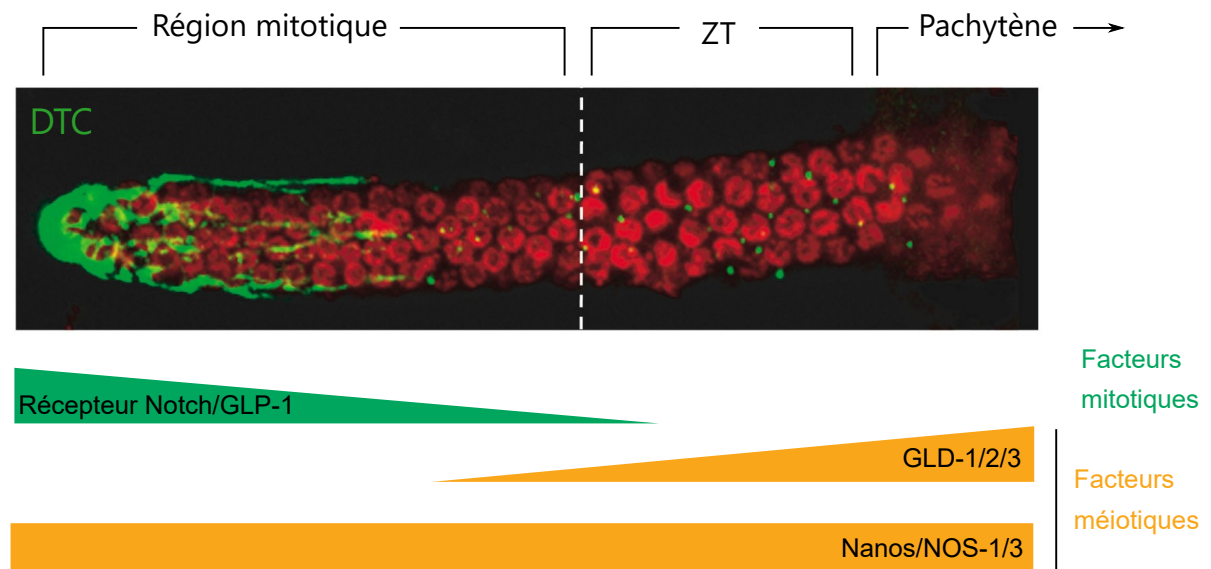


Figure 12| Régulation de la mitose et de la transition vers la méiose chez l'adulte

Haut : partie distale de la lignée germinale, les régions de la lignée germinale sont indiquées au dessus : région mitotique, zone de transition (ZT) et pachytène, en rouge : ADN, en vert : GFP sous le contrôle du promoteur LAG-2 qui ne s'exprime que dans la cellule distale (DTC). Bas : Distribution des facteurs de régulation de la mitose et de la méiose. Le niveau du récepteur Notch/GLP-1 est élevé dans la partie mitotique et diminue à l'entrée en méiose. Les niveaux des régulateurs de la méiose GLD-1/2/3 augmentent graduellement et atteignent leur maximum en région méiotique. NOS-3 est distribuée de façon uniforme dans la lignée germinale. Figure adaptée de Wormbook.

Les cellules distantes de la DTC n'activent plus la voie Notch et entrent en prophase I de méiose. Celle-ci est subdivisée en 5 étapes successive : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diakinèse, qui seront présentées dans la partie suivante.

3.2.3 Structure des chromosomes en méiose

Le leptotène correspond à l'étape de réplication méiotique (Figure 13 A), au cours de laquelle, la cohésion entre les chromatides est établie (Sherwood et al., 2010). Cette cohésion est réalisée par trois complexes Cohésines spécifiques à la méiose (Pasierbek et al., 2001; Severson and Meyer, 2014; Severson et al., 2009).

En zygotène l'appariement des chromosomes homologues s'établit par la reconnaissance au niveau de séquences nommées « pairing center » (McKim et al., 1988; Villeneuve, 1994) (Figure 13 A). À cette étape, La chromatine adopte une forme de croissant caractéristique du zygotène (Dernburg et al., 1998) (Figure 13 B). Elle est due au rassemblement des chromosomes sur un côté

du noyau et permet la reconnaissance des pairing center qui se fait au niveau de séquences répétées aux extrémités des chromosomes. Au cours des étapes de leptotène et zygotène, des cassures double brin ont lieu et sont essentielles pour la formation des crossing-over (Dernburg et al., 1998) (Figure 13 A).

À la fin du stade zygotène et au début du stade pachytène, les chromosomes homologues sont maintenus appariés par l'assemblage du complexe synaptonémal composé de l'élément axial (mis en place dès la réplication) et central (Figure 13). Ce dernier est un polymère de protéines qui s'assemble depuis le pairing center (Colaiácovo et al., 2003; MacQueen et al., 2005; Smolikov et al., 2009).

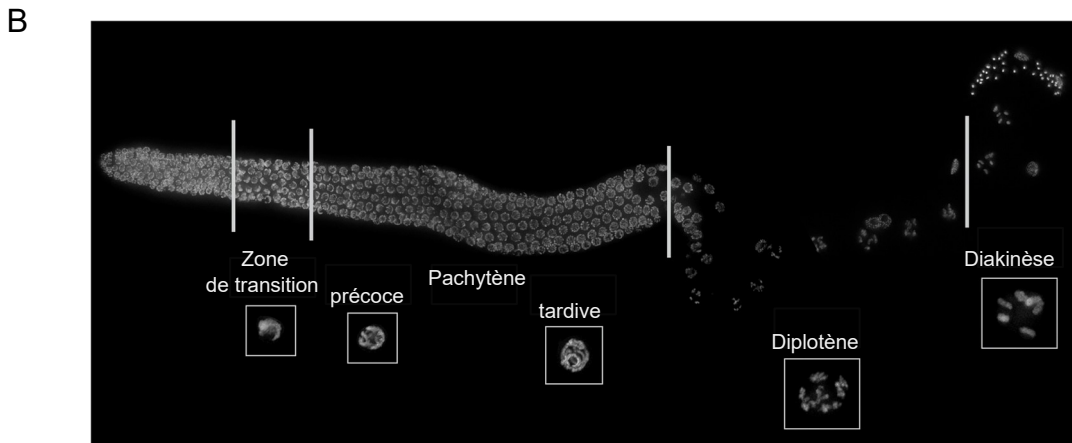
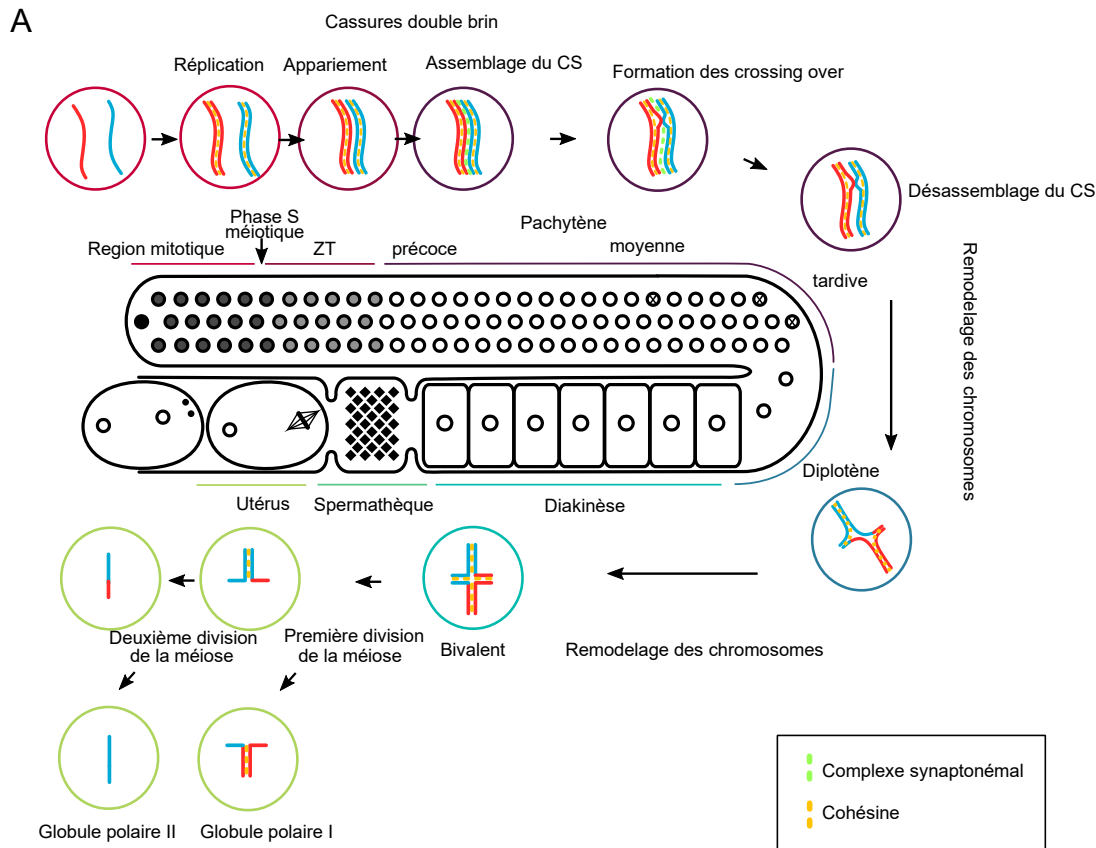


Figure 13| Étape de la méiose dans la lignée germinale

(A) Représentation schématique de la lignée germinale et des noyaux. Dans la région mitotique (soulignée en rouge) les chromosomes homologues commencent la phase S de méiose, les chromatides sœurs sont maintenues par les cohésines, en zone de transition (ZT), les chromosomes homologues (rouge et bleu) s'apparient et des cassures double brin nécessaires au crossing-over sont induites. En pachytène précoce, le complexe synaptonémal est mis en place, suivi de la formation des crossing-over. En pachytène tardif, le complexe synaptonémal est désassemblé, le remodelage des chromosomes commence jusqu'à obtenir des chromosomes bivalents compacts en diakinèse. Après fécondation, la première division de méiose éjecte un globule polaire contenant un jeu de chromosomes homologues ; la deuxième division éjecte un globule polaire contenant un jeu de chromatides sœurs. (B) Lignée germinale marquée au DAPI et zoom sur la morphologie des noyaux : forme en « croissant » en zone de transition, forme en « bol de spaghetti » en pachytène ; forme en croix en diplotène et en diakinèse : 6 bivalents sont visibles correspondant aux 5 autosomes et au chromosome X. Figure adaptée de Wormbook

La recombinaison permet l'échange de brins de chromatide entre chromosomes homologues et se fait par la formation de crossing-over. Elle se déroule aux stades pachytène tardif et diplotène. Les cassures double brin permettent la formation de ces crossing-over (Figure 13 A). Plusieurs cassures double brin sont formées par chromosome par la topoisomérase SPO-11 (Dernburg et al., 1998). Cependant, seule une cassure par chromosome est sélectionnée pour initier la formation du crossing-over (Nabeshima et al., 2011), les autres cassures sont réparées par un mécanisme « non-crossover ». La régulation du nombre de crossing-over se fait par trois voies différentes : le « crossover assurance » qui assure la présence d'au moins un crossing-over par chromosome, et les deux mécanismes « crossover homéostasie » et « crossover interférence » qui empêchent la formation de crossing-over surnuméraires (Wang et al., 2015b). La recombinaison est faite entre deux chromatides non-sœurs appartenant à la même paire de chromosomes homologues et forme ainsi la jonction de holliday. La formation des crossing-over n'est pas aléatoire, elle se fait principalement dans les régions pauvres en gènes, dans la partie centrale des chromosomes (Barnes et al., 1995; Hillers and Villeneuve, 2003). La localisation du crossing-over détermine la forme en croix adoptée par les chromosomes appariés, celle-ci est permise par le désassemblage du complexe synaptonémal central en diplotène (Figure 13 A, B). Cette forme en croix est formée de bras longs constitués de l'appariement entre les chromatides sœurs et de bras courts constitués de l'appariement des chromosomes homologues.

En diakinèse les chromosomes adoptent une forme compacte, et l'on distingue les 6 chromosomes bivalents composés des deux chromosomes homologues (Figure 13 B). Cependant, ce remodelage des chromosomes débute dès le pachytène tardif, et fait intervenir les complexes Condensine I et II, composés de MIX-1, SMC-4, DPY-26, DPY-28, CAPG-1 pour Condensine I, MIX-1, SMC-4, HCP-6, CAPG-2 et KLE-2 pour Condensine II (Figure 4) (Csankovszki et al., 2009; Mets and Meyer, 2009). Ces complexes sont enrichis dans les noyaux de la lignée germinale et co-localisent partiellement avec l'ADN (Mets and Meyer, 2009). Les complexes Condensine I et II régulent de manière indépendante la localisation des crossing-over et leur fréquence (Mets and Meyer, 2009; Tsai et al., 2008). Ces deux complexes sont également requis pour la compaction axiale et longitudinale des chromosomes en pachytène, et leur absence entraîne l'allongement des chromosomes (Llères et al., 2017; Mets and Meyer, 2009). Le complexe Condensine II s'associe aux chromosomes en diplotène, son action de remodelage de la chromatine est requise pour la compaction et la résolution des chromosomes (Figure 14) (Chan et al., 2004; Csankovszki et al.,

2009; Hagstrom, 2002; Mets and Meyer, 2009). En diakinèse, Condensine II est localisée le long des bras courts et longs des chromosomes bivalents. L'absence de Condensine II à cette étape engendre des défauts de compaction. À l'inverse la déplétion des composants spécifiques de Condensine I n'induit pas de défauts dans la condensation ou l'individualisation des chromosomes homologues. De plus, Condensine I s'associe aux chromosomes uniquement dans l'ovocyte proximal après la rupture de l'enveloppe nucléaire et il est exclusivement localisé sur les bras courts des chromosomes (Collette et al., 2011; Csankovszki et al., 2009; Mets and Meyer, 2009; Tsai et al., 2008).

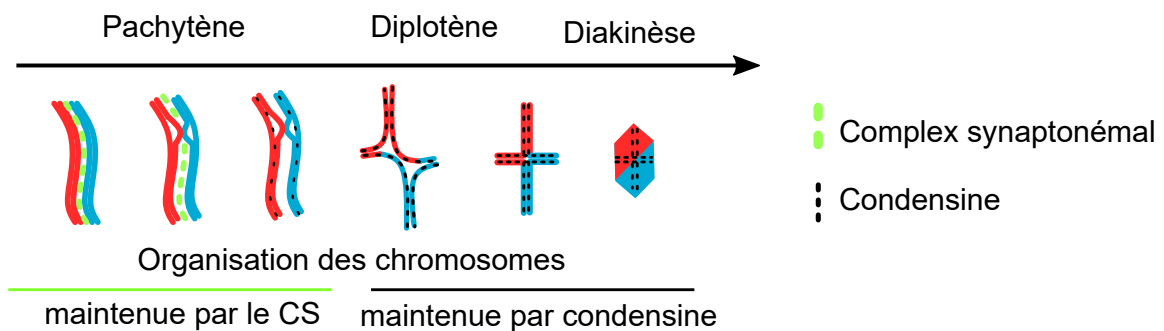


Figure 14| Réorganisation structurelle des chromosomes homologues depuis le stade pachytène jusqu'à la diakinèse

Schéma présentant la progression d'une paire de chromosomes homologues (rouge et bleu) au cours de la prophase I de méiose. Les chromosomes homologues sont composés chacun de deux chromatides sœurs. En pachytène, les chromosomes homologues sont maintenus par le complexe synaptonémal (en vert), un crossing-over est présent et divise les chromosomes en bras long et court. En diplotène le complexe synaptonémal se désassemble sur les bras longs. Les chromosomes homologues sont réorganisés autour du crossing over et sont compactés sous forme de croix, puis sous forme de bivalents hautement compacts en diakinèse. Les Condensines (HCP-6 et MIX-1) (point noir) s'enrichissent en pachytène et sont requises pour la compaction et la formation des bivalents en diakinèse. Condensine I est localisé uniquement sur les bras courts, tandis que Condensine II se localise sur les bras courts et longs. Figure adaptée de (Chan et al., 2004)

Condensine I et II possèdent des rôles distincts lors des deux divisions méiotiques : La déplétion de Condensine I n'induit pas de défauts de ségrégation des chromosomes homologues en méiose I, mais en induit en méiose II (Csankovszki et al., 2009; Hagstrom, 2002). À l'inverse, la déplétion de Condensine II induit la formation de ponts chromatiniens au moment des deux divisions de méiose (Figure 15) (Chan et al., 2004). Ces défauts sont plus sévères en méiose II qu'en méiose I (Chan et al., 2004). De plus, Condensine II possède un rôle majeur comparé à Condensine I, ceci est vrai aussi bien pour les divisions embryonnaires que dans la lignée germinale

(Hirano, 2016). Cette importance de Condensine II par rapport à Condensine I est rappelée par les phénotypes observés après déplétion des deux complexes : la déplétion de Condensine II est létale au stade embryonnaire, tandis que après la déplétion des sous-unités de Condensine I, les animaux sont viables.

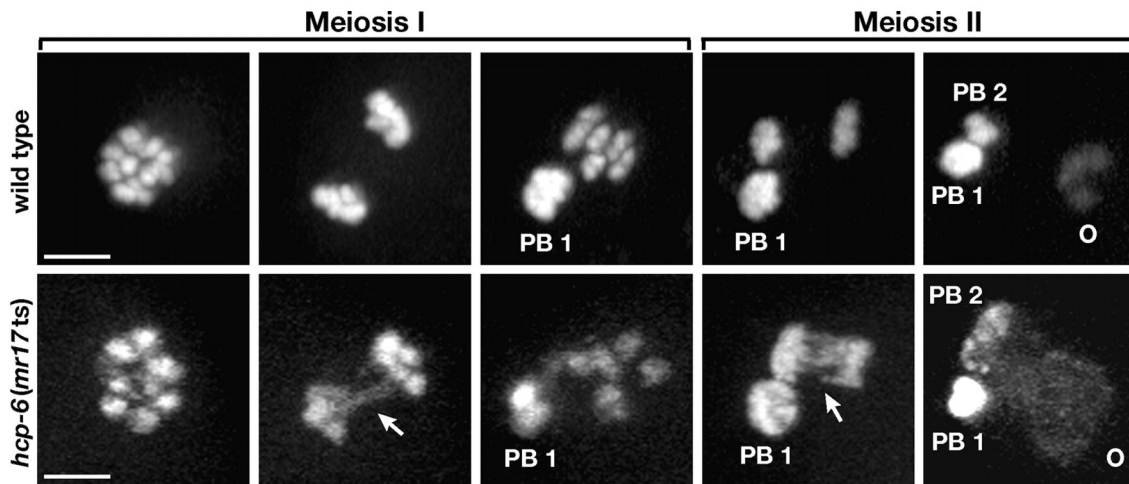


Figure 15 | Défauts de ségrégation des chromosomes en méiose I et II chez le mutant thermosensible *hcp-6(mr17)* (Condensine II)

Dans le zygote sauvage, les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique après la rupture de l'enveloppe nucléaire de l'ovocyte. Les chromosomes homologues se séparent en anaphase de méiose I ; un lot de chromosomes est éliminé dans le premier globule polaire (PB1). Les chromatides sœurs se séparent en méiose II ; un lot de chromatides est éliminé dans le second globule polaire (PB2). Les chromatides sœurs se décondensent pour former le pronoyau femelle (O). Dans les mutants thermosensibles *hcp-6(mr17)*, à la température restrictive de 25°C, des ponts chromatiniens connectent les chromosomes en anaphases I et II (flèches). Échelle : 5µm. Figure de (Chan et al., 2004).

3.3 Organisation de la chromatine chez *C. elegans*

3.3.1 Organisation des chromosomes

Les chromosomes de *C. elegans* et de la plupart des nématodes sont holocentriques, à l'inverse des vertébrés qui possèdent des chromosomes monocentriques. Les chromosomes monocentriques se définissent par l'assemblage de kinétochores à un site unique, dont la localisation est définie par la présence de chromatine centromérique. Au contraire, les chromosomes holocentriques se définissent par l'assemblage de kinétochores répartis tout le long du chromosome (Figure 16). Comme pour les chromosomes monocentriques, la formation d'une

structure particulière de chromatine centromérique est nécessaire pour l'assemblage des kinétochores des chromosomes holocentriques. Elle se fait par l'incorporation du variant d'histone H3 : CENPA/HCP-3 sur la face externe des chromatides sœurs (Sullivan, 2001 ; Buchwitz et al., 1999).

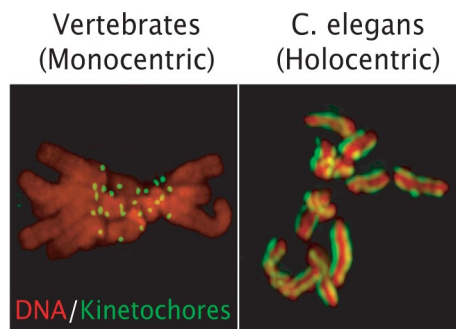


Figure 16| Structure monocentrique des chromosomes de vertébrés et holocentrique des chromosomes de *C. elegans*

Images de microscopie comparant la localisation des kinétochores (en vert) sur l'ADN (en rouge), chez les vertébrés (à gauche) ou chez *C. elegans* (à droite). Wormbook

Chez *C. elegans*, la composition en GC du génome est homogène sur l'ensemble des chromosomes (C. elegans Sequencing Consortium, 1998), contrairement à ce qui est observé chez les vertébrés et la levure (Dujon et al., 1994 ; Bernardi et al., 1985). Cette caractéristique est partagée avec l'araignée *Tetranychus urticae* une espèce possédant des chromosomes holocentriques (Grbić et al., 2011). Également, la densité en gènes est constante le long des chromosomes avec une densité plus faible sur le chromosome X (C. elegans Sequencing Consortium, 1998).

3.3.2 Conservation et répartition des marques d'histones

Les histones de cœur de *C. elegans* partagent 80 % d'identité en séquence nucléotidique avec leurs homologues chez l'humain (Vanfleteren et al., 1986 ; Vanfleteren et al., 1987a). Tout particulièrement, les histones H3 et H4 sont identiques à 97 % et 98 % avec les histones H3 et H4 humaines (Vanfleteren et al., 1987b ; Vanfleteren et al., 1987c). Tous les résidus associés à des modifications post-traductionnelles chez l'humain sont conservés chez *C. elegans*. Il est donc prédit que toutes les marques d'histones sont conservées chez *C. elegans* (Ho et al., 2014). Ceci en accord

avec la présence d'homologues de toutes les enzymes de modifications des histones (Tableau 1 et 2).

Des variants d'histones sont codées par le génome telles que H3.3 (Ooi et al., 2006) et CENPA (Buchwitz et al., 1999) pour l'histone H3, et H2AZ/HTZ-1 (Updike and Mango, 2006) pour l'histone H2. À noter que le gène codant le variant H2AX est absent du génome de *C. elegans*, alors qu'il est par ailleurs très conservé (Malik and Henikoff, 2003).

Concernant la méthylation de l'ADN, *C. elegans* ne possède pas d'enzyme (DNMT1/3) capable de méthyler la position 5 de la cytosine (5mC), et seule 0.0002 % des cytosines sont méthylées (Hu et al., 2015). En revanche, la méthylation à la position 6 de l'Adénine (6mA) est présente chez *C. elegans* (Greer et al., 2015), elle régule la réponse au stress mitochondrial de manière transgénérationnelle (Ma et al., 2019).

À l'échelle du chromosome, les régions distales et centrales ont des caractéristiques différentes. Les régions centrales des autosomes sont riches en gènes exprimés, les régions distales sont en revanche riches en gènes moins exprimés et en séquences répétées (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Liu et al., 2011). Cette répartition coïncide avec la répartition des marques d'histones le long des chromosomes. En effet, la marque H3K36me3 présente aux niveaux des gènes exprimés, est plus densément répartie dans la partie centrale des autosomes (Ho et al., 2014). À l'inverse, la marque H3K27me3 associée à l'hétérochromatine facultative est répartie sur les bras des chromosomes avec une faible densité dans la région centrale (Ho et al., 2014; Liu et al., 2011). La très grande majorité de la marque H3K9me3 associée à l'hétérochromatine constitutive se trouve dans les parties distales des chromosomes (Gu and Fire, 2010; Ho et al., 2014; Liu et al., 2011). Dans l'embryon et le sperme, les marques H3K36me3 et H3K27me3 occupent des domaines mutuellement exclusifs (Gaydos et al., 2012; Ho et al., 2014; Tabuchi et al., 2018). Des domaines bivalents contenant à la fois la marques H3K36me3 et H3K27me3 sont présents dans le sperme, au niveau d'un petit nombre de gènes qui sont impliqués dans la spermatogenèse (Tabuchi et al., 2018). Ces gènes sont également enrichis en H3K4me3 dans leur région codante.

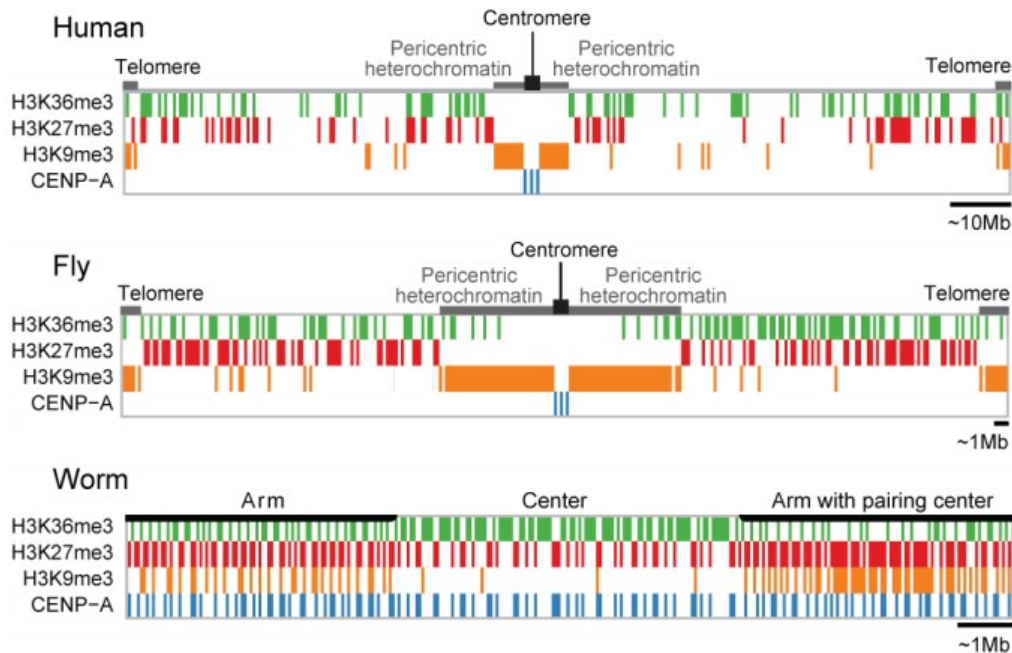


Figure 17| Organisation de la chromatine chez l'homme, la drosophile et *C. elegans*

Schéma de la distribution des marques d'histones le long des chromosomes chez l'homme (Cellule souche embryonnaire H1), Drosophile (Cellule S2) et *C. elegans* (Embryon). Chez la Drosophile et l'homme, la majorité de la marque H3K9me3 est localisée dans les régions péri-centromériques et télomériques, les domaines enrichis pour la marque H3K27me3 sont distribués le long des chromosomes et sont mutuellement exclusifs avec les domaines enrichis en H3K36me3 (chez l'humain quelques domaines bivalents contenant les deux marques H3K27me3 et H3K36me3 sont présents). CENP-A est présent au niveau des centromères. Chez *C. elegans*, La majorité de la marque H3K9me3 se localise dans les parties distales des chromosomes, H3K27me3 est enrichie tout le long du chromosome et sa répartition est corrélée négativement avec les domaines enrichis en H3K36me3. CENP-A est incorporé tout le long du chromosome généralement au niveau des domaines riches en H3K27me3. Figure tirée de (Ho et al., 2014)

Les marques H3K9me3 et H3K27me3 sont associées à des régions réprimées des chromosomes. Chez *C. elegans* ces deux marques peuvent colocaliser ce qui n'est pas le cas chez la drosophile ou l'homme (Figure 17). Cependant, ces régions ne sont pas exclusivement hétérochromatiques : des gènes exprimés se retrouvent intercalés entre des régions réprimées. Chez les organismes monocentriques l'hétérochromatine péri-centromérique est fortement enrichie en H3K9me3 et dépourvue d'autres marques (Ho et al., 2014). Une structure similaire est retrouvée chez *C. elegans*, celle-ci est également enrichie en H3K9me3, mais elle est aussi enrichie en H3K27me3. Cependant la marque H3K9me3 n'est pas concentrée dans un domaine particulier des chromosomes et ceci reflète l'organisation holocentrique des chromosomes de *C. elegans* (Figure 17) (González-Aguilera et al., 2014).

À l'échelle du gène, la répartition des marques est identique à celle retrouvée chez l'humain ou la drosophile (Ho et al., 2014; Liu et al., 2011). H3K4me3 est associée au TSS des gènes transcriptionnellement actifs ; H3K36me3 est associée à l'élongation de la transcription le long des gènes exprimés ; H3K27me3 et H3K9me3 sont enrichies au niveau des gènes réprimés.

3.3.3 Les complexes enzymatiques responsables de la méthylation de H3K4

Des complexes SET1/MLL sont responsables de la di- et tri- méthylation de H3K4 chez *C. elegans* comme chez d'autres espèces. Le complexe canonique contient 5 composants : une protéine à domaine catalytique SET qui contient l'activité de méthylation des histones , WDR-5, ASH-2 (Ash2L), RBBP-5 et DPY-30 (Beurton et al., 2018). La protéine catalytique peut être SET-2, orthologue de la protéine humaine SET1A/B ou SET-16 orthologue de la protéine humaine MLL3. Viennent s'ajouter des sous-unités spécifiques : CFP-1 et SWD-2.1 associées à SET-2 ; UTX-1 (déméthylase spécifique de H3K27me3/2) et PIS-1 associées à SET-16 (Vandamme et al., 2012). Ainsi les sous-unités canoniques et spécifiques forment le complexe SET-2/SET1, contenant la sous-unité catalytique SET-2, et SET-16/MLL, contenant la sous unité catalytique SET-16 (Figure 18).

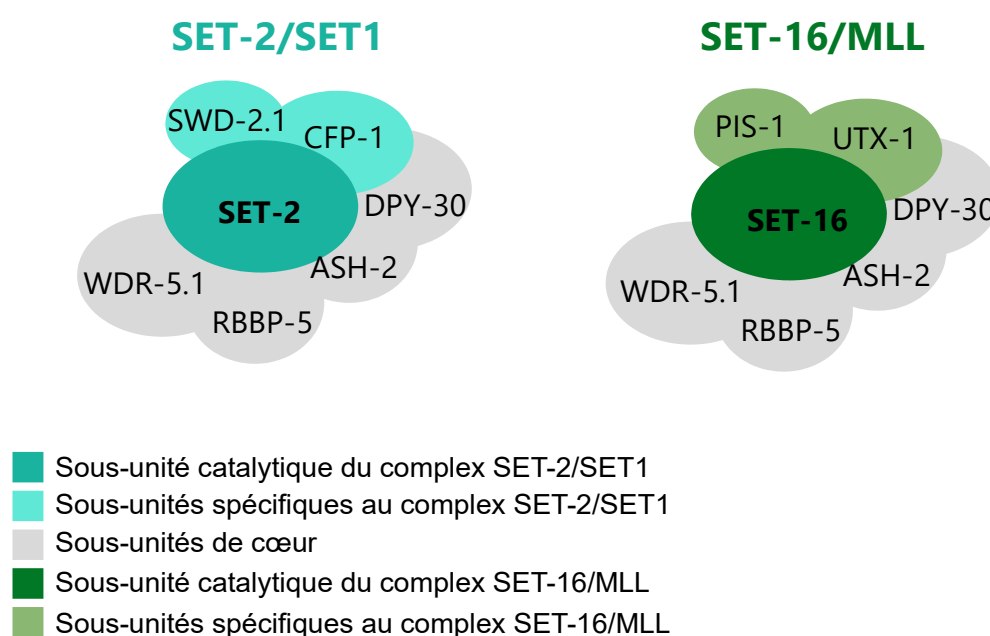


Figure 18| Composition des complexes SET-2/SET1 et SET-16/MLL chez *C. elegans*

SET-2 est responsable de la di- et triméthylation de H3K4 dans l'embryon et dans la partie distale de la lignée germinale (Li and Kelly, 2011; Simonet et al., 2007; Xiao et al., 2011). L'ensemble des membres du complexe participe à la déposition de ces marques. Toutefois, la spécificité de SET-2 et de SET-16 dans la méthylation de H3K4 n'est pas élucidée. En effet, le mutant nul de SET-16 est létal, il est donc difficile d'étudier ses fonctions. Toutefois, des expériences d'ARNi contre *set-16*, montre que SET-16 contribue pour 25 % à la triméthylation de H3K4 chez l'adulte (Fisher et al., 2010). Également, *in vitro* SET-16 possède une capacité de monométhylation de H3K4 (Fisher et al., 2010).

Historiquement, *set-2* a été découvert lors d'un crible génétique visant à identifier de nouveaux interacteurs des gènes impliqués dans la répression du chromosome X dans la lignée germinale. L'absence de *set-2* aggrave le phénotype de stérilité à effet maternel d'un mutant du gène *mes-3* dans lequel le chromosome X n'est plus correctement réprimé (Xu and Strome, 2001). Par la suite, le laboratoire a identifié *set-2* comme un suppresseur des phénotypes du mutant *hpl-2* qui code l'orthologue de la protéine HP1 : « Hétérochromatin Protein 1 » (Simonet et al., 2007). Un mutant nul de *hpl-2* présente divers phénotypes somatiques et germinaux, ainsi, l'absence d'ovocytes et le retard de développement dans ce mutant est restauré par l'absence de *set-2* (Simonet et al., 2007).

Le mutant nul de *set-2* (allèle *bn129*) ne présente pas de phénotypes embryonnaires ou somatiques évidents. Le laboratoire a mis en évidence que les mutants *set-2* deviennent stériles après plusieurs générations successives à 25°C ou à 20°C (Li and Kelly, 2011; Robert et al., 2014; Xiao et al., 2011). Le mutant *wdr-5.1* présente également ce phénotype. Le laboratoire a montré que la perte de fertilité à 25°C chez les mutants *set-2* et *wdr-5.1* était associée à la perte d'identité des cellules de la lignée germinale caractérisée par la disparition des P-granules (marqueur spécifique de la lignée germinale) et par l'expression de gènes et de marqueurs somatiques (Robert et al., 2014).

3.4 Régulation épigénétique dans la lignée germinale

Deux mécanismes importants de régulation épigénétique se produisent dans la lignée germinale de *C. elegans* : la régulation de l'expression du chromosome X, et la régulation de l'expression de certains gènes endogènes, d'éléments transposables (et autres éléments génomiques invasifs) par la voie des petits ARN (ARNpiwi) (partie abordée en Annexe 3).

Avant-propos sur les difficultés techniques pour l'étude de la lignée germinale

Grâce aux développements des techniques de ChIP et de NGS (Next Generation Sequencing), il est possible d'analyser la distribution génomique des marques d'histones. Chez *C. elegans*, la distribution des marques d'histones a été très majoritairement étudiée chez l'embryon (Ho et al., 2014) qui contient principalement des cellules somatiques, d'autres études ont utilisé des animaux au stade larvaire L3 (Liu et al., 2011) ou des adultes (dans lesquels la lignée comprend environ 1000 cellules et représente environ 50 % des noyaux) (Gu and Fire, 2010). Aujourd'hui, les difficultés techniques rencontrées pour isoler un grand nombre de noyaux germinaux rend difficile la description de la distribution des marques épigénétiques dans la lignée germinale de l'hermaphrodite. Malgré tout, l'équipe de Susan Strome a récemment publié un protocole pour isoler des spermatides qui ont ensuite servi à la réalisation de ChIP-seq (Tabuchi et al., 2018). Également, plusieurs équipes, dont celle de Francesca Palladino, sont en train de développer des techniques pour isoler du matériel nucléaire germinale à partir d'hermaphrodites. Actuellement, l'analyse, dans la lignée germinale de *C. elegans*, des marques d'histones et de leur fonction, repose essentiellement sur des techniques d'immunomarquage et d'analyse transcriptionnelle sur lignées germinales disséquées. Également, la comparaison de résultats obtenus à partir d'animaux sans ou avec lignée germinale permet d'obtenir indirectement des informations. Enfin, certains profils de marques et de protéines établis dans la lignée germinale, perdurent jusque dans les embryons précoces. Les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine à des stades précoces de l'embryogenèse peut ainsi permettre d'étudier la distribution des marques dans la lignée germinale (Furuhashi et al., 2010; Gaydos et al., 2012; Rechtsteiner et al., 2010).

3.4.1 La répression du chromosome X dans la lignée germinale

C. elegans existe sous deux formes : hermaphrodites et mâles. Les deux sexes diffèrent par leur chromosome X : l'hermaphrodite en possède deux (XX), tandis que le mâle n'en possède qu'un (XO). Il n'existe pas de chromosome Y chez *C. elegans*, la détermination du sexe se faisant par un dosage génique contrôlé par le ratio de chromosomes X et d'autosomes. Chez l'hermaphrodite, la double dose d'expression provenant du chromosome X est létale. Le mécanisme de répression du chromosome X est donc essentiel. Des mécanismes divers ont été adoptés pour maintenir un dosage génique équivalent entre les deux sexes chez de nombreuses espèces. Ainsi chez la drosophile, le chromosome X du mâle (XY) est deux fois plus exprimé pour obtenir une dose équivalente à celle des femelles (XX) (Meller and Kuroda, 2002) ; chez l'homme (et la

souris), de manière aléatoire un des deux chromosomes X est complètement inactivé (Plath et al., 2002). De manière intéressante, chez *C. elegans*, deux mécanismes différents ont évolué pour contrôler l'expression du chromosome X dans le soma et la lignée germinale respectivement. Dans le soma, chez l'hermaphrodite l'expression du chromosome X est divisée par deux pour obtenir un niveau d'expression du chromosome X équivalent à celle du mâle. Le complexe Condensine I^{DC} joue un rôle essentiel dans cette répression (voir partie 1.2.2). Dans la lignée germinale, le chromosome X est réprimé de manière globale dans les deux sexes (Figure 19). À noter, chez l'hermaphrodite, le chromosome X est ré-exprimé dans les ovocytes. Les mécanismes impliqués dans la répression du chromosome X dans la lignée germinale sont présentés ci-dessous.

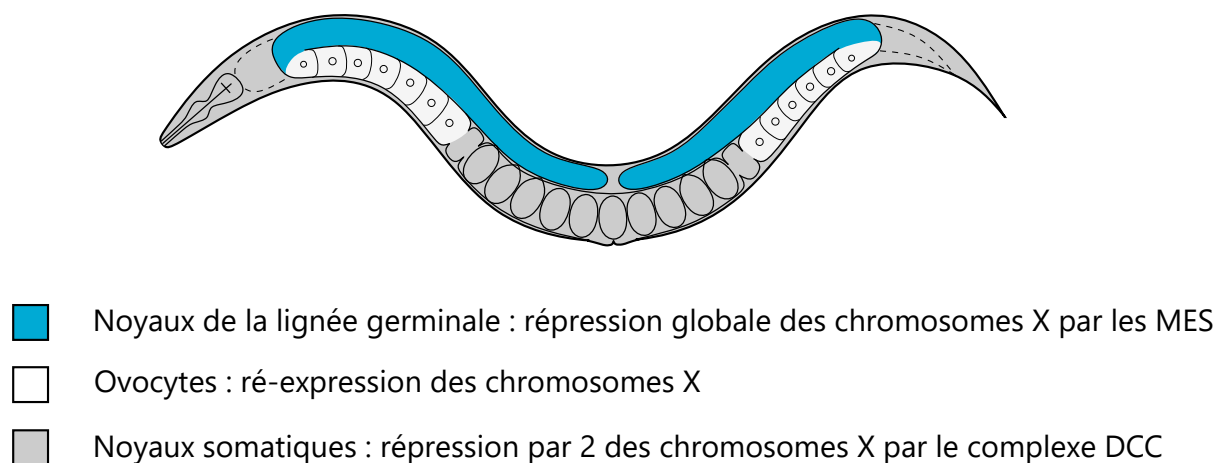


Figure 19| Stratégie de régulation du chromosome X chez l'hermaphrodite adulte

La compensation de dose a lieu dans les tissus somatiques et uniquement chez l'hermaphrodite (Gris). Cette régulation divise l'expression des chromosomes X par 2 pour obtenir une dose de chromosome X. Cette régulation est réalisée par le complexe DCC composé de Condensine I^{DC}, DPY-21, DPY-30 et SDC-1/2/3. La répression du chromosome X a lieu dans les noyaux de la lignée germinale (Bleu). Cette répression est effectuée par les protéines MES. Une ré-expression partielle du chromosome X se fait en diakinèse (Blanc). Figure adaptée de (Strome et al., 2014)

Répression globale du chromosome X dans la lignée germinale

Les premières évidences d'une répression du chromosome X dans la lignée germinale proviennent de l'étude de l'analyse du transcriptome d'adultes avec et sans lignée germinale, grâce à l'utilisation d'une mutation thermosensible du gène *glp-4*, qui empêche la prolifération de la lignée germinale lorsqu'il est inactivé (Reinke et al., 2000, 2004). Ces analyses montrent une asymétrie dans la répartition des gènes exprimés dans la lignée germinale entre chromosome X et

autosomes. Les gènes dont l'expression est enrichie dans la lignée germinale sont sous-représentés sur le chromosome X. À l'exception de gènes ovocytaires qui sont présents aussi bien sur le chromosome X que sur les autosomes. Par ailleurs des gènes dupliqués dont une copie est sur le X et l'autre sur l'autosome tendent à exprimer la copie autosomale dans la lignée germinale et la copie du chromosome X dans le soma (Maciejowski et al., 2005). Il existe donc une pression de sélection sur la localisation des gènes requis pour le développement de la lignée germinale. Le chromosome X offre un environnement peu favorable à leur expression, il contient essentiellement des gènes de ménage et d'ovogenèse.

Ces premières expériences de transcriptomique indiquaient une répression globale du chromosome X. Plus récemment, des données transcriptomiques obtenues sur lignées germinales disséquées montrent que le chromosome X n'est pas intégralement silencieux, certains gènes sont exprimés à des niveaux plus faibles que dans le soma (Gaydos et al., 2012; Tabuchi et al., 2011; Wang et al., 2009). Ces observations sont confirmées par l'analyse transcriptomique sur des lignées germinales contenant uniquement la partie mitotique et méiotique mais n'incluant pas les ovocytes. Dans ces analyses, 15 % des gènes du chromosome X sont exprimés (Tabuchi et al., 2011).

Répartition des marques d'histones dans la lignée germinale

L'étude de (Kelly et al., 2002) analyse, par immunofluorescence, la répartition de quelques marques le long des bras de gonades mâles et hermaphrodites. Cette première comparaison a mis en évidence l'existence de profils de marques différents entre le chromosome X et les autosomes. D'autres observations viennent confirmer et étayer ces premières observations avec l'analyse d'autres marques. Le chromosome X est enrichi en marques associées à la répression de la transcription, tandis que les autosomes sont enrichis en marques associées à l'activation de la transcription (Figure 20). Ainsi, le variant d'histone H3.3 et la di- et tri- méthylation de H3K4 sont présents sur les autosomes mais exclus du chromosome X jusqu'au stade diplotène (Arico et al., 2011; Bean et al., 2004; Delaney et al., 2018; Fong et al., 2002; Kelly et al., 2002; Ooi et al., 2006; Papazyan et al., 2014; Reuben and Lin, 2002). La di- et tri- méthylation de H3K36 sont présentes sur les autosomes et exclues du chromosome X à tous les stades jusqu'à la première division de l'embryon (Bender et al., 2006; Gao et al., 2015; Kreher et al., 2018). Les marques acétylées des histones sont absentes du chromosome X jusqu'au stade diplotène ; sur les autosomes, une diminution de l'acétylation se fait dans la zone de transition (Fong et al., 2002; Gao et al., 2015; Garrigues et al., 2015; Kelly et al., 2002; Tabuchi et al., 2011).

Au contraire, la marque répressive H3K27me3 est présente sur les autosomes, mais elle est enrichie sur le chromosome X (Papazyan et al., 2014). Confirmant l'état réprimé du chromosome X dans la lignée germinale, la phosphorylation des serines 2 et 5 de l'ARN polymérase II est présente sur les autosomes et absente du chromosome X jusqu'au stade diplotène (Bender et al., 2004; Fong et al., 2002; Kelly et al., 2002). Chez l'hermaphrodite, d'autres marques, telles que H3K23me2, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2, ne diffèrent pas entre le chromosome X et les autosomes (Bender et al., 2004; Bessler et al., 2010; Kelly et al., 2002; Kreher et al., 2018; Papazyan et al., 2014).

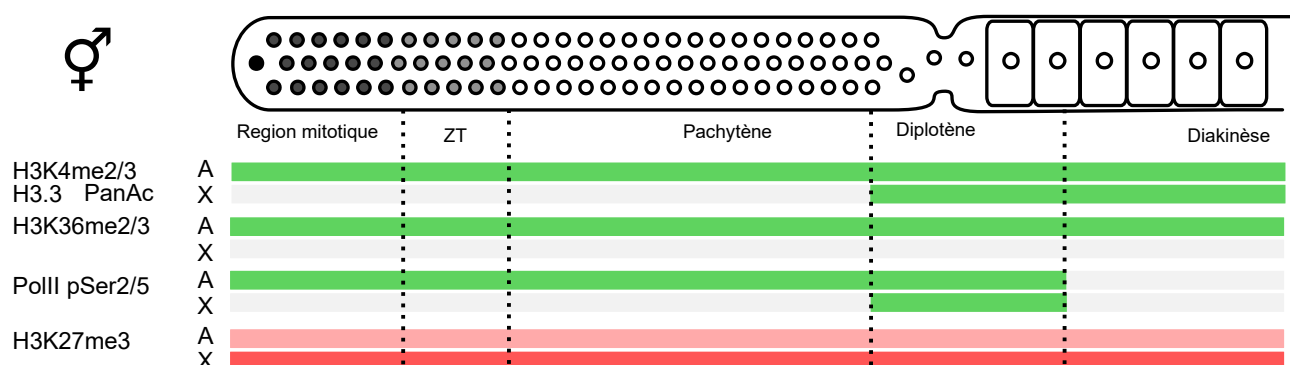


Figure 20| Répartition des marques d'histones sur les autosomes et le chromosome X dans les différentes régions de la lignée germinale

Les marques H3K4me2/3, le variant H3.3 et les marques acétylées des histones (PanAc) sont présents sur les autosomes et absents du chromosome X jusqu'au stade diplotène. Les marques H3K36me2/3 sont absentes du chromosome X et présentes sur les autosomes. La marque H3K27me3 est présente sur les autosomes et le chromosome X et elle est enrichie sur ce dernier. L'ARN polymérase II est phosphorylée pour la sérine 2 et 5 (forme active de la polymérase II) sur les autosomes et sa forme phosphorylée est absente du chromosome X jusqu'en diplotène. Puis sa forme phosphorylée est absente de tous les chromosomes en diakinèse.

Mécanisme de régulation du chromosome X par les protéines MES

Le mécanisme moléculaire de répression du chromosome X fait intervenir les gènes *mes* (Maternal Effect Sterile). Les mutants *mes* présentent une stérilité à effet maternel : le phénotype de stérilité ne se révèle pas dans la première génération mutante homozygote, mais apparaît dans leur descendance. Quatre de ces gènes : *mes-2*, *mes-3*, *mes-4* et *mes-6* ont été identifiés comme intervenant dans la répression du chromosome X. Leur expression dans la lignée germinale promeut la survie et le développement des cellules germinales de leur descendance (Capowski et al., 1991; Garvin et al., 1998; Paulsen et al., 1995).

MES-2, MES-3 et MES-6 sont les composants du complexe PRC2 (pour « Polycomb Repressive Complex 2 ») de *C. elegans*. MES-2 et MES-6 sont respectivement les orthologues de E(Z) (Enhancer of zest) et ESC (extra sex combs), MES-3 est spécifique à *C. elegans* (Bender et al., 2004; Ketel et al., 2005; Xu et al., 2001). MES-2 contient le domaine SET catalytique, et réalise la di- et tri-méthylation de H3K27 ; MES-6 et MES-3 sont requis pour son activité *in vitro* (Ketel et al., 2005). H3K27me3 est retrouvée enrichie sur le chromosome X comparé aux autosomes (Figure 21) (Bender et al., 2004). Les descendants de mères mutantes *mes-2*, *mes-3* et *mes-6*, acquièrent sur leur chromosome X des marques associées à la transcription (H3K4me2/3 et acétylation des histones) ainsi que la forme active de la polymérase II (Bender et al., 2004; Fong et al., 2002). Ceci suggère que le complexe MES-2/3/6 participe à la répression du chromosome X.

MES-4 a une activité de di- et tri-méthylation de H3K36, grâce à son domaine SET. MES-4 n'interagit pas physiquement avec MES-2/3/6 (Bender et al., 2006). MES-4 est associée aux autosomes et elle est absente de la très grande majorité du chromosome X (Fong et al., 2002). Les expériences de ChIP réalisées sur des embryons précoces montrent que, contrairement aux autosomes, le chromosome X est dépourvu de la marque H3K36me3 et de MES-4. Seules les 300 premières kilobases à gauche du chromosome X présentent un profil de marques identique à celui des autosomes avec une alternance de blocs de H3K27me3 et H3K36me3, ainsi que la présence de MES-4 (Furuhashi et al., 2010; Gaydos et al., 2012; Rechtsteiner et al., 2010).

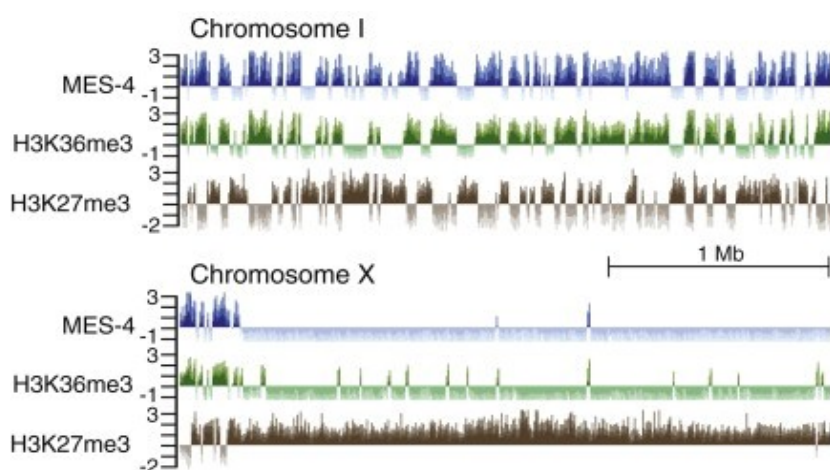


Figure 21| Distribution génomique de MES-4, H3K36me3 et H3K27me3

Score de ChIP normalisé de MES-4, H3K27me3 et H3K36me3 sur les 3Mb de l'extrémité gauche du chromosome I et du chromosome X. Figure tirée de (Gaydos et al., 2012)

Le rôle de MES-4 dans la répression du chromosome X a été établi par des expériences de transcriptomique sur lignée germinale de mutants *mes-4* (Bender et al., 2006; Gaydos et al., 2012; Tabuchi et al., 2014). Celles-ci montrent une surexpression des gènes localisés sur le chromosome X en l'absence de MES-4.

Le modèle actuel de répression du chromosome X dans la lignée germinale est le suivant : la méthylation de H3K36, réalisée par MES-4 sur les autosomes, repousse l'activité de MES-2/3/6 et la concentre sur le chromosome X (Figure 22) (Strome et al., 2014). Ce modèle est conforté par l'observation que la marque H3K27me3 se propage sur les autosomes et diminue sur le chromosome X en l'absence de MES-4 (Gaydos et al., 2012).

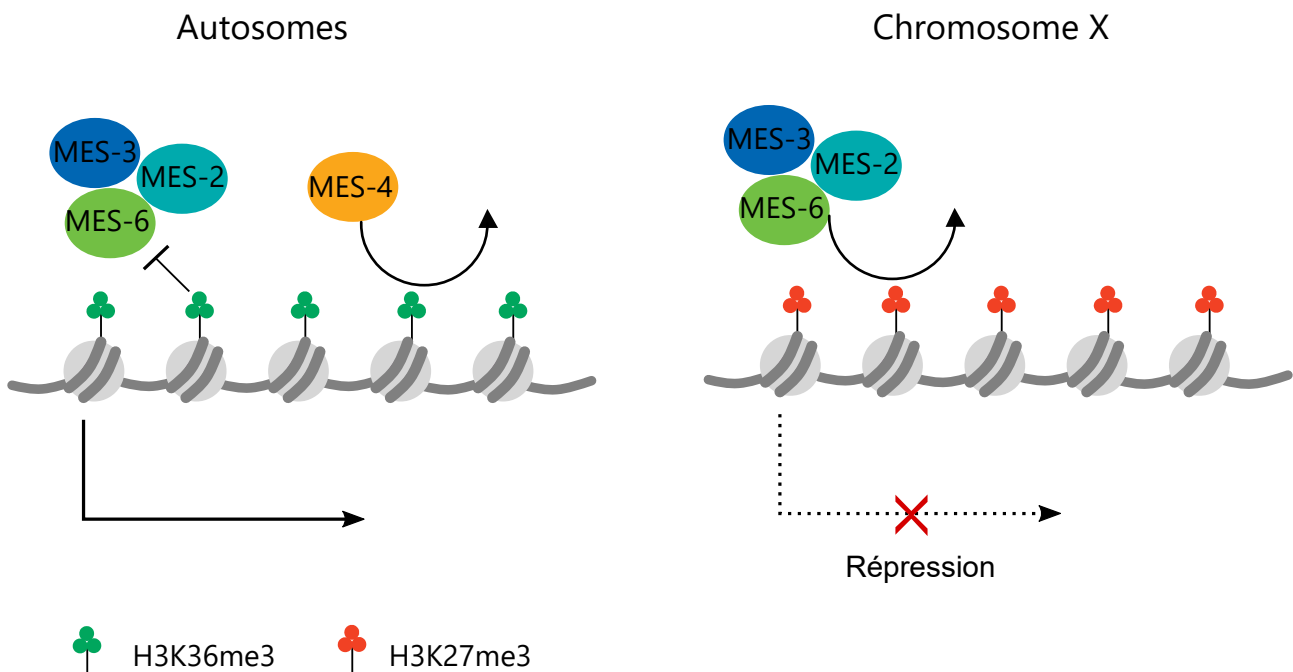


Figure 22 | Modèle de régulation du chromosome X par les protéines MES

Sur les autosomes, MES-4 catalyse la méthylation de H3K36 et repousse le complexe MES-2/3/6 qui se concentre sur le chromosome X. Sur le chromosome X, MES-4 est absent, le complexe MES-2/3/6 génère alors la marque répressive H3K27me3 et réprime l'expression des gènes. Figure adaptée de (Strome et al., 2014)

Autres acteurs de la régulation du chromosome X

La répression du chromosome X dans la lignée germinale fait intervenir d'autres acteurs, comme MRG-1 : une protéine à chromodomaine. Tout comme MES-4, MRG-1 est requis pour la survie et la prolifération de la lignée germinale et réprime des gènes liés à l'X dans la lignée

germinale (Fujita et al., 2002; Takasaki et al., 2007). Par ailleurs, MRG-1 est localisée sur les autosomes indépendamment de la présence de MES-4.

D'autre part, le phénotype de stérilité de *mes-3* et *mes-4* est aggravé par la perte de SET-2 : les mutants *mes-3* ou *mes-4* deviennent stérile après deux générations à l'état homozygote. Après traitement ARNi contre *set-2*, les mutants *mes* deviennent stériles dès la première génération à l'état homozygote (Xu and Strome, 2001). Comment la perte de SET-2 et de la méthylation de H3K4 qu'elle catalyse aggrave le phénotype des *mes*, reste à élucider.

Enfin, la régulation du chromosome X fait également intervenir les membres du complexe DREAM (Dimerization partner, RB-like, E2F And Multi-vulval class B) de *C. elegans*. Ce complexe conservé régule l'expression de gènes dépendant du cycle cellulaire (Sadasivam and DeCaprio, 2013). Il semblerait que ce complexe protège l'expression de gènes liés à l'X dans la lignée germinale. La perte de LIN-54 (orthologue de LIN54) et des autres composants du complexe, provoque une sous-expression des gènes du chromosome X dans la lignée germinale (Tabuchi et al., 2011, 2014). Comparable à MES-4, les composants du complexe DREAM sont localisés sur les autosomes par immunofluorescence (Tabuchi et al., 2011). LIN-54 et MES-4 co-régulent l'expression de gènes de la lignée germinale de manière opposée (Tabuchi et al., 2014). Il semble donc exister une balance entre répression et expression du chromosome X qui est nécessaire au bon fonctionnement de la lignée germinale.

3.4.2 l'inactivation des régulateurs épigénétiques est associée à une perte progressive de l'immortalité de la lignée germinale

Le maintien de la lignée germinale au cours des générations est critique pour la survie de l'espèce. Les cellules de la lignée germinale contiennent l'information génétique qui est transmise d'une génération à l'autre et pour cette raison sont considérées comme immortelles. Chez *C. elegans* il est possible d'étudier l'immortalité de la lignée germinale en étudiant des mutants qui possèdent initialement un niveau de fertilité normale mais qui décroît au cours des générations pour devenir stériles, ce phénotype est nommé « mortal germline » (*mrt*) (Figure 23). Ce phénotype est retrouvé dans différentes catégories de mutants : des mutants impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN, dans la voie de régulation des petits ARN et chez des mutants d'enzymes modifiant les histones. À noter que le protocole utilisé pour définir le phénotype *mrt* varie d'un laboratoire à l'autre : le nombre d'animaux transférés à chaque génération (de 1 à 6) et la durée

entre chaque transfert (avant ou après la disparition du tapis bactérien) sont toujours soumis à débat (Ahmed and Hodgkin, 2000; Degtyareva et al., 2002; Youds et al., 2006).

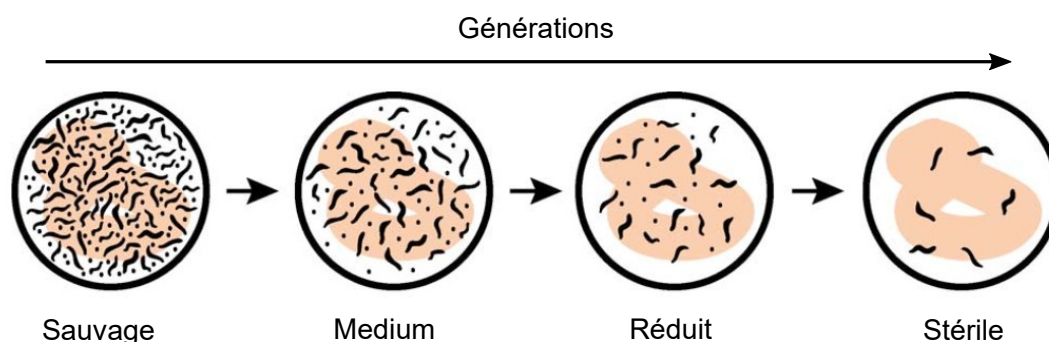


Figure 23| Représentation schématique du phénotype de stérilité progressive (*mrt*)

Boîte de pétri avec un tapis bactérien (orange), 6 animaux sont transférés à chaque génération. Chez les mutants *mrt*, le nombre de descendants diminue à chaque génération. Figure adaptée de (Smelick and Ahmed, 2005)

Les premiers mutants décrits, *mrt-1* et *mrt-2*, sont déficients pour la formation *de novo* des répétitions télomériques, et deviennent stériles après le raccourcissement des télomères et leurs fusions (Ahmed and Hodgkin, 2000; Meier et al., 2009). Les mutants *trt-1* codant la sous-unité catalytique de la télomérase, et les mutants *hus-1*, *hrp-17* et *rfs-1*, impliqués dans la réplication des télomères, présentent les mêmes défauts de stérilité progressive et de fusions chromosomiques et de raccourcissement des télomères (Boerckel et al., 2007; Hofmann et al., 2002; Meier et al., 2006; Yanowitz, 2008). Ceci suggère que la perte de fertilité est causée par la perte de l'intégrité du génome.

Des mutants qui augmentent la fréquence des dommages à l'ADN ou diminuent la fidélité de la réparation présentent un phénotype *mrt*. C'est le cas de *mre-11* impliqué dans la réparation des cassures double brin et la recombinaison homologe (Chin and Villeneuve, 2001); *msh-6*, *msh-2* (Degtyareva et al., 2002; Tijsterman et al., 2002), impliqués dans la réparation des mésappariements, *dog-1* impliqué dans la réparation des G-quadruplex (Cheung et al., 2002) et *him-6*, l'hélicase BLM (Youds et al., 2006); tous accumulent des mutations délétères qui résultent en une stérilité progressive.

Une autre catégorie de mutants qui présentent une stérilité progressive au cours des générations, sont les mutants de la voie de régulation des petits ARN (présentée en Annexe). À

noter que pour cette catégorie de mutants, le phénotype est dépendant de la température. Le mutant *prg-1* devient stérile mais ne présente pas de raccourcissement des télomères (Simon et al., 2014). Ceci implique que le mutant *prg-1* accumule des défauts autres. Également, *hrde-1/2*, *morc-1*, *rsd-2/6* et *nrde-1/2/3/4* et d'autres gènes qui sont tous impliqués dans la voie des petits ARN présentent un phénotype de stérilité progressive au cours des générations à 25°C (Buckley et al., 2012; Sakaguchi et al., 2014; Spracklin et al., 2017; Weiser et al., 2017). Ce phénotype est parfois associé à la ré-expression d'éléments transposables, comme pour les mutants *rsd-2/6* (Sakaguchi et al., 2014).

La dernière catégorie de gènes présentant un phénotype de stérilité progressive sont les gènes codant certaines histones méthyltransférases. Ainsi, les mutants de l'histone déméthylases de H3K4me2/me3 : LSD1/SPR-5 et les composants des complexes SET1/MLL tels que *set-2* ou *wdr-5.1*, voient leur fertilité décroître transgénérationnellement de manière thermosensible (Bessler et al., 2010; Katz et al., 2009; Li and Kelly, 2011; Xiao et al., 2011). Ceci semble indiquer que la régulation du niveau de méthylation de H3K4 est essentielle pour maintenir la fertilité au cours des générations. L'histone méthyltransférase MET-2 (SETDB1) qui catalyse la méthylation de H3K9 présente un phénotype *mrt*. De manière intéressante, le phénotype *mrt* des mutants *met-2* semble dépendre de *hrde-1* et de la transmission des petits ARN d'une génération à l'autre (Lev et al., 2019). Les animaux mutants pour *set-32* présentent une stérilité progressive à 25°C ; cette stérilité n'est pas observée chez les mutants *set-25*, bien que les deux protéines soient impliquées dans le maintien transgénérationnel de la répression par les petits ARN (Woodhouse et al., 2018). Par ailleurs, une mutation dans le gène *set-24*, qui code l'une des 34 enzymes à domaine SET chez *C. elegans*, a été associée à une stérilité progressive dans certains isolats naturels de *C. elegans* (Frézal et al., 2018).

4 Projet de thèse

Les marques épigénétiques sont d'importants modulateurs du développement et de la régulation des gènes. La fonction de ces marques, dont celle de la marque H3K4me3, est encore peu connue. Outre un rôle de H3K4me3 dans l'activation de la transcription qui est remis en question, d'autres rôles ont été proposés tels que dans la réparation de l'ADN et la mémoire transcriptionnelle. Au cours de ma thèse je me suis intéressée, dans le contexte de la lignée germinale chez *C. elegans*, au(x) rôle(s) de SET-2. L'absence de SET-2 et des composants du complexe protéique auquel elle appartient, résulte en une perte de fertilité progressive au cours des

générations. Chez les mutants *set-2*, la base moléculaire de ce phénotype reste inconnue. Dans la littérature, cette perte progressive de stérilité est observée chez (i) des mutants de la réparation de l'ADN ou (ii) des mutants qui affectent le fonctionnement de la voie des ARN interférents. Pendant ma thèse, je me suis demandée si le phénotype observé dans le mutant *set-2* était lié à la dérégulation de l'une de ces deux voies ou à un mécanisme distinct ? Pour répondre à cette question, j'ai consacré la première partie de ma thèse à étudier l'éventuelle implication de *set-2* dans la réparation des dommages de l'ADN. Ce travail a permis d'établir que les mutants *set-2* présentent une instabilité génomique. Cependant, cette instabilité génomique n'a pu être associée avec des défauts dans la réparation des dommages à l'ADN. L'hypothèse émise est que *set-2* jouerait un rôle au niveau structurel de la chromatine aux sites des cassures. Cette hypothèse, ainsi que des observations réalisées dans les cellules intestinales, m'a amenée à étudier une interaction génétique de *set-2* avec Condensine II dans la lignée germinale par des approches génétiques et de microscopie. Ceci a constitué le deuxième axe de recherche de ma thèse.

Des données récentes obtenues dans l'embryon par le laboratoire montrent que la sous-unité CFP-1 du complexe SET1/SET-2 est également présente dans un autre complexe modificateur de la chromatine : le complexe d'histones déacétylases SIN3/HDAC. Dans ce contexte, je me suis demandée si les complexes SET-2/MLL et SIN-3/HDAC pouvaient avoir des fonctions communes dans la lignée germinale de *C. elegans*. Dans un troisième axe, je me suis intéressée à l'étude du transcriptome de la lignée germinale des mutants *set-2*, *cfp-1* et *sin-3*. J'ai aussi cherché à identifier les phénotypes communs et propres à chacun de ces mutants.

Partie II – Résultats

1 Rôle des histones méthyltransférases SET-2 et MET-1 dans la stabilité du génome

1.1 Contexte des travaux de thèse

L'accumulation de dommages cellulaires variés et héréditaires pourrait contribuer à la stérilité progressive observée chez le mutant *set-2* (phénotype *mrt*). Ce phénotype de mortalité de la lignée germinale est retrouvé chez de nombreux mutants impliqués dans la signalisation ou la réparation des dommages à l'ADN. L'observation d'une sensibilité accrue du mutant *set-2* à des agents génotoxiques (Hydroxyurée, méthanesulfonate de méthyl, irradiations), nous a amené à étudier le rôle de *set-2* dans la stabilité du génome de la lignée germinale. Ces résultats suggèrent que l'absence de *set-2* pourrait introduire des mutations dans la lignée germinale au moment du processus de réparation de l'ADN. Ainsi l'accumulation de mutations diminuerait progressivement la fertilité au cours des générations.

Nous avons donc cherché à comprendre quels étaient les mécanismes moléculaires affectés par l'absence de *set-2*. Pour cela, nous avons étudié la voie de signalisation des dommages à l'ADN et le processus de réparation de l'ADN à des sites de cassure cibles. L'activation de la voie de signalisation des dommages à l'ADN n'est pas affectée par la perte de *set-2* et conduit bien à l'arrêt du cycle cellulaire des cellules mitotiques ou à l'apoptose des cellules méiotiques à un niveau équivalent au sauvage. Nous avons observé chez le mutant *set-2* un plus grand nombre de cassures double brin après irradiation mais qui sont éventuellement réparées plus tardivement.

Sur la base de ces résultats nous nous sommes demandé d'une part si l'utilisation respective de la réparation des cassures double brin par les mécanismes de réparation conservatif (recombinaison homologue) ou non-conservatif entraînant la formation de mutations (dont le Non-homologous End-joining : NHEJ) était modifiée en l'absence de *set-2*. D'autre part, nous nous sommes demandé si la qualité du processus de réparation non-conservatif était affectée. Nous avons induit, par CRISPR ou par excision d'un élément transposable, des cassures à des loci spécifiques et nous avons analysé les mécanismes utilisés pour leur réparation. Nous n'avons pas observé de différence d'utilisation des voies de recombinaison homologue par rapport à d'autres voies de

réparation non-conservatives. De plus, nous n'avons pas observé de différences dans la qualité de la réparation des cassures double brin. Enfin, nous avons réalisé le séquençage du génome pour savoir si le mutant *set-2* accumulait des mutations au cours des générations, ceci pouvant contribuer à la sensibilité accrue aux dommages de l'ADN. Ces expériences de séquençage après 30 générations successives n'ont pas permis de mettre en évidence une accumulation de mutations dans le mutant *set-2* comparé à des lignées maintenues à l'état hétérozygote pour cette mutation.

1.2 Contribution au manuscrit

Pour cet article, J'ai réalisé les expériences de séquençage après réparation de cassures double brin. Pour provoquer ces cassures, deux méthodes ont été utilisées : l'excision d'un élément transposable et CRISPR/Cas9. Les micro-injections des vers avec les plasmides contenant la séquence de l'enzyme Cas9 et de l'ARN guide ont été réalisées par Cécile Bedet et Valérie Robert. Par la suite, j'ai réalisé l'expérience d'accumulation de mutations sur 30 générations et l'extraction d'ADN génomique en vue d'un séquençage complet du génome. J'ai analysé les résultats de séquençage en collaboration avec Gaël Yvert et Claire Burny. Cette collaboration m'a permis de me former à l'analyse bio-informatique de données de séquençage. J'ai notamment appris à utiliser les outils d'analyse en ligne de commande sur serveur, à effectuer des analyses complémentaires sous le logiciel de programmation R (graphiques et tests statistiques), ainsi que les bonnes pratiques spécifiques aux projets d'analyse informatique. J'ai activement participé à la réflexion de l'analyse des variants. Par la suite, j'ai pu analyser un jeu de données de la littérature pour confirmer la pertinence des paramètres que nous avons utilisés, et ainsi valider notre approche. Cette analyse sera présentée à la suite de l'article.

D'autre part, j'ai amélioré la qualité des images de microscopie confocale pour l'expérience de fragmentation chromosomique après irradiation, ainsi que pour l'expérience d'activation de la voie ATM/ATR. Précédemment, l'analyse avait été effectuée sur des noyaux en leptotène, or à cette étape de la méiose, même en absence d'irradiation, la voie ATM/ATR semble activée constitutivement (Vermezovic et al., 2012, Figure 1.c, et mes observations). Ceci peut s'expliquer par la formation de cassures double brin nécessaires à la recombinaison méiotique à cette étape de la méiose (Dernburg et al., 1998). En revanche, en pachytène et en l'absence d'irradiation, la voie ATM/ATR n'est pas activée, mais elle l'est après irradiation. Par conséquent, j'ai refait ces expériences en me focalisant sur les noyaux en pachytène. Cette observation simplifie l'interprétation des expériences, puisque la quantification de la fluorescence entre conditions non-

irradiée et irradiée n'est plus nécessaire. Enfin j'ai participé à l'expérience de sensibilité à l'hydroxyurée avec Valérie Robert. Les autres expériences et analyses ont été réalisées par Valérie Robert, Marine Mercier, Fanny Michal et David Cluet.

1.3 Manuscrit

DNA Repair (Amst). 2017 Sep;57:139-150. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.07.007. Epub 2017 Jul 29.

The *C. elegans* SET-2/SET1 histone H3 Lys4 (H3K4) methyltransferase preserves genome stability in the germline.

Herbette M, Mercier MG, Michal F, Cluet D, Burny C, Yvert G, Robert VJ, Palladino F.

1.4 Analyse de données de séquençage du mutant *msh-6*

L'expérience d'accumulation de mutations sur 30 générations n'a montré aucune différence dans le nombre et la localisation de polymorphismes nucléotidiques (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), d'insertions ou de délétions (InDel) chez les lignées mutantes *set-2(bn129)* comparées aux lignées hétérozygotes. Dans ces conditions, nous avons questionné la capacité de notre « pipeline » bioinformatique à détecter une accumulation de variants. Pour valider notre approche, j'ai utilisé des données publiées dans la littérature. Au moment de faire cette analyse, plusieurs études avaient déjà utilisé des approches de re-séquençage du génome chez diverses espèces dont *C. elegans* pour étudier l'accumulation de mutations dans différents contextes (Segovia et al., 2015), notamment chez le double mutant *met-2; set-25* chez lequel la méthylation de H3K9 est affectée (Zeller et al., 2016), chez différents mutants des voies de réparation NER et BER de l'ADN (Meier et al., 2014), chez les mutants des polymérases translésionnelles (Roerink et al., 2014), chez le mutant de l'orthologue de FANCD1 qui est impliquée dans la réparation des G-quadruplex (Kruisselbrink et al., 2008). La plupart n'ont pas montré d'accumulation de variants au cours des générations. Pour l'étude du mutant *met-2; set-25*, les défauts accumulés relèvent d'une accumulation de copies de séquences répétées (CNV, Copy Number Variation) ou de grands réarrangements. Les mutants des voies du NER et BER accumulent des SNP uniquement après exposition à un agent mutagène. L'étude menée par Roerink et al. a utilisé le mutant *msh-6* impliqué dans la voie de réparation des mésappariements comme contrôle positif. Ce mutant accumule un très grand nombre de SNP et de petites insertions et délétions. L'absence de la protéine *msh-6* empêche la réparation de bases mésappariées (C-A, ou G-T) et a pour conséquence l'apparition d'une mutation après réplication de l'ADN. J'ai décidé d'utiliser ce jeu de données pour l'analyser avec le pipeline que nous avons développé. Par ailleurs, cette étude utilise le mutant *polh-1* qui code la polymérase η (translésionnelle) impliquée dans la réparation de lésion UV. Ce mutant présente autant de mutations que le sauvage, en revanche, la taille des délétions est plus

importante (Roerink et al., 2014, Figure 1). Il m’a paru intéressant d’analyser également le mutant *polh-1*, à la fois comme contrôle interne (le nombre de variants doit être similaire au sauvage) et pour savoir si notre pipeline est capable de détecter ce type de différence.

1.4.1 Étapes du Pipeline d’analyse des séquences

De manière générale, l’analyse de variants se fait suivant des grandes étapes qui sont similaires pour toutes les analyses (Doitsidou et al., 2016). La première étape consiste à réaliser un nettoyage des séquences, cette étape est importante pour la recherche de variants. Elle permet de retirer les séquences adaptatrices encore présentes et d’éliminer les bases de mauvaise qualité. La deuxième consiste à aligner les séquences sur le génome de référence et la dernière étape à appeler les variants et à les filtrer suivant différents critères selon le type d’expérience. Certaines sous-étapes peuvent varier d’une analyse à l’autre, de même, différents outils d’analyse sont disponibles pour une même étape. C’est le cas de l’alignement où il existe un grand nombre d’aligneurs : Bowtie2, BWA-mem, STAR entre autres. Chacun des outils a sa spécificité, BWA est plus adapté à l’alignement de longues séquences, STAR est adapté à l’alignement des données de RNAseq.

L’analyse que nous avons réalisée sur les données des lignées *set-2* et que j’ai appliquée aux données de Roerink et al., est présentée Figure 24 (Matériel et Méthodes). Brièvement, une analyse de contrôle qualité est réalisée et les séquences sont nettoyées en fonction. Les séquences sont alignées sur le génome de référence puis sont filtrées suivant des paramètres de qualité. Une étape de réalignement autour des insertions et délétions a été réalisée. Les variants sont découverts et filtrés : les variants présents dans la première génération (F1) sont retirés, ainsi que les variants présents dans plusieurs échantillons. Les variants sont également filtrés sur leur couverture et la qualité.

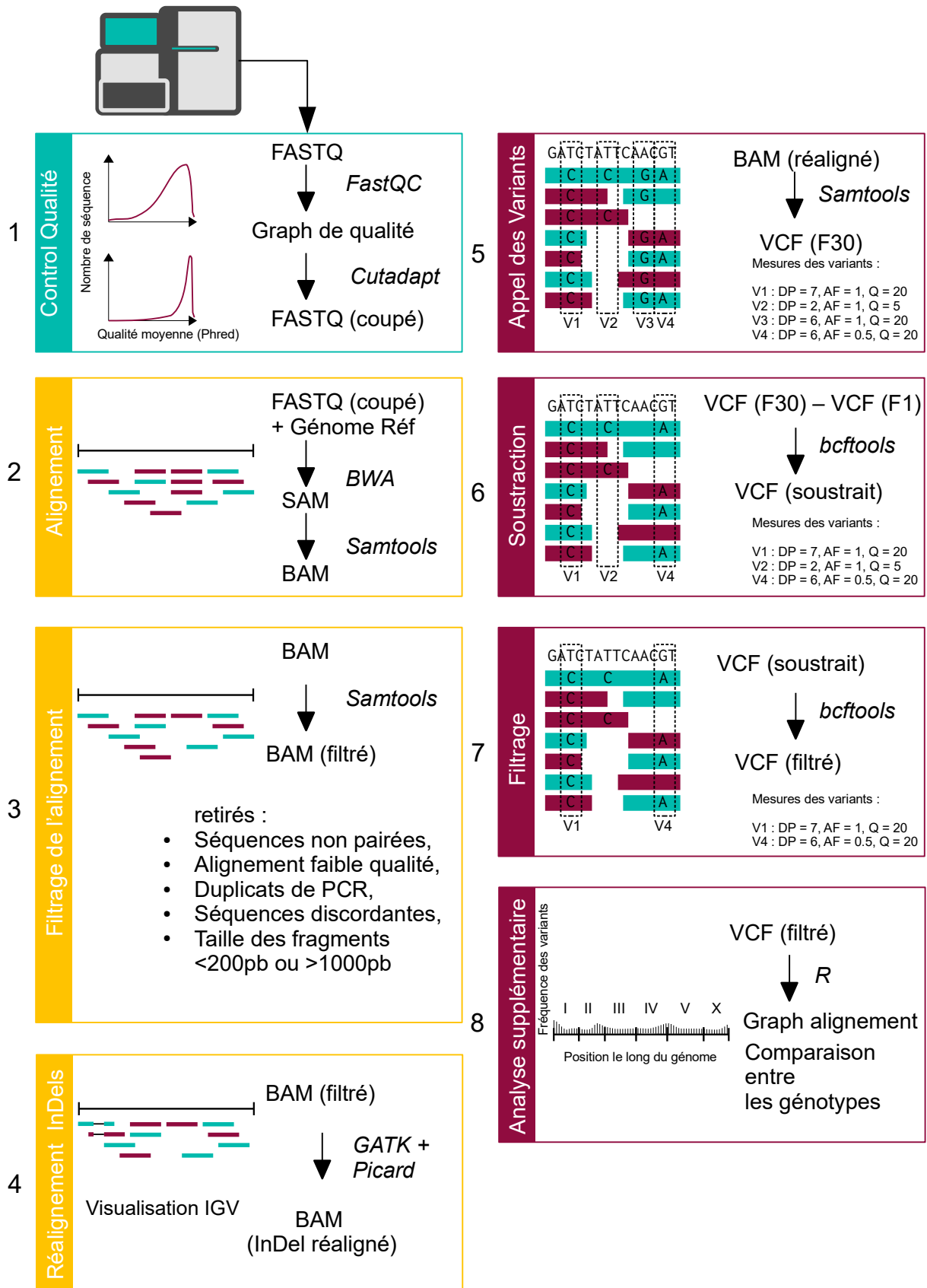


Figure 24|Pipeline d'analyse des données de séquençage

Légende page suivante

Représentation schématique des étapes (1 à 8) de l'analyse bio-informatique de données de séquençage. L'analyse commence par le nettoyage des fichiers FastQ provenant du séquenceur, puis la cartographie des séquences sur le génome de référence est nettoyée selon les paramètres indiqués et réalignée autour des insertions et délétions. Enfin une liste de variants est générée et filtrée. Les formats des fichiers générés à chaque étape sont mentionnés, ainsi que les outils utilisés (en italique) à chaque étape. Les mesures des variants sont illustrées pour les étapes 5 à 7. V1, V2, V3, V4 sont des variants. AF : fréquence allélique ; DP : nombre de séquences recouvrant le variant ; Q : qualité du variant. Figure adaptée de (Doitsidou et al., 2016).

1.4.2 Difficultés rencontrées

Les technologies pour générer les librairies diffèrent entre le sauvage et les mutants

Au cours de l'analyse de ce jeu de données, j'ai été confrontée à plusieurs difficultés. En effet, les librairies des deux répliques sauvages (N2) ont été générées avec la technologie Nextera, tandis que les librairies des mutants (*polh-1* et *msh-6*) ont été générées différemment par la technologie Truseq. L'utilisation de ces deux protocoles est visible dans les rapports qualités, par la contamination en adaptateurs de séquences différentes, spécifiques de chaque technique. Ces deux technologies diffèrent principalement dans la casse de l'ADN. La technologie de tagmentation (Illumina Nextera) utilise la transposase Tn5 qui coupe de manière aléatoire l'ADN (Steiniger et al., 2006). Dans le même temps cette enzyme ligue des adaptateurs aux fragments d'ADN (Adey et al., 2010). La technologie Truseq fragmente l'ADN de façon mécanique par ultrasons puis les séquences adaptatrices sont liguées. Les séquences adaptatrices pour chacune des deux techniques sont différentes.

Faible qualité des séquences pour les mutants

La qualité des séquences du sauvage est très bonne, la qualité des bases le long des séquences affiche un score de qualité supérieure à 30 (sur une échelle de 0 à 40) (Figure 25 A). À l'inverse, la qualité le long des séquences sens des échantillons *polh-1* et *msh-6* est faible (Figure 25 B), de plus des bases « N » indéterminées par le séquenceur sont présentes et constituent une deuxième difficulté (données non montrées). Ces deux éléments indiquent un problème au moment du séquençage, de la préparation de la librairie, ou au moment du remplissage/chargement de la Flow Cell (plaque en verre et acrylamide sur laquelle viennent s'attacher les fragments d'ADN). Le graphique de qualité moyenne des séquences en fonction de leur position sur la Flow Cell indique que les séquences de plus faible qualité sont regroupées et persistent sur plusieurs cycles (données non montrées). Ceci semble indiquer un problème de lecture souvent causé par la présence d'une bulle ou d'une poussière.

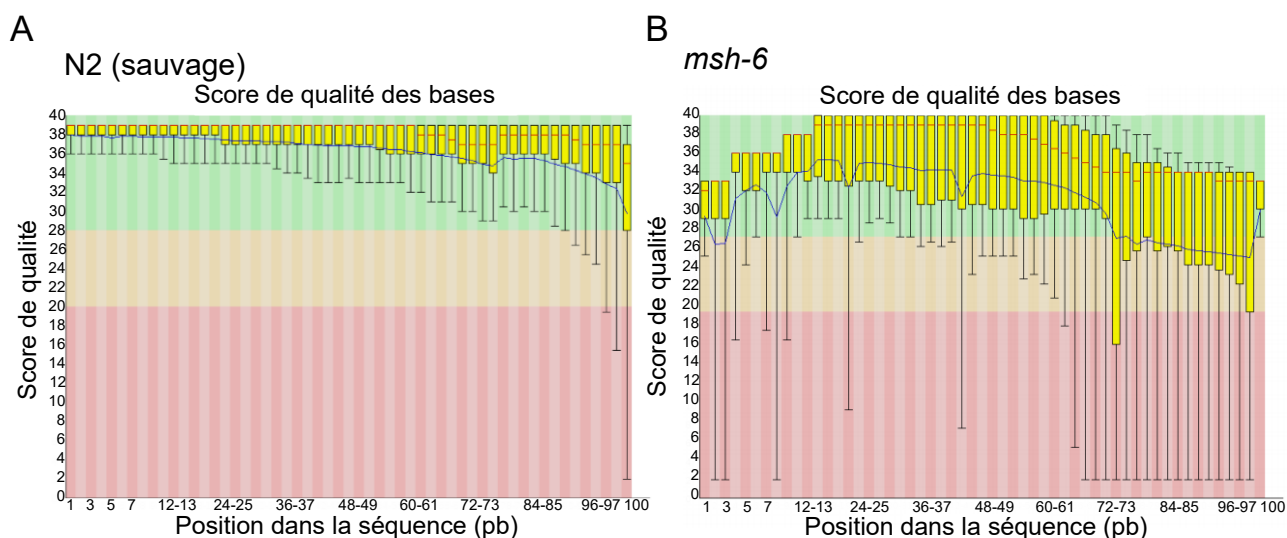


Figure 25| Qualité des bases le long des séquences

Exemple de diagramme en boîte de la qualité des bases le long de la séquence. Les bases de bonne qualité affichent un score entre 40 et 28. les bases de qualité moyenne sont situées entre 28 et 20, et de mauvaise qualité entre 20 et 0. (A) diagramme obtenu pour les séquences d'une lignée sauvage (N2). (B) diagramme obtenu pour les séquences d'une lignée mutante *msh-6* (identique pour les lignées mutantes pour *polh-1*). La version d'encodage est Sanger / Illumina 1.9.

Les paramètres de nettoyage que nous avons utilisés pour les données *set-2* ne sont pas utilisables pour ce jeu de données, car pour le sauvage, la librairie diffère et les séquences adaptatrices à retirer ne sont pas les mêmes. Il faut donc utiliser les séquences spécifiques à cette librairie. Pour les mutants *polh-1* et *msh-6* la faible qualité en milieu de séquence nécessite des paramètres adaptés. L'enjeu de ce nettoyage est de conserver un maximum de séquences de bonne qualité. J'ai examiné différentes stratégies de nettoyage des séquences. Finalement, j'ai éliminé la première et dernière base de toutes les séquences qui sont de bonne qualité. En effet, j'ai remarqué que les bases d'excellente qualité aux extrémités des séquences masquent les bases internes de plus faible qualité.

Les séquences sauvages ont été nettoyées comme indiqué dans la partie « Matériels et Méthodes ». Rétrospectivement, il aurait été plus judicieux d'utiliser le même protocole de nettoyage pour toutes les données, par exemple en retirant à la fois les séquences adaptatrices Nextera et Truseq pour tous les échantillons. La suite du pipeline est la même pour tous les échantillons, et je n'ai rencontré aucune difficulté dans l'alignement ou l'appel des variants. L'étape de soustraction des variants trouvés dans la génération F1 n'a pas pu être réalisée, car la première génération n'a pas été séquencée.

1.4.3 Résultats et conclusions

J'ai appliqué les filtres des variants sur les données de Roerink et al. Nous avons préféré filtrer sur la qualité des variants en retirant les variants d'une qualité inférieure à 10. De leur côté, Roerink et al. ont préféré retirer les variants avec une fréquence inférieure à 80 %. Ceci est plus strict, car les variants à l'état hétérozygote (fréquence de 50 %) sont retirés, alors que notre méthode permet de les conserver. Il m'a semblé également intéressant d'utiliser les filtres sur la fréquence des variants sur nos données (ainsi que sur les données de Roerink et al. en tant que condition contrôle).

Les résultats obtenus en utilisant un filtre sur la qualité montrent une grande quantité de variants (SNP et petits InDels) dans le mutant *msh-6* comparé au sauvage et à *polh-1* (Figure 26 A). La catégorie majoritaire de variants sont les SNPs pour le mutant *msh-6*. Concernant le mutant *polh-1*, on n'observe pas de différence avec le sauvage pour les trois catégories de mutations. L'utilisation du filtre sur la qualité n'a pas révélé de différence entre les mutants *set-2* homozygote et hétérozygote (*set-2/+*) (Figure 26 B et Figure 5 du manuscrit). En utilisant le filtre sur la fréquence, on obtient des résultats similaires avec ceux déjà publiés (Roerink et al., 2014), soit 20,2 SNPs par génération pour le mutant *msh-6* (Figure 26 C). Aucune différence n'est constatée entre le sauvage et le mutant *polh-1* comme montré par Roerink et al. Pour les données d'accumulation de mutations du mutant *set-2*, l'utilisation du filtre sur la fréquence ne révèle pas de différence entre les lignées homozygotes et hétérozygotes (Figure 26 D).

À noter que la catégorie majoritaire de variants sont les SNPs pour le mutant *msh-6* en utilisant notre méthode (Figure 26 A). En revanche elle est minoritaire avec la méthode de Roerink et al. (Figure 26 C). Ceci indique qu'un très grand nombre de SNPs sont à l'état hétérozygote, et que notre méthode permet leur détection.

Ces résultats nous permettent de valider notre méthode d'analyse : elle permet bien la détection d'accumulation de mutations. De plus, ces résultats confirment également l'absence de différence entre les lignées *set-2* et *set-2/+* en ce qui concerne les SNPs et InDels. L'ensemble des données pour chaque lignée avant et après filtrage est présenté en Annexe 1.

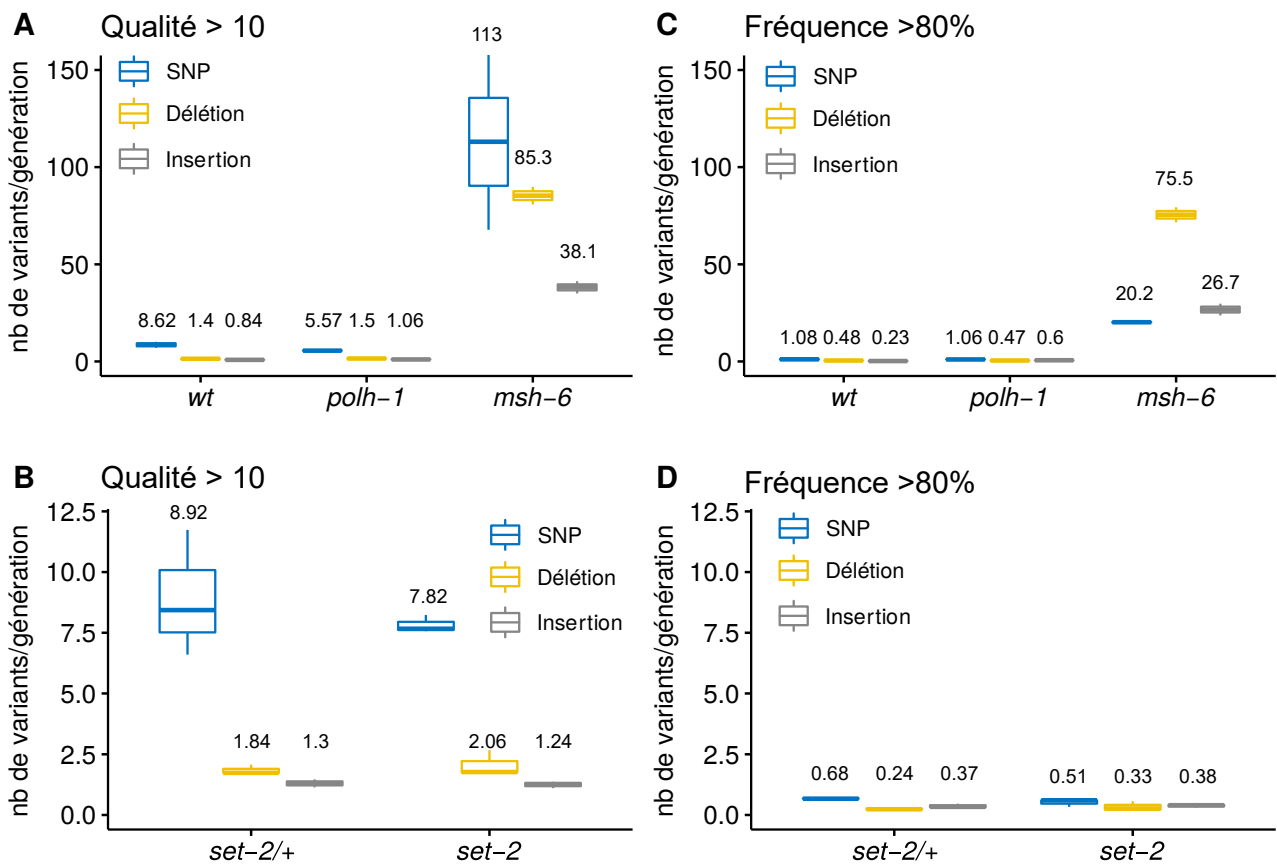


Figure 26| Nombre de SNPs, Insertions et délétions par génération après utilisation de différents filtres

(A,B) Nombre moyen de variants par génération pour les mutants *msh-6* et *polh-1* comparé aux sauvages. Les échantillons sont traités en filtrant sur la qualité (>10) (A) ou la fréquence (>80%) (B). (C,D) Nombre moyen de variants par génération pour les mutants *set-2* homozygotes (*set-2*) ou hétérozygotes (*set-2/+*), en filtrant les échantillons sur la qualité (>10) (C) ou la fréquence (>80%) (D). Les moyennes sont indiquées au-dessus des diagrammes en boîtes. Le nombre de SNP par génération est représenté en bleu, le nombre de délétions par génération en jaune et le nombre d'insertions par génération en gris.

Il nous a été proposé de ré-analyser nos données avec des outils pour détecter de grands réarrangements chromosomiques : délétions, inversions ou duplications. Cependant, la couverture de nos données est insuffisante pour ce type d'analyse.

1.5 Rôle de *met-1* dans la stabilité du génome

Cette partie est consacrée aux résultats que j'ai obtenus en étudiant la stabilité du génome dans 2 contextes mutants pour le gène *met-1*. Les résultats présentés sont pour la plupart préliminaires. Les premiers résultats ont été obtenus avec l'allèle hypomorphe *n4337* et n'ont pas toujours pu être répétés avec l'allèle nul *tm1738*. Ces observations m'ont amené à penser que des

mutations présentes dans le fond génétique du mutant *n4337* pouvaient être responsables des phénotypes observés. Pour cette raison, j’ai arrêté ce projet.

1.5.1 Contexte des travaux de thèse

Avant mon arrivé au laboratoire, des expériences de sensibilité aux irradiations ont été réalisées sur plusieurs mutants d’histones méthyltransférases. Ce test réalisé sur des vers au stade L4 permet de tester la capacité de réparation des cassures double brin des cellules en pachytène. 20 h sont nécessaires aux cellules en pachytène pour devenir un ovocyte capable d’être fécondé. Par conséquent, la létalité embryonnaire observée 24 h après irradiation indique la présence de cassures non réparées en méiose (Boulton et al., 2004). Une irradiation de 80 Gy diminue la viabilité embryonnaire des animaux sauvages à 50 % (Figure 27). Parmi les mutants d’histones méthyltransférases testés par notre équipe, le mutant *met-1(n4337)* a la plus forte sensibilité aux irradiations, avec une viabilité embryonnaire de 20 % (Figure 27). Cette sensibilité est accrue lorsque la dose d’irradiation est augmentée à 120 Gy.

La protéine MET-1 est une histone méthyltransférase impliquée dans la triméthylation de H3K36 dans la lignée germinale conjointement avec MES-4 (Maternal Embryonic Sterile) et agit aussi dans le soma (Lamelza and Bhalla, 2012 ; Andersen and Horvitz, 2007 ; Pu et al., 2015). Par ailleurs, l’équipe a montré que chez ce mutant, la transposition de l’élément transposable Tc1 est dérégulée (Résultats non montrés). La ré-expression des éléments transposables augmente leur transposition et provoque une instabilité génomique chez *C. elegans* (Padeken et al., 2015 ; Kasper et al., 2014) et chez de nombreux organismes (Hancks and Kazazian, 2016 ; Molaro and Malik, 2016 ; Czech and Hannon, 2016). D’autres caractérisations phénotypiques ont été réalisées sur ce mutant avant mon arrivée. Les mutants *met-1* ont un phénotype *mrt* à 25°C avec une stérilité apparaissant à la 17^e génération. Le nombre de descendants moyen par vers est réduit comparé aux sauvages (sauvage : 270 ± 17 et *met-1* : 197 ± 34.5), et 5 à 10 % des animaux sont stériles. Ces animaux stériles présentent des défauts de sperme (spermathèque vide, absence de spermatozoïdes).

Dans la littérature, la marque H3K36me3 est impliquée dans la réparation de l’ADN chez les cellules de mammifères (Li et al., 2013; Pfister et al., 2014; Supek and Lehner, 2017), ainsi que chez d’autres organismes (Hacker et al., 2016; Janevska et al., 2018). La perte de fonction des enzymes catalysant cette marque épigénétique est associée à différents types de cancers rénaux (Chiang et al., 2018; Kanu et al., 2015).

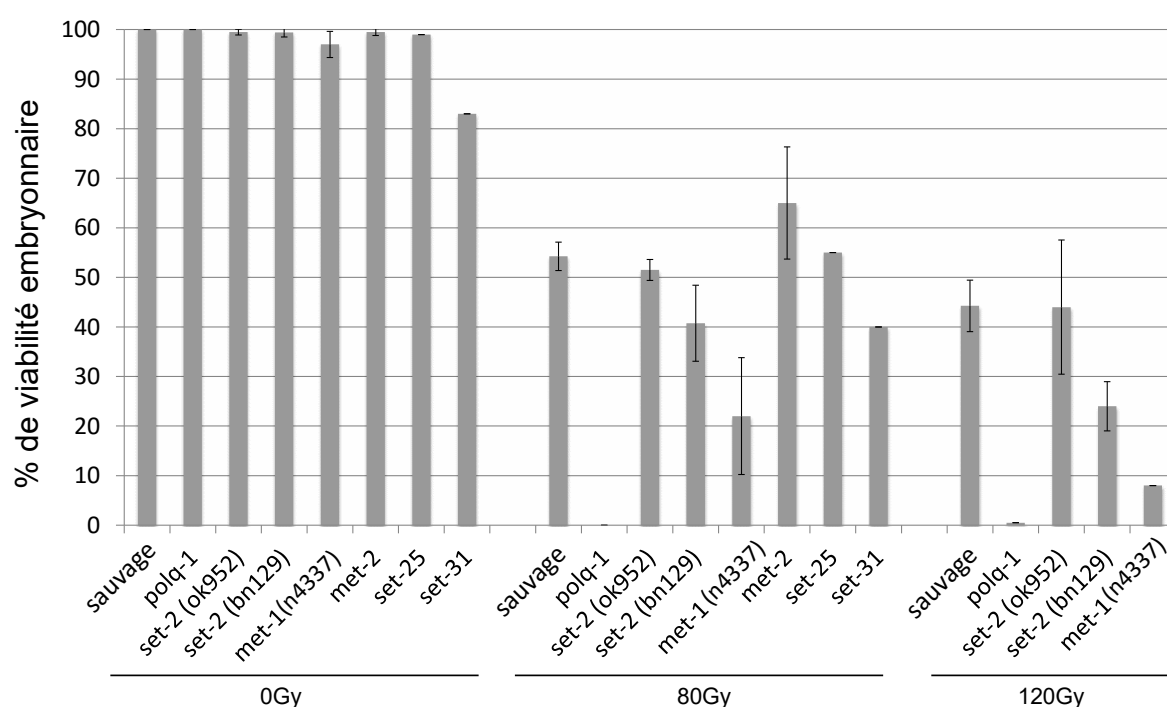


Figure 27 | Sensibilité des mutants d'histone méthyltransférase aux irradiations

Pourcentage de viabilité embryonnaire après irradiation gamma d'animaux au stade L4. Les doses utilisées sont indiquées : 0Gy, 80Gy, 120Gy. *met-2* (setdb1) et *set-25* catalysent la méthylation de H3K9, *set-31* est une protéine à domaine SET de fonction inconnue. Le mutant *polq-1*(we20) sert de contrôle positif.

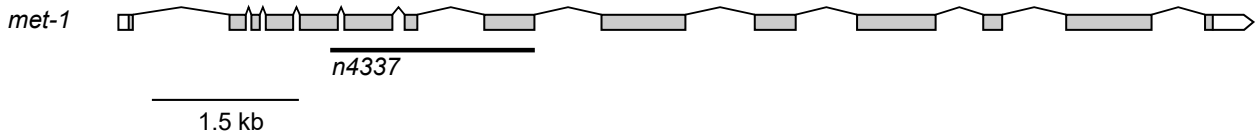
L'ensemble de ces résultats préliminaires, ainsi que des expériences réalisées chez les mammifères, suggèrent un rôle de la méthylation de H3K36 dans la stabilité du génome (Li et al., 2013; Pfister et al., 2014; Supek and Lehner, 2017). Au cours de la première année de ma thèse je me suis intéressée à cette question en utilisant l'ensemble des méthodes développées pour l'étude du rôle de *set-2* dans la stabilité du génome.

1.5.2 Caractérisation moléculaire de la mutation *n4337*

Les résultats préliminaires ont été obtenus avec l'allèle *n4337* décrit précédemment comme une délétion de 1860pb de l'exon 3 à 7 (Andersen and Horvitz, 2007). J'ai vérifié cette information en re-séquençant l'ADN génomique. J'ai observé une insertion de 24pb dans notre souche comparée à l'annotation faite de l'allèle *n4337* (Wormbase, Andersen and Horvitz, 2007). L'insertion présente un motif qui se trouve dans la séquence adjacente en 5', caractéristique d'une réparation par TMEJ (Polymerase Theta Mediated End Joining) (van Schendel et al., 2015, Koole et al., 2014). Dans ces conditions, on ne sait pas comment l'épissage des ARNm se fait et s'il en

résulte un décalage du cadre de lecture qui conduit, éventuellement, à l'apparition d'un codon STOP prématuré. Pour mieux caractériser cet allèle, nous avons séquencé les transcrits après transcription reverse des ARNm. L'insertion est également présente dans la séquence de l'ADN complémentaire. Additionnellement, 2pb de l'intron 8 sont incluses dans le transcrit. Cette insertion de 26pb après épissage des ARNm ne modifie pas le cadre de lecture du gène *met-1* (Figure 28 A). Le domaine catalytique SET, ainsi que les autres domaines fonctionnels (AWS, Post-SET, WW) de la protéine MET-1 se trouvent en aval de la délétion/insertion et nos résultats semblent indiquer que la protéine résultante conserve son domaine catalytique (Figure 28 B). Par ailleurs, par immunofluorescence, une protéine reconnue par des anticorps dirigés contre la protéine sauvage est détectée dans le mutant *met-1(n4337)* (communication personnelle de Susan Strome, et plus récemment (Kreher et al., 2018)). L'ensemble de ces résultats indique qu'une protéine de séquence proche de celle de MET-1 et conservant son domaine catalytique est traduite, et par conséquent, que cet allèle n'est pas un allèle nul.

A



B

MET-1 (sauvage)

MET-1 (*n4337*)

```
MFQRKVVLPKKRTEMVQTRRKTAQAAVQDGGAVKENAKPPAPQPTTK
RAKGRPPKIKTDANTLNPSTSSNLVDDKLLIESESQDSILTNEAD
SFLEKEVEEIEDSSDILPDKINSPEKPSVLVKRRSSRLKVKTDDEDE
KDPVPNIEVAVLEEKSIQIEPTSPAHPEDPQPSTSSLLPVEPIEDIV
EPNEPTSSADPPVSNIKDEDIKEEPLIKKPASDESESMDIANSESG
NDSDSSEADPRTIPSF SIPLPDTPTPPNFAKRGEIHVDVQKNSKQSG
ESQSPWERAREKSASNPSSPTMSRPRIHFLHPAYQSFTNDSVSPPLP
PPPPPEPAPAREKVENGGPTTFKMTFKKAANIPILKTSAPFQSSPPP
SSSVSSSISLSEVNSSTSIASESSPAKRSSNFDLTASNELPPQMVE
LPKLSFFNMPPAVRSAEDDSAMTSEEPILLRSPNSATPDDALFLT
TPPPPKMTESEIQALKVATEKVNQVIARREDSEKDVHRHREDDDYDR
RRDDRDRRSRKTDSENRDQGRQREDDERRAREREREVTKRHDRERE
EMRLQKQKDEERRKKDEEERIQKENEKKQKEDAKMEEEKKKIKEE
EMKIPEFELISESKYLTRNANKKTESLTCECHRTGGNCSDNTCVNR
AMLTECPSSCQVKCKNQRFACKKYAAVEAFHTGTAKGCGLRVAKDIK
KGRFIIIEYIGEVVERDDYEKRRTKYAADKKHKKHHYLCDTGVYIDAT
VYGNPSRFVNHSCDPNAICEKWSVPRTPGDVNRVGFSSKRFKAGEE
ITFDYQFVNYGRDAQQCFCGSASCSCGWIGQKPEEFSSDEDDDIVTTR
HINMDEEEEEKLEGLDHLGNHERNEVIKMDLDDLVRNKKHARKVIT
IASAMTDYSQRVDVIEQIFSSDTSVTVQKFYAKEGMATLMAEWLSED
DYSLDNLKLVQAILKALHTELFDSACKNDRLLRDSTSRVWNAKMEY
VDIQVIADSLIACVEDPVQYKDVCKVIEKGLVENFTRAKEMAYRLN
QYWFNRSVSFKIPKKIRDPVPKDVPRQEDATTSSQSHDSSRTVSP
NHRHHSSYSNSCYQEREPHSIRFFNNGNDVHQYRFGGYHGNNYNDN
YFSRRPNKDSYDRRRFNGRRSRSRSVSPQNYKRRKLDHEDNNHR
QRSPIRDRTSPGGEKTPSSNNGERNYKRLDIRGARIKTIKEDLEA
AAAAAAAAAVPSEVQAYPHEHTAVHQSVYQMPGYESYGVYDPVNGVY
MYPHPGAGYPPAYPQQPIMLTMDTLPNDRLGELYEKASIEQLAQR
DAIVRQELIRIQIERKTAQKEAIIAACRRANEEAAKRQEALAKTK
YVWAIKSEAGETYYNKITKETQWTAPTVPVQGLLEPACGASPDTTV
VIADEITEEQQAIEVLEKPRVKEEVIEPGSQSETQKESPEKVRVVV
PKVEVERSPSPKSSRDREKREKSREKDRERDRDRREGSKHRDSYHG
HRNGSSSVSERRMREFKHELERSSTRSAVRSRLQHQRDASSDKTTWL
KLIYREIFKRESAQSGFDYRFSENTDKKVKNYKSYIDRKLESNDLW
KEYSRP
```

```
MFQRKVVLPKKRTEMVQTRRKTAQAAVQDGGAVKENAKPPAPQPTTK
RAKGRPPKIKTDANTLNPSTSSNLVDDKLLIESESQDSILTNEAD
SFLEKEVEEIEDSSDILPDKINSPEKPSVLVKRRSSRLKVKTDDEDE
KDPVPNIEVAVLEEKSIQIEPTSPAHPEDPQPSTSSLLPVEPIEDIV
EPNEPTSSADPPVSNIKDEDIKEEPLIKKPASDESESMDIANSESG
NDSDSSEADPRTIPSF SIPLPDTPTPPNFAKR
[Deletion n4337 represented in grey]
SLRKEVFANCECHRTGGNCSDNTCVNR
AMLTECPSSCQVKCKNQRFACKKYAAVEAFHTGTAKGCGLRVAKDIK
KGRFIIIEYIGEVVERDDYEKRRTKYAADKKHKKHHYLCDTGVYIDAT
VYGNPSRFVNHSCDPNAICEKWSVPRTPGDVNRVGFSSKRFKAGEE
ITFDYQFVNYGRDAQQCFCGSASCSCGWIGQKPEEFSSDEDDDIVTTR
HINMDEEEEEKLEGLDHLGNHERNEVIKMDLDDLVRNKKHARKVIT
IASAMTDYSQRVDVIEQIFSSDTSVTVQKFYAKEGMATLMAEWLSED
DYSLDNLKLVQAILKALHTELFDSACKNDRLLRDSTSRVWNAKMEY
VDIQVIADSLIACVEDPVQYKDVCKVIEKGLVENFTRAKEMAYRLN
QYWFNRSVSFKIPKKIRDPVPKDVPRQEDATTSSQSHDSSRTVSP
NHRHHSSYSNSCYQEREPHSIRFFNNGNDVHQYRFGGYHGNNYNDN
YFSRRPNKDSYDRRRFNGRRSRSRSVSPQNYKRRKLDHEDNNHR
QRSPIRDRTSPGGEKTPSSNNGERNYKRLDIRGARIKTIKEDLEA
AAAAAAAAAVPSEVQAYPHEHTAVHQSVYQMPGYESYGVYDPVNGVY
MYPHPGAGYPPAYPQQPIMLTMDTLPNDRLGELYEKASIEQLAQR
DAIVRQELIRIQIERKTAQKEAIIAACRRANEEAAKRQEALAKTK
YVWAIKSEAGETYYNKITKETQWTAPTVPVQGLLEPACGASPDTTV
VIADEITEEQQAIEVLEKPRVKEEVIEPGSQSETQKESPEKVRVVV
PKVEVERSPSPKSSRDREKREKSREKDRERDRDRREGSKHRDSYHG
HRNGSSSVSERRMREFKHELERSSTRSAVRSRLQHQRDASSDKTTWL
KLIYREIFKRESAQSGFDYRFSENTDKKVKNYKSYIDRKLESNDLW
KEYSRP
```

Figure 28| Caractérisation de la séquence génomique de l'allèle *n4337*

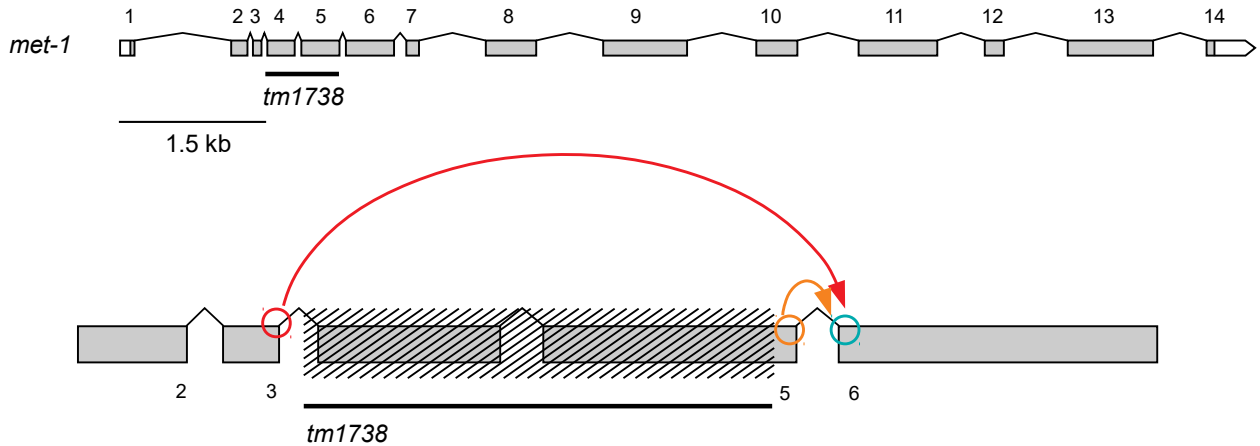
(A) Représentation schématique du gène *met-1*, de la délétion *n4337* (trait noir), de la protéine MET-1 sauvage et mutante *n4337*, de la position des domaines. (B) Séquence protéique de MET-1 sauvage et mutante MET-1(*n4337*), les domaines fonctionnels sont surlignés : en violet pour le domaine AWS (Associated with SET), en bleu pour le domaine SET, en vert pour le domaine postSET et en jaune pour le domaine WW. Pour la mutation *n4337*, les domaines fonctionnels sont conservés. En gris est représenté la délétion *n4337*. Les caractères en rouge représentent l'insertion de 9 acides aminés.

1.5.3 Caractérisation moléculaire de la mutation *tm1738*

Pour analyser le rôle fonctionnel dans la stabilité du génome de la protéine MET-1 et de la triméthylation de H3K36, j'ai cherché à utiliser un mutant nul pour lequel la fonction du domaine catalytique est affectée. Depuis peu, d'autres allèles de *met-1* sont disponibles, parmi lesquels la

délétion *tm1738*. Cet allèle est décrit comme une délétion de 656 pb allant de la fin de l'intron 3 jusqu'aux 9 dernières paires de base de l'exon 5. Pour vérifier ces informations, j'ai séquencé l'ADN génomique. Ce séquençage confirme la présence de la délétion aux bornes attendues. Le séquençage des ADN complémentaires montre que l'exon 5 est exclu de l'ARNm. Le cadre de lecture est décalé et un codon STOP apparaît à la position 117. La qualité du séquençage de l'ADN complémentaire est systématiquement faible après la délétion (pour 2 séquençages indépendants). J'ai supposé que, dans le contexte *tm1738*, il pouvait exister un transcrit alternatif qui gênerait la lecture de la séquence. En effet, les sites donneurs de l'intron 3 et de l'intron 5 pourraient entrer en compétition pour le site accepteur de l'exon 6 (Figure 29 A) (les sites accepteurs de l'exon 4 et 5 sont délétés). Pour vérifier cette hypothèse, j'ai dessiné une amorce couvrant la jonction entre l'exon 5 et 6. Les données de séquençage montrent qu'un tel transcrit existe et que celui-ci retient l'intron 3 dans lequel plusieurs codons STOP sont présents. Les deux transcrits que j'ai pu détecter dans ce mutant codent des protéines de 87 et 117 acides aminés qui ne contiennent pas de domaine fonctionnel (Figure 29 B). Ce mutant peut donc être considéré comme un mutant nul de *met-1*.

A



B

MET-1 (sauvage)

MET-1 (*tm1738*)

MFQRKVVLPKKRTEMVQTRRKTAQAAVQDGGAVKENKAKPPAPQTPTK
 RAKRGRPPKIKTDANTLNPSTSSNLVDDKLLIESESQDSILTNEAD
 SFLEKEVEEIEDSSDILPDKINSPEKPSVLKRRSSTRLKVKTDDEDE
 KDVPVNIIEVAVLEEKSIQIEPTSPAHPEDPQPSTSSLPLVEPIEDIV
 EPNEPTSSADPPVSNIKDEDIKEEEPLIKKPASDESESMDIANSESG
 NDSSESADPRTIPFSFIPLDTPPPNFAKGEIHVDVDQKNSKQSG
 ESQSPWERAREKSASNPSSPTMSRPRIHFLHPAYQSFTNDSVSLP
 PPPPEPAPAREKVENGPTTFKMTFKKAANIPILKTSAFEQPSPPP
 SSSVSSSISLSEVNSSTSIASESPAKRSSNFDLTASNELPPQMVE
 LPKLSFFNMPPAVRSAEDDSAMTSEEPILLRSPNSATPDDALFLT
 TPPPCKMTESEIQALKVATEKVNQVIARREDSEKDVHRREDRDDYDR
 RRRDRRRSRKTDSENRDQGRQREDDERRAREREREVTKRHDRE
 EMRLQKQKDEERRKKDEEERIQKENDKQKDEAKMEEKKKKIKEE
 EMKIPFELISESKYLTRNANKKK**TESLTCECHRTGGNCSDNTCVNR**
AMLTECPSSCQVKCKNQFAKKKYAAVEAFHTGTAKGCLRAVKDIK
KGRFIIIEYIGEVVERDDYEKRRTKYAADKKHKKHHYLCDTGVYIDAT
VYGNPSRFVNHSCDPNAICEKWSVPRTPGDVNRVGGFFSKRFKAGEE
ITFDYQFVNYGRDAQCFCGSASCSSGWIQKPEEFSSDEDDDIVTTR
 HINMDEEEEEKLEGLDHLGNHERNEVIKMDLDDLVI RNKKHARKVIT
 IASAMTDYSQRVDVIEIFSSDTSVTVQKFYAKEGMATLMAEWLSED
 DYSLDNLKLVAAILKALHTELFDSKAKNDRLLRDSTSRWVNAKMDEY
 VDIQVIADSLIACVEDPVQEYKDVCKVIEKGLVENFTRAKEMAYRLN
 QYWFNRSVSFKIPKIRDPVPKDVPRQEDATTSSQSHDNSSRTVSP
 NHRHSSSSYNSCYQEREP SHIRFFNNGNDVHQYRFGGYHGNNYNDN
 YFSRRPNKDSYRDRRRFNGRRSRSRSVSPQNYKRRKLDHEDNNHR
 QRSPIDRHTSPGGEKTPSSNNGERNYKRLDIRGARIKTIKEDLEA
 AAAAAAAVPSEVQAYPHEHTAVHQSVYQMPGYESYGVYDPVNGVY
 MYPHGAGYPPAYPQQPIMLTMDLPPNDRLGELYEKASIEQLAQR
 DAIVRQLELIRIQIERKTAQKEAIAACRRANEEAAKRQEALAKTK
 YV**WAIKSEAGETYYNKITKETQWTAPT**VQGLLEPACGASPDTTV
 VIADEITEEQQAELVLEKPRVVKKEVIEPGSQSETQKESPEKVRVVV
 PKVEVERSPSPKSSRDREKREKSREKDRERDRDRREGSKHRDSYHG
 HRNGSSSVSERRMREFKHLELSTRSAVRSRLQHQRDASSDKTTWLI
 KLIYREIFKRESAQSGFDYRFSENTDKKVKVNYKSYIDRKLESNDLW
 KEYSRP

MFQRKVVLPKKRTEMVQTRRKTAQAAVQDGGAVKENKAKPPAPQTPTK
 RAKRGRPPKIKTDANTLNPSTSSNLVDDKLLIESESQ
 SKRKVCIEPIVLNNPTQDTLPSSSISKFHK*
 VN*

Figure 29| Caractérisation de la séquence génomique et codante de l'allèle *tm1738*

(A) Représentation schématique du gène *met-1*, de la délétion *tm1738* (trait noir), et zoom sur les exons 2 à 6. Les flèches représentent les événements d'épissage qui ont pu être détectés dans le mutant *tm1738* (boîte hachurée). Le site donneur de l'exon 3 (flèche rouge) entre en compétition avec le site donneur de l'exon 5 (flèche orange) pour le même site accepteur de l'exon 6 (rond bleu). (B) Séquence protéique de MET-1 sauvage et mutante MET-1(*tm1738*), les domaines fonctionnels sont surlignés : en violet pour le domaine AWS, en bleu pour le domaine SET, en vert pour le domaine postSET et en jaune pour le domaine WW. Pour la mutation *tm1738*, la compétition pour le site d'épissage donne deux transcrits différents et potentiellement deux protéines tronquées.

1.5.4 Analyse comparative des deux mutations

Pour poursuivre l'étude du rôle de MET-1 dans la stabilité du génome, j'ai vérifié que le mutant *met-1(tm1738)* présente le même phénotype de sensibilité aux cassures double brin que le mutant *met-1(n4337)*. Comme précédemment expliqué, j'ai généré des cassures double brin par irradiation aux rayons X (les expériences préliminaires ont été faites avec des rayons gamma, mais la source n'est plus disponible au laboratoire). La Figure 30 présente les expériences réalisées par Valérie Robert et moi-même. Les animaux sauvages ont une viabilité embryonnaire réduite à 60 % à 120 Gy, le mutant *met-1(n4337)* a une viabilité embryonnaire de 20 %. En comparaison le mutant *met-1(tm1738)* présente une faible sensibilité aux irradiations avec 50 % de viabilité embryonnaire.

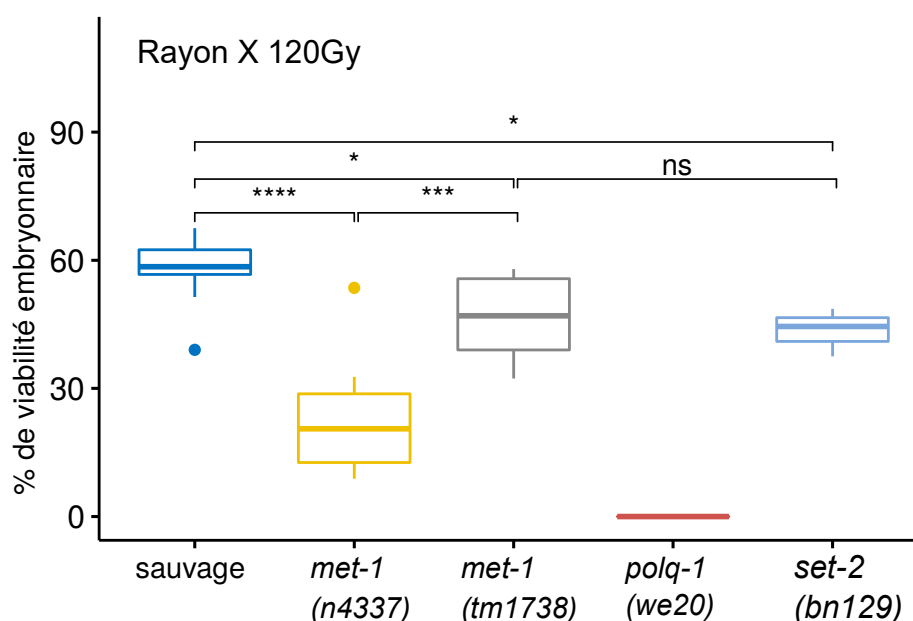


Figure 30| Sensibilité après irradiation aux rayons X des mutants *met-1(n4337)* et *met-1(tm1738)*

Pourcentage de viabilité embryonnaire après irradiation aux rayons X d'animaux au stade L4. La dose utilisée est de 120Gy. Le mutant *polq-1(we20)* sert de contrôle positif. Test statistique de Wilcoxon avec une correction de Bonferroni pour les tests multiples. ns : non significatif, * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$.

La sensibilité aux cassures double brin plus importante du mutant non-nul (*n4337*) comparé au mutant nul (*tm1738*) m'a amené à vérifier si les autres phénotypes observés chez le mutant *met-1(n4337)* étaient identiques chez le mutant *met-1(tm1738)*. J'ai commencé par vérifier la dérégulation de la transposition d'éléments transposables. J'ai utilisé le même système rapporteur que celui utilisé pour *met-1(n4337)*, c'est-à-dire l'insertion d'un élément Tc1 (de la famille des

Mariner) dans le gène *unc-22*. Les animaux homozygotes pour cet allèle de *unc-22* ont un phénotype Twitcher (paralysie et tremblement) (Vastenhouw et al., 2003). La transposition de cet élément suivie d'une réparation imprécise peut rétablir le cadre de lecture du gène *unc-22*, et restaurer la mobilité des animaux (révertants). La régulation des éléments transposables n'est pas affectée chez le sauvage ou le mutant *met-1(tm1738)*, aucun révertant n'a été observé pour deux expériences indépendantes (Tableau 3), contrairement au contrôle positif *mut-16* impliqué dans la répression des éléments transposables (Vastenhouw et al., 2003).

Tableau 3 | Essai de réversion *unc-22::Tc1*

Le nombre de boîtes contenant des révertants est quantifié. Chaque boîte provient de la descendance de 3 animaux. Le mutant *mut-16* sert de contrôle positif.

Génotype	Nombre total de boîtes	Boîtes avec révertants
sauvage	30	0
<i>met-1(tm1738)</i>	30	0
<i>mut-16</i>	30	30

Le nombre moyen de descendants par animaux à 20 °C et à 25 °C est également réduit chez ce mutant (Figure 31). Un phénotype *mrt* est observé à 25 °C après 4 à 18 générations pour l'allèle *tm1738* et après 12 à 25 générations pour l'allèle *n4337* (Tableau 4). J'ai caractérisé d'autres phénotypes pour ces mutants, qui sont présentés en Annexe 2.

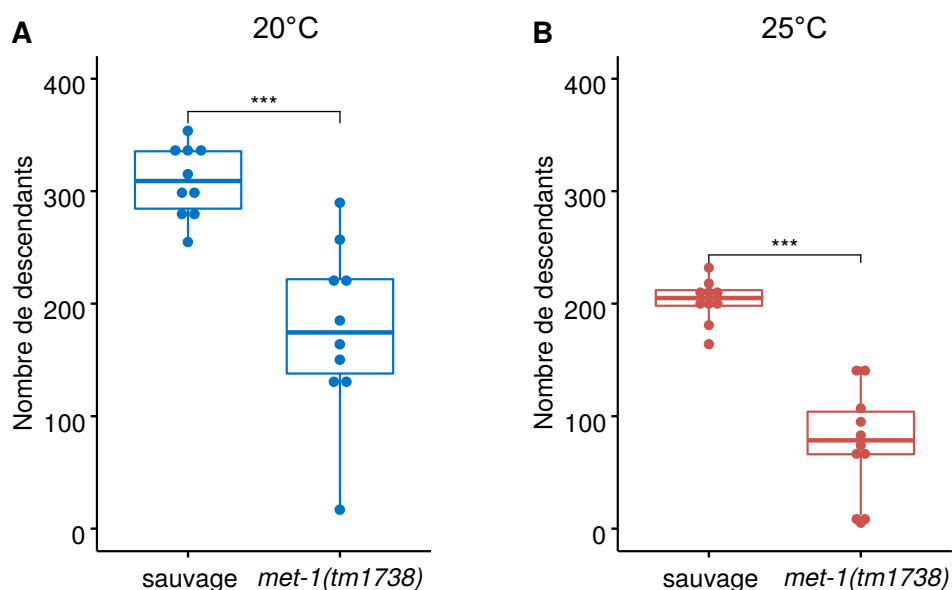


Figure 31 | Le nombre de descendants est réduit chez le mutant *met-1(tm1738)*

Nombre de descendants de vers sauvages ou *met-1(tm1738)* à 20°C (A) et 25°C (B). Les points représentent le nombre de descendants pour un animal (n=10 animaux par génotype).
 *** Différence significative par rapport au sauvage p<0,001 (le test de Wilcoxon a été utilisé pour les comparaisons en paire).

Tableau 4 | mrt à 25°C des mutants *met-1(n4337)* et *met-1(tm1738)*

Génotype	Lignée n°	Générations de la stérilité
Sauvage	1	18
	2	Toujours fertile après 25 générations
	3	Toujours fertile après 25 générations
<i>met-1(n4337)</i>	1	12
	2	24
	3	25
<i>met-1(tm1738)</i>	1	4
	2	6
	3	18

Nous observons que le mutant *n4337* qui code une protéine contenant le domaine catalytique présente un phénotype de sensibilité aux irradiations plus fort que le mutant nul. Il est possible qu'une mutation adjacente à la mutation *n4337* rende les animaux plus sensibles aux irradiations. Compte tenu de ces observations nous avons préféré arrêter l'étude de l'instabilité génomique chez

met-1. Toutefois, j'ai étudié la dérégulation de la voie des petits ARN chez le mutant *met-1(n4337)* ainsi que chez le mutant *set-2(bn129)* et ces résultats seront présentés en Annexe 3.

2 Étude du rôle de *set-2* dans l'organisation de la chromatine de la lignée germinale

2.1 Contexte des travaux de thèse

L'équipe a observé des défauts de ségrégation chromosomique dans les cellules intestinales chez les mutants *set-2* et *cfp-1* (Beurton et al., 2018), avec la présence de ponts chromatiniens ou de défauts plus sévères qui ont abouti à des noyaux connectés (Figure 32). Cette observation nous a rappelé les phénotypes observés chez les mutants impliqués dans la ségrégation des chromosomes, tels que la télomérase *trt-1* (Meier et al., 2006), les complexes condensines (Csankovszki et al., 2009), ainsi qu'après surexpression de SMCL-1, une protéine régulatrice des condensines (Chao et al., 2017). Les mutants des sous-unités des complexes de condensines présentent des défauts de ségrégation dans les embryons et la lignée germinale (Csankovszki et al., 2009 ; Hagstrom et al., 2002). De surcroît, une étude récente réalisée par le groupe de Robert Feil (CRBM, Montpellier), a montré que l'absence des complexes Condensine I et II, la chromatine des noyaux en pachytène est décompactée (Llères et al., 2017), et que l'absence de SET-2 provoque un phénotype similaire (Annexe 8). Ces résultats supportent l'hypothèse d'un rôle de *set-2* et de la marque H3K4me3, dans l'organisation de la chromatine de la lignée germinale de *C. elegans*.

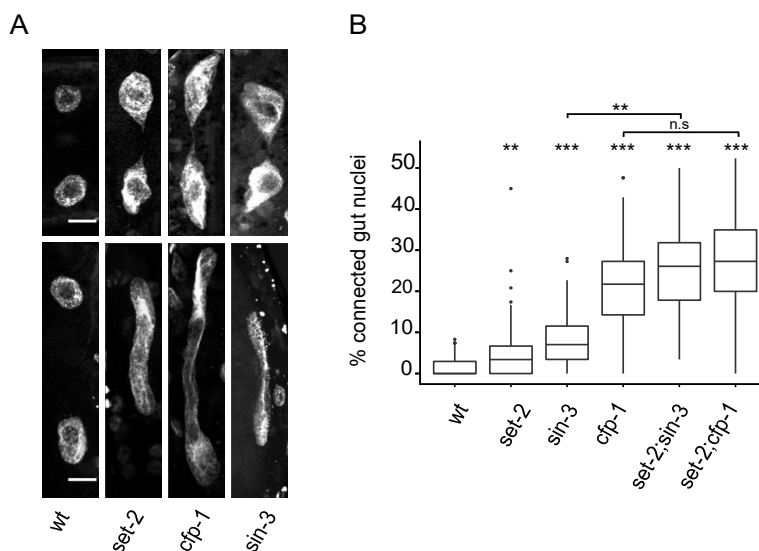


Figure 32| Défauts de ségrégation chromosomique des cellules intestinales

(A) Images confocales de marquage au DAPI de noyaux de cellules intestinales de jeunes adultes placés en L1 à 25°C pendant 48h. Une division nucléaire anormale provoque la formation d'un pont chromatiniens fin entre les deux noyaux ou bien, les noyaux restent connectés par une région de chromatine épaisse. (B) Nombre total de défauts de ségrégation par animaux dans les simple et double mutants (n=150 animaux par génotype). Les comparaisons multiples ont été réalisées avec un test de Wilcoxon après un test significatif de Kruskal Wallis, les p.valeurs ont été ajustées avec la méthode de Bonferroni pour les tests multiples. ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; n.s = non significatif. Figure de (Beurton et al., 2018)

2.2 Aggravation du phénotype associé à la perte du complexe Condensine II en l'absence de *set-2*

Contrairement à ce qui a été observé dans les cellules intestinales, nous n'avons jamais observé de défauts d'organisation de la chromatine dans la lignée germinale des animaux mutants *set-2* après marquage au DAPI. Par ailleurs, les données transcriptomiques que j'ai obtenues sur les lignées germinales du mutant *set-2* ne montrent pas de dérégulation majeure des sous-unités des condensines (voir partie 3 des résultats). J'ai fait l'hypothèse que l'éventuelle fonction de SET-2 dans l'organisation de la chromatine de la lignée germinale pouvait être masquée par la fonction des condensines. Pour identifier une éventuelle interaction génétique entre *set-2* et les Condensines, j'ai inactivé par ARN interférence (ARNi) les sous-unités des condensines dans des animaux sauvages ou mutants pour *set-2*. Pour rappel, trois complexes de condensines ont été identifiés chez *C. elegans* : Condensine I et II qui permettent la résolution des chromosomes mitotique et méiotique ; et Condensine I^{DC} qui réprime par deux les gènes liés à l'X dans le soma. Comme les condensines sont des facteurs essentiels pour la viabilité embryonnaire, j'ai mis en place un protocole pour lequel les condensines sont déplétées après la fin du développement embryonnaire (au stade L1). Dans ces conditions, j'observe des défauts majeurs dans les lignées germinales identiques à ceux observés par (Csankovszki et al., 2009 ; Hagstrom et al., 2002) après déplétion de *kle-2*, une sous-unités de Condensine II. Après déplétion des Condensines, j'observe que les lignées germinales contiennent des ponts chromatiniens et des noyaux de tailles variées : certains sont très volumineux alors que d'autres sont très petits (micro noyaux) (Figures 1.2 A et 1.2 B). Ces défauts sont le résultat de défauts de ségrégation mitotique conduisant à une polyploïdie ou aneuploïdie (Hagstrom et al., 2002). D'autre part, certaines gonades conservent une organisation semblable à celle du sauvage, avec des noyaux de taille homogène. À noter également que des phénotypes intermédiaires sont aussi visibles avec quelques noyaux intenses au DAPI. Le pourcentage de gonades très désorganisées avec des défauts majeurs est plus important chez le mutant *set-2* que chez le sauvage (Figure 33 A et C). Pour vérifier que la différence de pénétrance du phénotype n'est pas due à une différence de sensibilité à l'ARNi, j'ai réalisé une quantification des ARN par RT qPCR. La déplétion en ARN messenger *kle-2* est équivalente chez le sauvage et le mutant *set-2* (Figure 33 D).

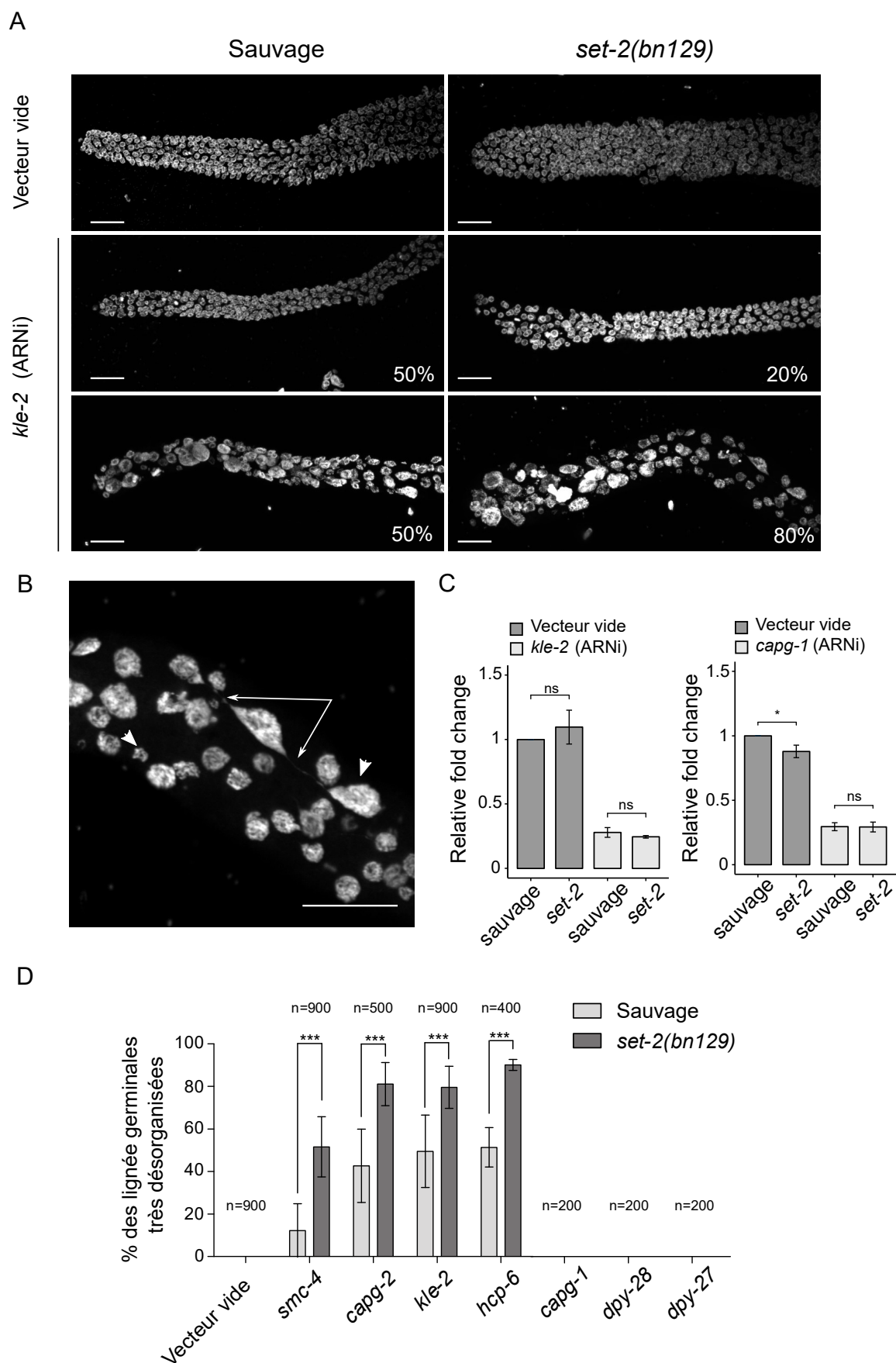


Figure 33| Aggravation du phénotype associé à la perte de Condensines II en absence de *set-2*

A) Partie distale de lignée germinale sauvage ou mutante *set-2(bn129)* de vers traités avec le vecteur vide ou avec un vecteur ciblant *kle-2*. Les deux images de lignées germinales du traitement RNAi *kle-2* représentent une gonade avec des défauts mineurs et une gonades avec des défauts majeurs. Images de microscopie confocale et projection maximale d'un z-stack de l'ensemble de la gonade ; échelle = 20µm (B) Exemple de défauts observés : les flèches pointent sur deux ponts chromatiniens, les têtes de flèches montrent un noyau polyploïde et un micronoyau. Échelle = 20µm. (C) Niveau d'expression relatif de l'ARNm *kle-2* (ou *capg-1*) chez le sauvage et le mutant *set-2(bn129)* après traitement par ARNi dirigé contre *kle-2* (ou *capg-1*) ou avec le vecteur vide. Les niveaux ont été normalisés avec les niveaux d'expression des gènes *pmp-3* et *cdc-42*. Le niveau basal est normalisé par rapport au sauvage traité avec le vecteur vide. * $p < 0,05$ par un t-test (D) Pourcentage de lignées germinales présentant des défauts majeurs après ARNi contre les différentes sous-unités de condensines dans un fond génétique sauvage ou mutant *set-2*. n= nombre d'animaux quantifiés, 9 expériences indépendantes ont été réalisées pour *smc-4* et *kle-2*, 5 pour *capg-2*, 4 pour *hcp-6* et 2 pour *capg-1*, *dpy-28* et *dpy-27*. *** $p < 0,001$ (t-test ajusté pour les tests multiples par la méthode de Bonferroni).

J'ai quantifié le pourcentage de gonades qui présentaient des défauts majeurs d'organisation, après ARNi contre les sous-unités des Condensines I, II et I^{DC}, en contexte sauvage ou mutants *set-2*. On remarque que pour toutes les sous-unités appartenant au complexe Condensine II, le pourcentage de gonades très désorganisées est plus important que chez le sauvage. Je n'ai observé aucun défaut dans la lignée germinale des animaux déplétés pour les sous-unités spécifiques de Condensine I (*dpy-28*, *capg-1*) en contexte sauvage ou mutant pour *set-2* (Figure 33 D). Ces observations sont en accord avec un rôle mineur de Condensine I par rapport à Condensine II chez *C. elegans* (Chan et al., 2004). De la même façon, aucun défaut de la lignée germinale n'a été observé après déplétion de la sous-unité spécifique de Condensine I^{DC} (*dpy-27*), en accord avec son rôle exclusivement somatique.

2.3 Un allèle hypomorphe de *hcp-6* montre la même interaction génétique

J'ai montré que *set-2* et Condensine II interagissent génétiquement dans l'organisation de la chromatine de la lignée germinale. Les défauts d'organisation de la chromatine observés après déplétion de Condensine II par ARNi sont augmentés en l'absence de SET-2. Ces expériences ont été réalisées en déplaçant Condensine II par ARNi sur des animaux sauvages ou mutants pour *set-2*. Pour confirmer de manière indépendante les résultats obtenus par ARNi, j'ai utilisé l'allèle thermosensible *mr17* de *hcp-6* qui code une sous-unité spécifique de Condensine II. Cet allèle présente une létalité embryonnaire forte lorsque des animaux L4 sont placés à 26°C (température restrictive), mais est sauvage à 15°C (Stear and Roth, 2002). Des larves placées à des températures semi-permissives (20°C à 24°C) présentent des défauts d'organisation de la lignée germinale, similaires à ceux observés lorsque *hcp-6* est déplété par ARNi (Csankovszki et al., 2009 ; Stear and

Roth, 2002). L'utilisation de cet allèle nous permet (1) de vérifier l'interaction génétique entre *set-2* et Condensine II dans la lignée germinale, (2) de tester s'il existe une interaction similaire chez l'embryon. En effet, par ARNi, la létalité embryonnaire est de 100% et ne nous permet pas de tester une interaction génétique. Dans un premier temps, j'ai reséquencé l'intégralité du gène *hcp-6*, la mutation étant mal annotée dans la base de données. La mutation se trouve dans le domaine HEAT, un domaine conservé qui permet l'attachement du complexe à l'ADN (Xu et al., 2015 ; Kschonsak et al., 2017). Ces résultats sont présentés en Annexe 6.

J'ai observé par DAPI les lignées germinales des simple et double mutants placés à 23,5°C pendant 24 h. La région mitotique présente des défauts similaires à ceux observés après déplétion des sous-unités de Condensine II par ARNi (Figure 34 A). Toutefois la pénétrance du phénotype est complète avec cet allèle. Il est difficile d'évaluer des différences d'aggravation du phénotype par simple observation au DAPI. On peut remarquer que la gonade du double mutant *hcp-6;set-2* a un nombre de noyaux réduit comparé aux simples mutants. Il semblerait que la prolifération soit affectée dans le double mutant. J'ai également testé des températures différentes et à des stades différents (données non montrées). L'évaluation de l'aggravation d'un phénotype est difficile pour les conditions testées.

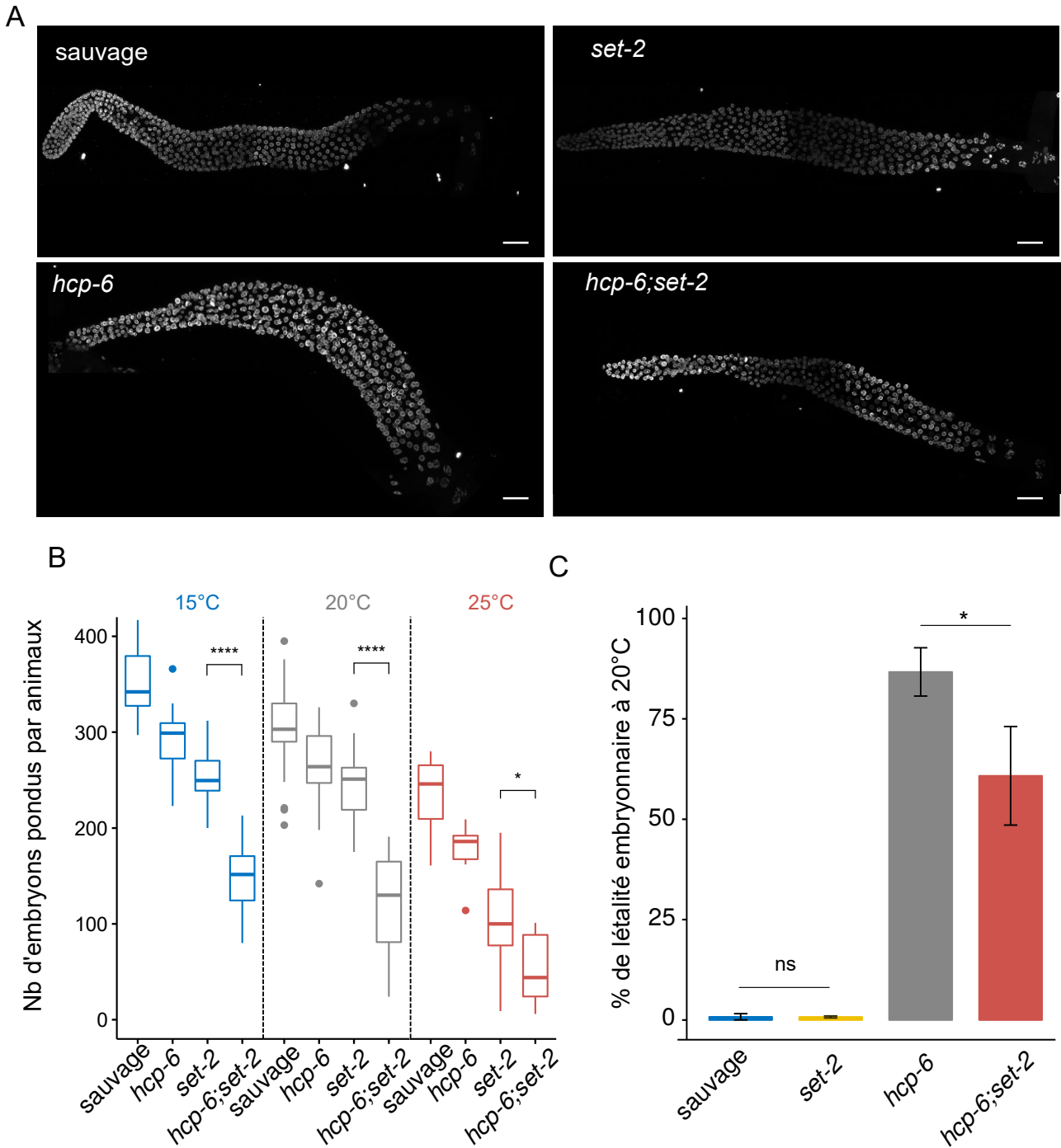


Figure 34 | L'allèle hypomorphique de *hcp-6* interagit génétiquement avec le mutant *set-2*

(A) Lignées germinales d'animaux sauvages et mutants *hcp-6*(*mr17*), *set-2*(*bn129*) et *hcp-6*; *set-2* marquées au DAPI à 23,5°C. Images de microscopie confocale et projection maximale d'un z-stack de l'ensemble de la gonade ; échelle : 20µm. (B) Nombre d'embryons pondus par animaux aux températures indiquées (15°C, 20°C et 25°C), n=11 animaux par génotypes à 15°C et 25°C, 33 animaux à 20°C. **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ (t-test ajusté par la méthode de Bonferroni). (C) pourcentage de létalité embryonnaire à 20°C des mutants *set-2*, *hcp-6* et *hcp-6*; *set-2*. * $p < 0,05$ après un t-test. n=10109 ; 8227 ; 8757 ; 3961 embryons/larves comptés respectivement pour le sauvage, *set-2*, *hcp-6* et *hcp-6*; *set-2*. 3 expériences indépendantes ont été réalisées.

Comme l'observation du phénotype des lignées germinales est difficile à quantifier de manière sûre, j'ai utilisé le nombre de descendants par animaux comme indicateur de la santé de la lignée germinale. Ce paramètre permet de savoir si la lignée germinale est capable de proliférer et de produire des gamètes matures. J'ai quantifié le nombre d'embryons pondus par animaux à différentes températures : 15°C, 20°C et 25°C. Le double mutant *hcp-6;set-2* pond un nombre réduit d'embryons comparé aux simples mutants à toutes les températures testées (Figure 34 B). L'interaction génétique que j'avais précédemment observée entre *set-2* et Condensine II est donc confirmée par cette expérience. De manière surprenante, les embryons pondus à 20°C ont une létalité embryonnaire réduite chez le double mutant *hcp-6;set-2* comparé au mutant *hcp-6* (60 % comparé à 80 % $p\text{-val} < 0.05$) (Figure 34 C). Cette suppression du phénotype de létalité embryonnaire du mutant *hcp-6* m'a intrigué. En effet, jusqu'alors, j'ai observé une aggravation des phénotypes associés à la déplétion par ARNi de Condensine II en présence de la mutation *set-2(bn129)*. Je me suis demandée à quel stade du développement embryonnaire les embryons mourraient. Par microscopie à contraste interférentiel différentiel, il est possible de distinguer différents stades du développement embryonnaire. 31% des embryons meurent après le stade « comma » (début de l'élongation) pour le mutant *hcp-6; set-2*, contre 13,9% chez le mutant *hcp-6* (Figure 35). De plus, une lignée *hcp-6* rétro-croisée dans le fond sauvage a été utilisée pour vérifier qu'une mutation présente dans le fond génétique n'est pas responsable de la mort plus précoce des embryons (cette même souche a été utilisée dans la Figure 34). Cependant on ne peut pas exclure qu'une mutation liée au locus *hcp-6* soit encore présente même après rétrocroisement.

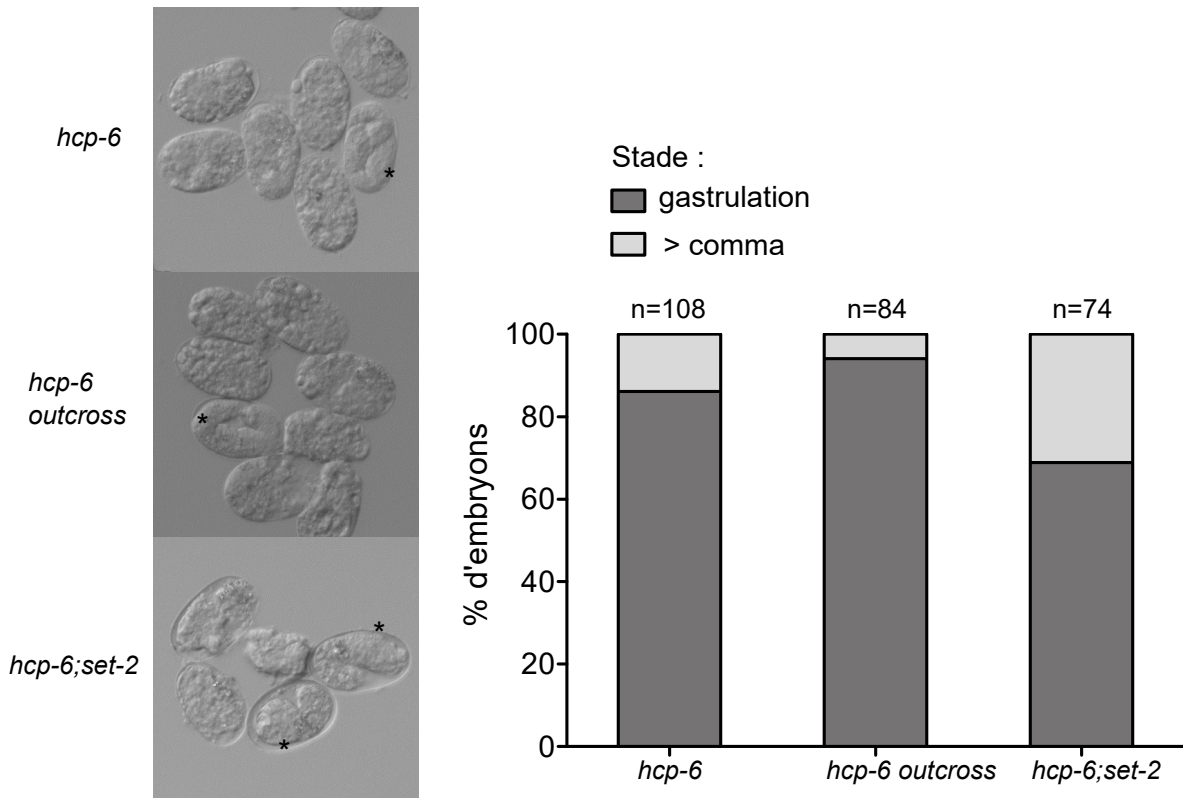


Figure 35| Le développement embryonnaire est arrêté plus tardivement chez les embryons *hcp-6;set-2*

Image prise en contraste interférentiel différentiel, les [*] marquent les embryons de stades supérieurs au stade « comma ». Pourcentage d'embryons de stade : comma et plus tardif (gris clair), ou plus précoce (gastrulation) (gris foncé). n = nombre d'embryons observés. *hcp-6 outcross* : souche rétrocroisée dans le fond sauvage et provenant du même croisement que la souche *hcp-6;set-2*

L'ensemble de ces résultats confirme une interaction génétique synthétique entre *set-2* et *hcp-6* dans la lignée germinale, confirmant les résultats par ARNi. Au stade embryonnaire, l'absence de *set-2* semble avoir un effet suppresseur sur la létalité embryonnaire du mutant *hcp-6*. Cet effet suppresseur du phénotype de létalité embryonnaire de *hcp-6* a déjà été observé dans des mutants impliqués dans la formation des crossing-over (Hong et al., 2016).

2.3.1 Le double mutant *hcp-6; set-2* présente une augmentation de l'apoptose

Afin de concilier les résultats de la diminution de la taille de la descendance dans le double mutant *set-2;hcp-6* et l'augmentation du pourcentage de viabilité embryonnaire chez ce double mutant, j'ai émis l'hypothèse que l'apoptose pourrait être augmentée dans la lignée germinale du double mutant. L'apoptose dans la lignée germinale de *C. elegans* est un processus physiologique

qui élimine près de la moitié des gamètes au niveau du coude de la lignée germinale (Gumienny et al., 1999) (Figure 36 A). L'apoptose est augmentée après cassure de l'ADN ou lorsque le point de contrôle est activé suite à des défauts dans l'appariement des chromosomes (Gartner et al., 2000 ; Bhalla and Dernburg, 2005 ; Bohr et al., 2016 ; Bohr et al., 2015). Une augmentation de l'apoptose pourrait d'une part, réduire le nombre d'embryons pondus suite à l'élimination d'une partie des cellules germinales (Figure 34 A) et d'autre part, éliminer un plus grand nombre de gamètes défectueux ce qui permettrait de conserver des gamètes de meilleure qualité et d'augmenter la viabilité embryonnaire. J'ai utilisé l'acridine orange pour observer les corps apoptotiques. Ce colorant est un marqueur de l'ADN et de l'ARN qui par ces propriétés acidophiles marque les corps apoptotiques dont le pH est acide. Le mutant *brc-1*, l'orthologue de BRCA1 impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN, est utilisé comme contrôle positif (Boulton et al., 2004). Comme décrit précédemment (Herbette et al., 2017), le nombre de corps apoptotiques n'est pas augmenté pour le mutant *set-2*. Le nombre de corps apoptotiques est augmenté chez le double mutant *hcp-6; set-2* à 20°C comparé au simple mutant *hcp-6* (p.val <0.05) (Figure 36 A et B). Ces résultats pourraient expliquer en partie pourquoi la létalité embryonnaire est moins importante dans le double mutant *hcp-6; set-2* que dans le simple mutant *set-2*. Cependant, d'autres voies telles que le point de contrôle de la cytokinèse, pourraient être impliquées (Norden et al., 2006 ; Carlton et al., 2012 ; Steigemann et al., 2009). En effet, Condensine I semble jouer un rôle dans le délai de la cytokinèse pour permettre la résolution de l'obstruction du sillon par la chromatine (Bembenek et al., 2013).

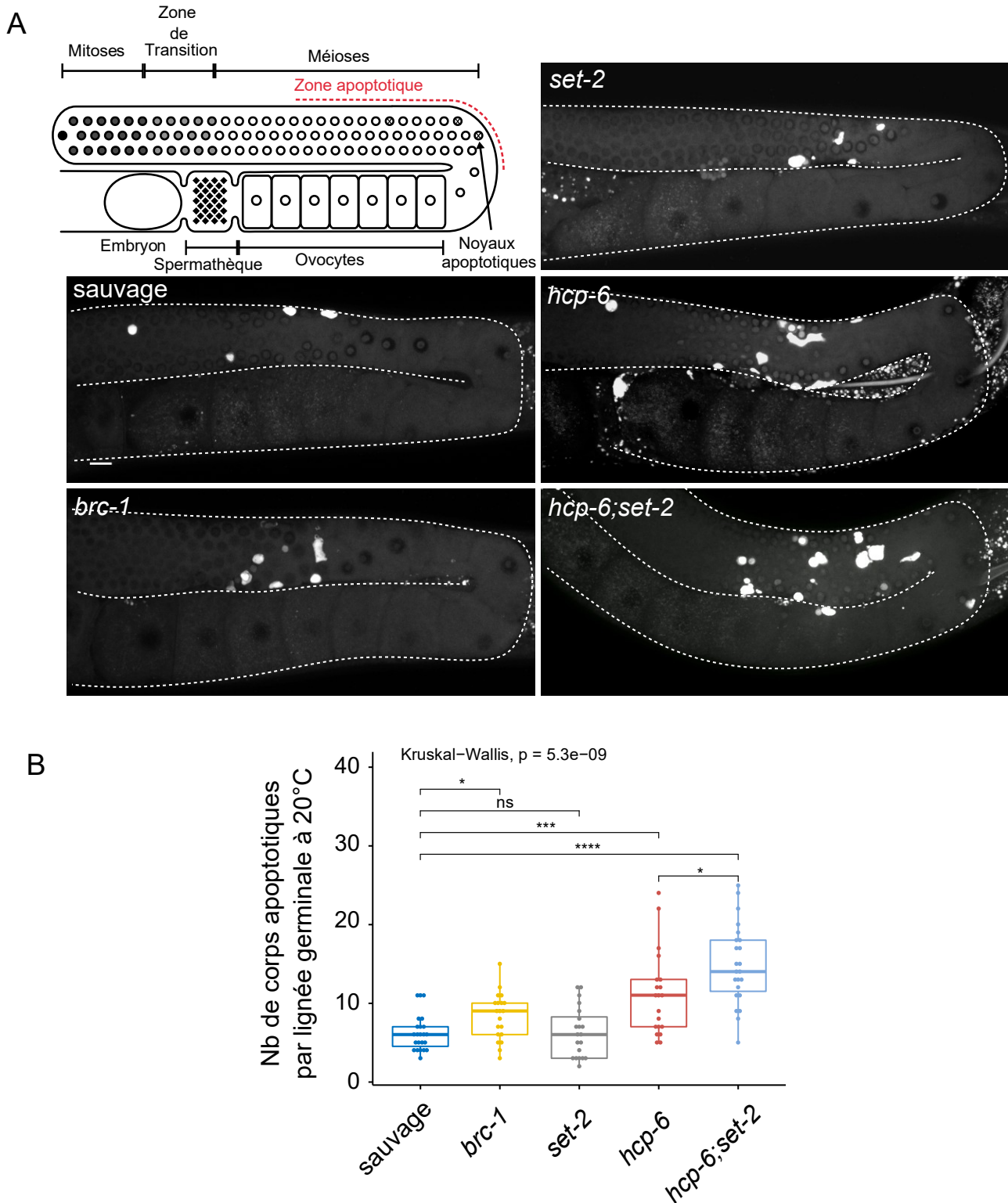


Figure 36| Augmentation de l'apoptose dans le double mutant *hcp-6;set-2*

(A) Représentation schématique de la lignée germinale et images de marquage à l'Acridine Orange, les corps apoptotiques sont les tâches blanches dans la lignée germinale. La lignée germinale est délimitée par les traits en pointillés. Echelle : 10µm. (B) Quantification du nombre de corps apoptotiques pour au moins 20 animaux de chaque génotype. Test post-hoc de Wilcoxon après une différence significative par le test de Kruskal Wallis, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns = non-significatif

2.4 L'interaction génétique entre *set-2* et Condensine II semble être liée à la diminution de la marque H3K4me3

Pour savoir si l'aggravation des phénotypes de Condensine II dans la lignée germinale est spécifique à l'absence de *set-2* et à la marque H3K4me3, j'ai utilisé la même approche de ciblage par ARNi des sous-unités de Condensine II dans différents mutants du complexe SET1/SET-2 et d'autres histones méthyltransférases ou déméthylases. J'ai notamment utilisé *ok952*, un allèle hypomorphe de *set-2* qui code une protéine dont le domaine catalytique SET est toujours présent. Chez ce mutant, les niveaux de triméthylation de H3K4 sont intermédiaires à ceux du mutant nul *set-2(bn129)* et du sauvage, dans l'embryon et l'adulte (Xiao et al., 2011). J'ai également utilisé *tm6369*, un allèle nul de *cfp-1* qui code une sous-unité du complexe SET1/SET-2. Les animaux homozygotes pour *tm6369* ont des niveaux de tri-méthylation réduits chez l'embryon (Li and Kelly, 2011). J'ai utilisé deux mutants des gènes *rbr-2* et *spr-5* qui sont deux histones déméthylases de H3K4me3/me2 pour *rbr-2* (Christensen et al., 2007) et de H3K4me2/me1 pour *spr-5* (Katz et al., 2009). Chez ces deux mutants la triméthylation de H3K4 est augmentée de manière générale pour *rbr-2* (Wang et al., 2011) et après plusieurs générations successives pour *spr-5* (Greer et al., 2014). J'ai utilisé une lignée mutante pour *spr-5* depuis plusieurs générations, dans laquelle les niveaux de H3K4me3 sont augmentés, mais je ne l'ai pas formellement vérifié. J'ai également utilisé deux allèles du gène *met-1* (*n4337* et *tm1738*) qui participe à la méthylation de H3K36 dans la lignée germinale (Rechtsteiner et al., 2010). Enfin, j'ai utilisé le mutant *met-2* et le double mutant *met-2; set-25* (Andersen and Horvitz, 2007). MET-2 catalyse la mono-, di-méthylation de H3K9 dans la lignée germinale, tandis que SET-25 catalyse la triméthylation de H3K9 (Towbin et al., 2012 ; Bessler et al., 2010). Les résultats présentés sont préliminaires et nécessitent un plus grand nombre de répliques. Toutefois, mise à part pour le mutant *cfp-1*, les autres mutants testés ne semblent pas augmenter la pénétrance du phénotype observé après déplétion de *kle-2* ou *smc-4* (Figure 37 A). Le mutant hypomorphe *set-2(ok952)* n'est pas différent du sauvage (Figure 37 A). J'ai par ailleurs quantifié le niveau de H3K4me3 dans les lignées germinales des mutants *set-2(bn129)* et *set-2(ok952)* par immunomarquage, ces résultats sont présentés en Annexe 7.

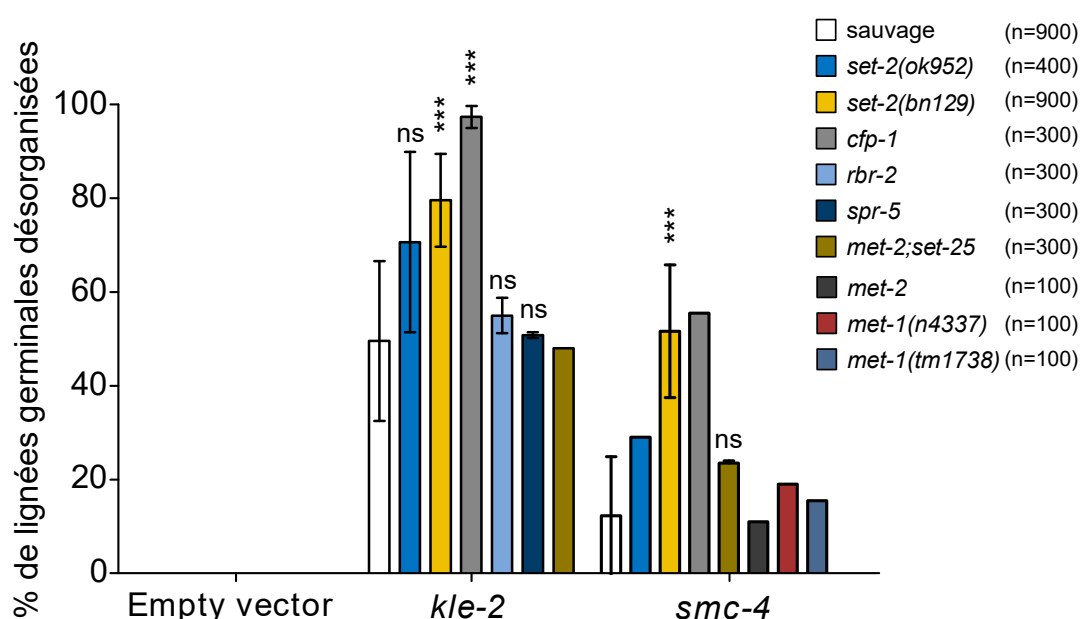


Figure 37 | L'interaction génétique avec Condensine II semble être liée à la diminution de la marque H3K4me3

Pourcentage de lignées germinales très désorganisées après déplétion par RNAi des sous-unités *kle-2* et *smc-4* dans les fonds génétiques mentionnés dans la légende. *** différence significative < 0,001, ns=non-significatif (par un t-test, ajusté pour les comparaisons multiples : méthode Bonferroni).

Dans l'ensemble, ces résultats semblent montrer que l'aggravation du phénotype associé à la perte de Condensine II est spécifiquement liée à la diminution de la marque H3K4me3 dans la lignée germinale. L'augmentation de cette marque dans le mutant *spr-5* et *rbr-2* ne semble pas avoir d'impact et l'absence de H3K9me1/2/3 ou la diminution de H3K36me3 ne semble également pas influencer ce phénotype.

2.5 Interaction génétique entre *top-2* et *set-2* dans la lignée germinale

Condensine II est impliqué dans la compaction axiale des chromosomes, pour savoir si d'autres protéines impliquées dans la compaction axiale des chromosomes interagissent avec *set-2*, j'ai utilisé la même démarche que précédemment avec un allèle thermosensible de la topoisomérase II : *top-2*. La topoisomérase II joue un rôle dans la compaction axiale des chromosomes mitotiques chez l'embryon de *C. elegans* (Ladouceur et al., 2017). Par ailleurs un allèle nul présente des défauts de prolifération et de ségrégation dans la lignée germinale (Jaramillo-Lambert et al., 2016). J'ai utilisé le mutant thermosensible de l'orthologue de la topoisomérase II chez *C. elegans* : *top-*

2(*it7*) (Stanvitch and Moore, 2008). Cet allèle présente des défauts de spermatogenèse à 24 °C (température restrictive) : un défaut de ségrégation en anaphase I conduit à la formation de spermatozoïdes anucléés (Jaramillo-Lambert et al., 2016). J'ai observé à température semi-restrictive les phénotypes dans la lignée germinale pour le mutant *top-2* et le double mutant *top-2; set-2*. J'ai placé des animaux L1 à 23,5°C et j'ai observé la lignée germinale des adultes (L4 +1 jour). Les phénotypes observés peuvent être classés en 4 catégories : (1) des lignées germinales sauvages, (2) courtes, (3) atrophiées et (4) de rares lignées tumorigéniques (Korta et al., 2012) (Figure 38 A). En contexte *top-2* les lignées germinales sauvages représentent 50 % des gonades observées ; pour le double mutant, cette catégorie ne représente que 25 % des gonades observées (Figure 38 B). Le reste des gonades se répartit équitablement entre les catégories « atrophiées » et « courtes ». J'ai également observé que certains noyaux en pachytène, et plus visiblement en diakinèse, étaient tétraploïdes (Figure 38 C). Ce phénotype, déjà observé en cellule mammifère après déplétion de la topoisomérase II (Steigemann et al., 2009), n'avait pas encore été décrit chez *C. elegans*. Ces noyaux représentent la moitié des noyaux observés dans le simple mutant. De manière étonnante, il y a moins de noyaux tétraploïdes en diakinèse pour le double mutant *set-2; top-2* (Figure 38 D) suggérant que l'absence de *set-2* est un suppresseur de ce phénotype ou alternativement, que les défauts plus importants dans les lignées germinales du double mutant masquent la présence de ces diakinèses tétraploïdes.

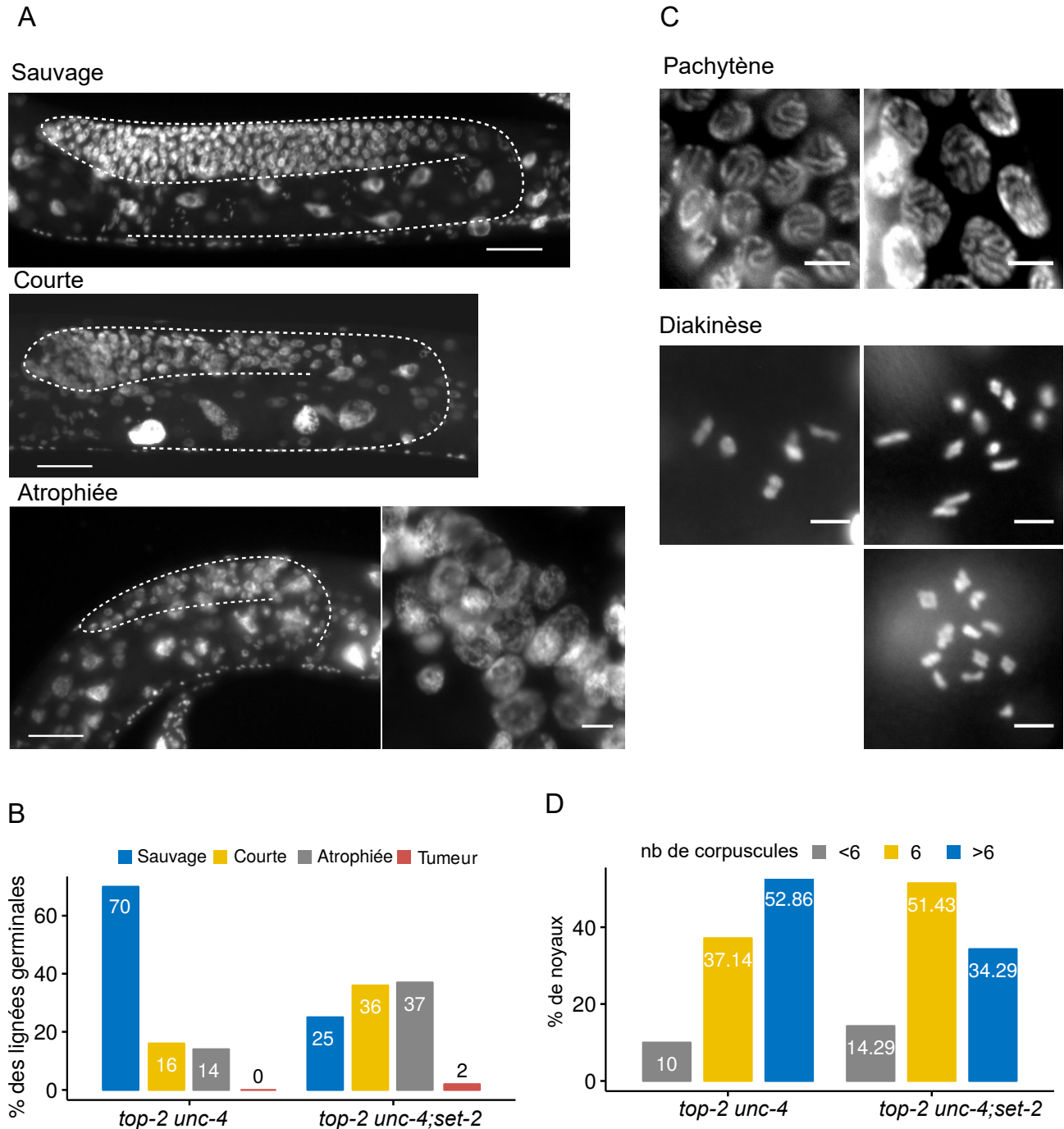


Figure 38| Interaction génétique entre *top-2* et *set-2* dans la lignée germinale

(A-C) Phénotypes germinaux observés chez les mutants *top-2(it7)* et *top-2(it7);set-2(bn129)*. Pour des animaux mis à 23,5°C au stade L1 et observés au stade adulte. (A) Image représentative de 3 catégories : sauvage, courte et atrophiée (échelle : 30µm) et zoom sur la morphologie des noyaux retrouvés dans les lignées germinales atrophiées (échelle : 5µm). (B) Quantification des classes de phénotypes. (C) Image représentative de noyaux en pachytène ou diakinèse diploïdes (gauche) ou tétraploïdes (droite). Echelle : 5µm. (D) Quantification des ovocytes contenant un nombre de structures marquées au DAPI inférieur à 6, égal à 6 ou supérieur à 6

2.6 La compaction des noyaux en pachytène est réduite chez le mutant *cfp-1* et *set-2*

Afin de mieux caractériser comment l'absence de SET-2 impacte l'organisation de la chromatine dans la lignée germinale, nous avons utilisé la technique de FLIM-FRET. Cette technique repose sur utilisation de deux transgènes codant des sous-unités H2B fusionnées à la GFP ou à la mCherry, spécifiquement exprimées dans la lignée germinale. Le rapprochement entre une molécule de GFP et de mCherry engendre du FRET (passage d'énergie d'une molécule fluorescente donneuse à une molécule receveuse). Ce transfert décroît le temps de vie de la GFP. Ainsi, on peut estimer la compaction de la chromatine en mesurant le temps de vie de la GFP, un temps de vie long correspond à une chromatine moins compacte (histone H2B GFP et histone H2B mCherry éloignées). Au contraire un temps de vie court correspond à une chromatine compacte (histone H2B GFP et histone H2B mCherry proches). Les résultats obtenus pour *set-2(bn129)* sont présentés en Annexe 8 et montrent une décompaction de la chromatine dans les cellules en pachytène (travaux relayées par D. Llères, Equipe Robert Feil). Pour savoir si l'on observe une décompaction similaire lorsque d'autres composants du complexe COMPASS sont mutés, j'ai réalisé des expériences de FLIM-FRET à Montpellier (sous la direction de David Llères et Aymeric Bailly) sur le mutant *cfp-1*. Cette expérience montre que comme *set-2*, *cfp-1* présente une chromatine décompactée en pachytène (Figure 39). Ces résultats semblent indiquer que *set-2* et *cfp-1* jouent un rôle dans la compaction de certains domaines de la chromatine dans les noyaux en pachytène.

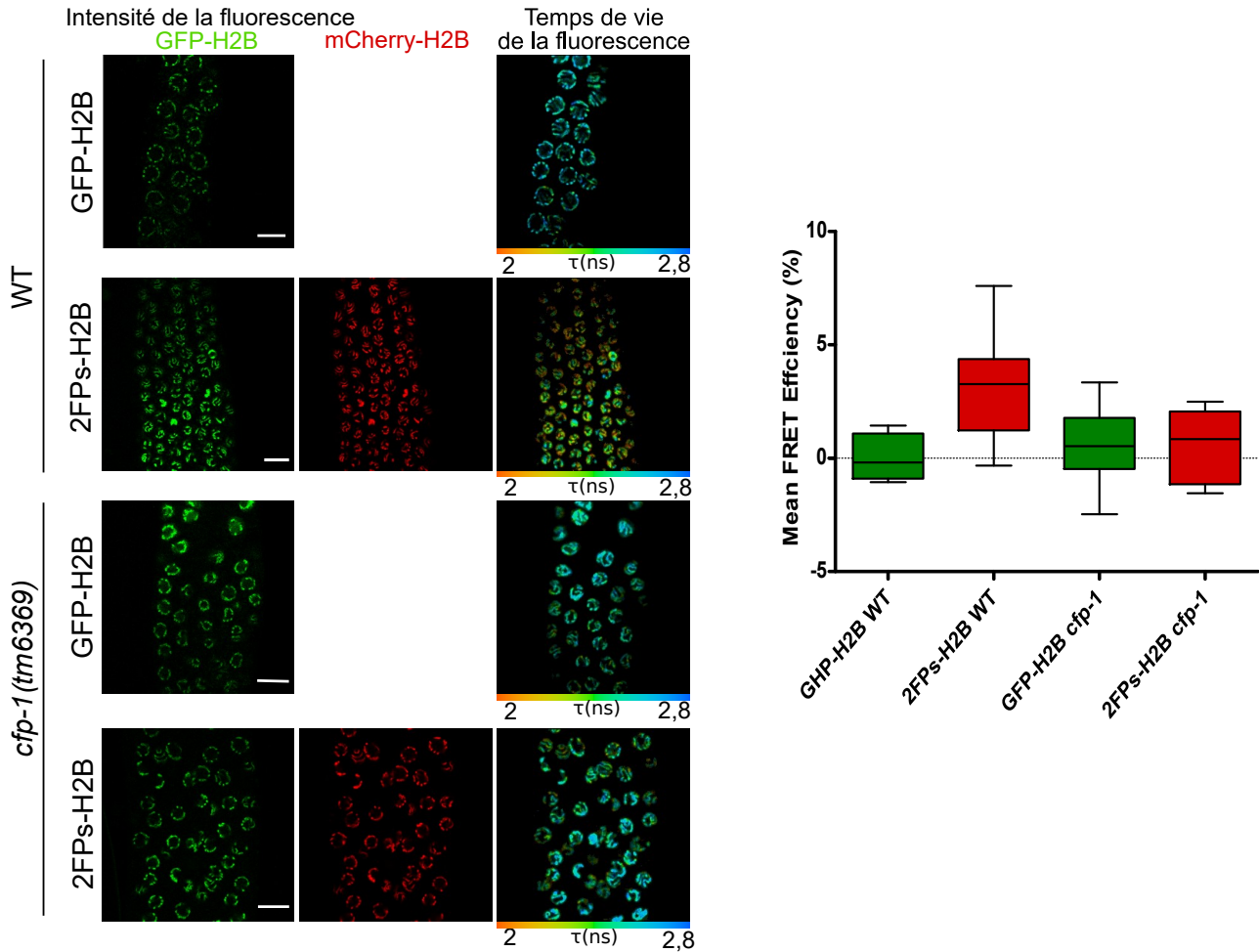


Figure 39| Réduction de la compaction de la chromatine dans les noyaux pachytènes chez le mutant *cfp-1*

GFP-H2B : lignée contrôle où seul le transgène exprimant l'histone H2B fusionnée à la GFP est exprimé (contrôle du temps de vie de la GFP dans une condition sans FRET). 2FPs-H2B : lignée où les deux transgènes H2B fusionnée à la mCherry ou à la GFP sont présents (condition où le FRET entre la GFP et la mCherry est présent). Les images de la GFP et de la mCherry ainsi que le temps de vie de la GFP sont représentés pour chaque souche. L'échelle représente le temps de vie de la GFP (orange : court, bleu long) en nanosecondes. Pourcentage de FRET pour les 4 génotypes, mesuré pour $n = 4, 10, 8$ et 9 gonades respectivement. Echelle : $10\mu\text{m}$.

2.7 La fréquence des crossing-overs n'est pas altérée en l'absence de *set-2*

Les défauts méiotiques observés en absence de Condensine II sont associés à l'expansion de l'axe des chromosomes ainsi qu'à une distribution altérée des crossing-overs (Mets and Meyer, 2009). Pour mieux caractériser le rôle de *set-2* au cours de la méiose, j'ai vérifié si le processus de crossing-over était altéré chez le mutant *set-2*. J'ai utilisé deux loci : *unc-5* et *dpy-13* distants d'environ 2 centiMorgan sur le chromosome IV. La mutation dans le gène *unc-5* provoque une

paralyse des animaux, et la mutation dans le gène *dpy-13* les rend courtauds. J'ai dénombré les descendants de phénotypes recombinants ([dpy] ou [unc]) ou parentaux ([sauvage] ou [dpy-unc]) issus de parents *set-2/+ ; dpy-13 unc-5/++* ou *set-2/set-2 ; dpy-13 unc-5/++*. La distance est identique entre les homozygotes et les hétérozygotes *set-2* (Tableau 5). Elle est de 1,69cM pour *set-2* homozygote et de 2,04cM pour l'hétérozygote ($p.val=0,354$; test de Fisher). La distance obtenue est similaire à celle obtenue par Brenner S. et par Kuo CL. (1,56cM, et 1,8cM respectivement, données de Wormbase). À noter que j'ai utilisé une souche avec une insertion dans le gène *unc-5* ce qui modifie la distance génétique.

Tableau 5| La fréquence de recombinaison entre les loci *unc-5* et *dpy-13* chez le mutant *set-2* n'est pas altérée

génotype	[sauvage]	[dpy]	[unc]	[dpy-unc]	Descendance totale	R (recombinant/ descendance totale)	P $1-(1-2R)^{1/2}$
<i>set-2/+ ; dpy-13 unc-5/ + +</i>	2763	40	34	829	3666	0,0202	2,04 cM
<i>set-2/set-2 dpy-13 unc-5/ + +</i>	2129	27	20	622	2798	0,0168	1,69 cM

3 Étude du rôle de CFP-1 et SIN-3 dans la lignée germinale

3.1 Contexte des travaux de thèse

L'équipe a mis en évidence une interaction physique entre la protéine CFP-1 faisant partie du complexe SET1/SET-2 et les composants du complexe SIN3/HDAC qui a une activité d'histone déacétylase, par des approches protéomiques chez l'embryon (Beurton et al., 2018, Matthieu Caron et Francesca Palladino, résultats non-publiés). Ces deux complexes chromatinien possèdent des activités distinctes de méthylation de H3K4 et de déacétylation des lysines respectivement. Cette interaction semble réguler de manière coordonnée l'expression d'un sous-ensemble de gènes au cours du développement embryonnaire. L'ensemble des gènes qui composent ces deux complexes sont exprimés dans la lignée germinale. Ces deux complexes SET1/SET-2 et SIN3/HDAC interagissent-ils dans la lignée germinale ? Régulent-ils transcriptionnellement les mêmes gènes ? CFP-1 est-il présent dans les deux complexes de manière indépendante ou permet-il de coordonner l'action des deux complexes ? Au cours de ma thèse, j'ai entrepris de répondre à ces questions, particulièrement sur le rôle transcriptionnel de SET-2, CFP-1 et SIN-3 dans la lignée germinale, et j'ai étudié les phénotypes des mutants des gènes codant ces protéines.

3.2 Rôle de *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* dans l'homéostasie de la lignée germinale

Ce travail a été réalisé avec Flore Beurton, et fait partie d'une publication en soumission (Beurton et al., 2018). Pour plus de clarté, seule l'expérience à laquelle j'ai participé sera présentée. Nous nous sommes intéressées aux phénotypes associés à la perte de fonction des gènes *set-2*, *cfp-1* et *sin-3*.

Aucune caractérisation phénotypique de la lignée germinale n'a été faite pour les mutants *cfp-1* et *sin-3*. Pour déterminer si *cfp-1* et *sin-3* ont un rôle dans la lignée germinale, nous avons quantifié le nombre de descendants par animaux chez les mutants de chacun de ces gènes. Les allèles utilisés sont des allèles pertes de fonction et sont décrits en Annexe 4 (Xiao et al., 2011 ; Choy et al., 2007). Le nombre de descendants reflète le bon fonctionnement de la lignée germinale. Des défauts dans son fonctionnement engendrent une réduction du nombre de descendants produits. Le nombre de descendants est réduit pour les mutants *cfp-1* et *sin-3* à 20 °C (Figure 40 A). Le mutant *cfp-1* montre une forte variabilité avec un nombre de descendants allant de 261 à 10. Par

ailleurs, la taille de la descendance est réduite par rapport au sauvage chez le mutant *set-2* comme précédemment observé (Xiao et al., 2011).

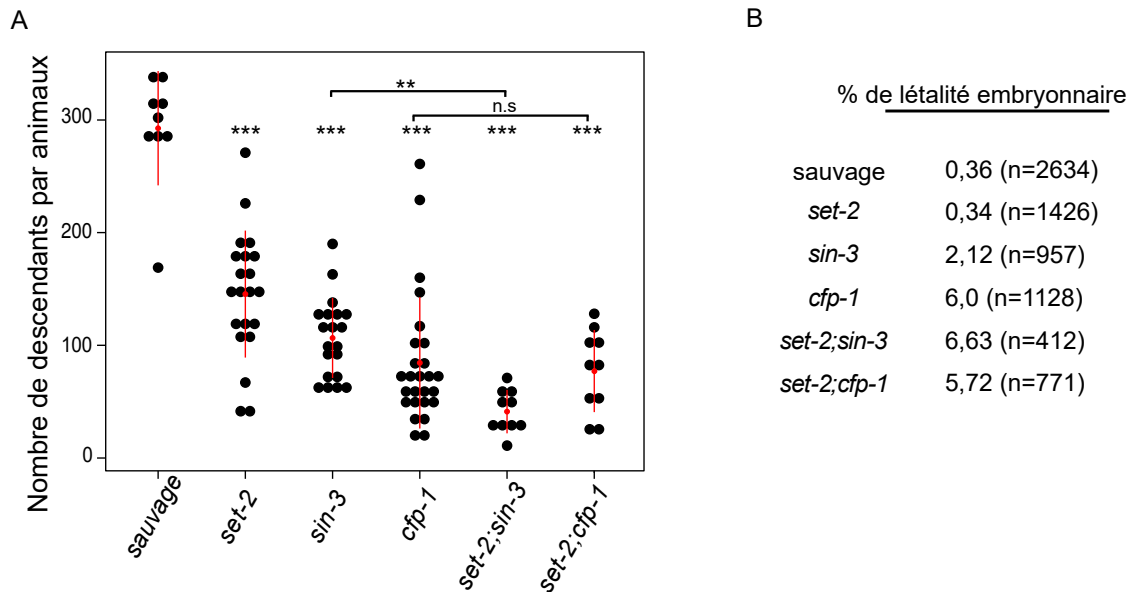


Figure 40| Nombre de descendants et létalité embryonnaire

(A) Nombre de descendants total par animaux mutants ou double mutants. Un point représente le nombre de descendants pour un animal. Les comparaisons multiples ont été faites en utilisant le test post-hoc de Dunn-Bonferroni après un test significatif de Kruskal Wallis. (** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, n.s.=non significatif). (B) Létalité embryonnaire des souches simples et doubles mutants, n= nombre d'embryons quantifiés. Figure de (Beurton et al., 2018)

Pour savoir si *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* opèrent dans la même voie pour la fertilité, nous avons généré des lignées double mutantes et nous avons quantifié le nombre de descendants. Le double mutant *set-2;cfp-1* ne produit pas un nombre de descendants inférieur à celui du mutant *cfp-1* (Figure 40 A). Ceci indique que *set-2* n'a pas de fonction dans la fertilité indépendamment de *cfp-1*. En revanche, (1) le double mutant *set-2; sin-3* présente une réduction encore plus importante du nombre de descendants que dans les simples mutants et (2) le double mutant *cfp-1;sin-3* est stérile. Ceci suggère que *sin-3* a un rôle indépendant de *set-2* et *cfp-1* dans la fertilité. La létalité embryonnaire de ces souches a également été quantifiée (Figure 40 B). La pénétrance de la létalité embryonnaire dans les différentes souches simples et doubles mutantes est faible, mais confirme les observations faites concernant les relations d'épistasie entre les différents gènes. Ces résultats montrent que *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* sont importants pour le fonctionnement de la lignée germinale et dans une moindre mesure pour le développement embryonnaire. Ces résultats montrent que *set-2* et

cfp-1 participent à une même voie dans la fertilité ; *sin-3* semble avoir des fonctions indépendantes de la voie de *set-2* et *cfp-1*.

3.3 Le mutant *cfp-1* présente des défauts de spermatogenèse

Au cours de nos expériences de comptage de la descendance, nous avons constaté que certains animaux mutants pour *cfp-1* étaient stériles, contrairement aux mutants *set-2* et *sin-3*. De plus, des expériences montrent qu'à 25°C, ce mutant est stérile après une génération à cette température (Beurton et al., 2018). Pour savoir d'où provient cette stérilité, j'ai marqué au DAPI les lignées germinales de jeunes adultes *cfp-1* à 20°C. J'ai observé une absence de spermatozoïdes dans la spermathèque (Tableau 6). Pour 18% des animaux, les deux spermathèques sont vides et pour 32% des animaux, une des deux spermathèques est vide (Tableau 6). Ce phénotype est plus pénétrant à 25°C avec 82% des animaux présentant une absence totale de spermatozoïdes (Figure 41 A). Pour savoir si la spermatogenèse a lieu et si elle est fonctionnelle chez le mutant *cfp-1*. J'ai réalisé une expérience d'observation du développement de la lignée germinale. Pour cela j'ai synchronisé des vers au stade L1 et j'ai observé les lignées germinales de ces animaux 48 h et 68 h après le stade L1. La spermatogenèse se produit vers 48h à 20°C chez le sauvage (Figure 41 B). Le mutant *cfp-1* présente un retard de croissance qui n'est pas complètement pénétrant : la population de vers se désynchronise, ceci rend l'interprétation des résultats compliquée. Néanmoins, certains animaux ne semblent pas faire de spermatogenèse, et pour ceux où la spermatogenèse a lieu elle semble sauvage. Ce phénotype n'a pas été observé chez *sin-3* et *set-2* à 20°C. Cette observation est confirmée à 25°C où la pénétrance du phénotype est plus importante (Tableau 6).

Tableau 6 | Pourcentage d'animaux présentant une absence de spermatozoïdes chez le mutant *cfp-1(tm6369)* à 20°C et 25°C

Température	Génotype	Nb d'animaux avec absence de spermatozoïdes (%)	Nb d'animaux avec absence de spermatozoïdes dans une gonade (%)	Nb d'animaux avec présence de spermatozoïdes (%)
20°C	sauvage	0	0	50 (100%)
	<i>cfp-1(tm6369)</i>	9 (18%)	16 (32%)	25 (50%)
25°C	sauvage	0	0	50 (100%)
	<i>cfp-1(tm6369)</i>	41 (82%)	6 (12%)	3 (6%)

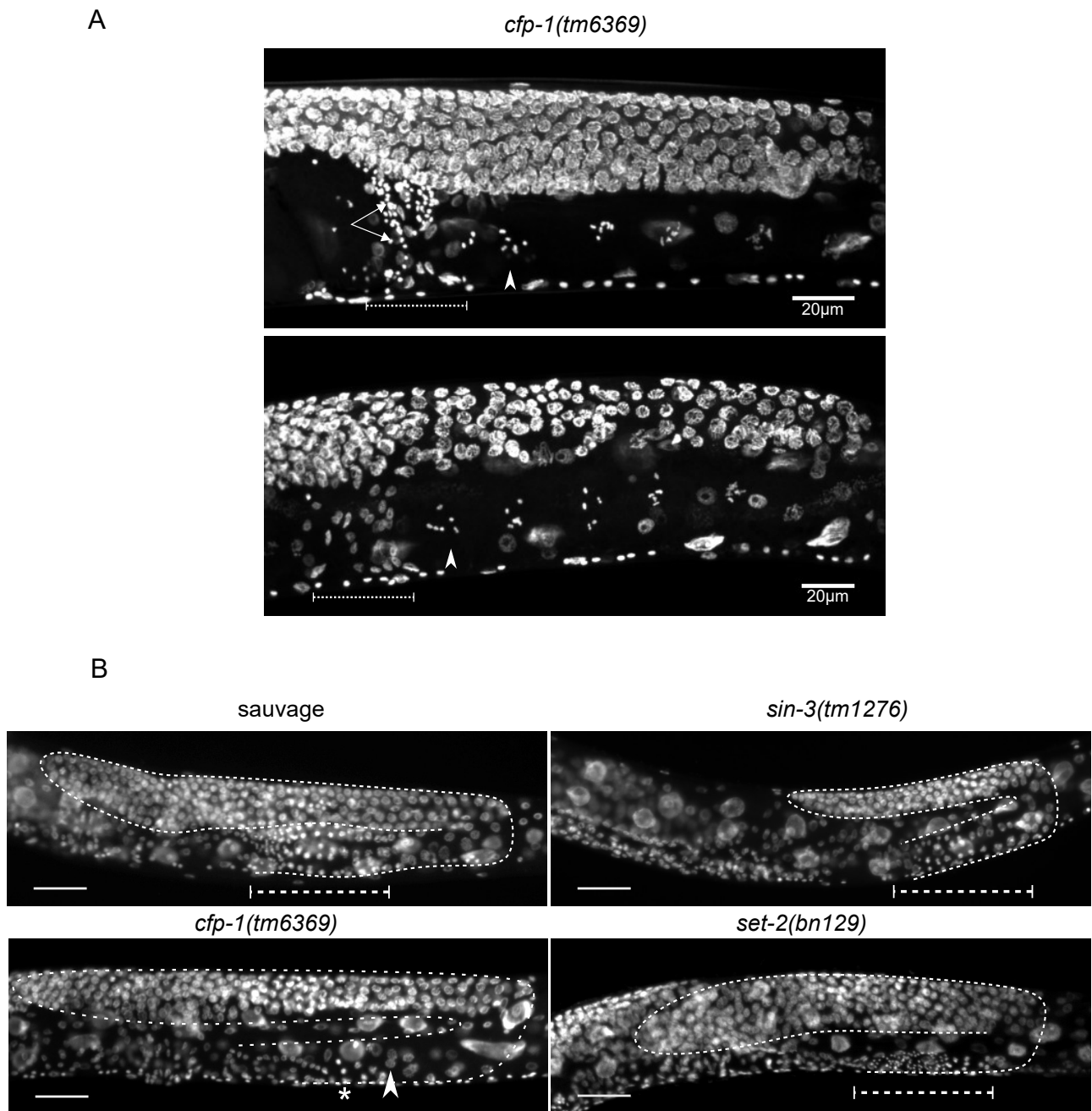


Figure 41| Défauts de spermatogenèse du mutant *cfp-1*

(A) Gonades d'animaux *cfp-1(tm6369)* présentant des spermatozoïdes dans la spermathèque (haut) ou une absence de spermatozoïdes (bas) (Images de microscopie confocale en z-stack). La spermathèque est indiquée par le trait en pointillé. Le dernier ovocyte avant la spermathèque est indiqué par une tête de flèche. Échelle : 20µm. (B) Gonades 48h après éclosion en L1 à 20°C chez le sauvage, et les mutants *set-2(bn129)*, *sin-3(tm1276)* et *cfp-1(tm6369)*. La partie de la gonade où se déroule la spermatogenèse est indiquée par les traits en pointillé. Pour le mutant *cfp-1*, la tête de flèche indique des noyaux au stade pachytène et l'astérisque des noyaux condensés. Échelle : 30µm

Cette observation pourrait indiquer un problème transcriptionnel dans la voie de déterminisme du sexe. Dans mes analyses de transcriptomique je retrouve *cpb-1* sous-exprimé, ce gène est un régulateur clé de la spermatogenèse (Luitjens et al., 2000). Toutefois, les données de transcriptomique ont été générées à un stade où la spermatogenèse n'est plus active.

Pour savoir si seule l'absence de spermatozoïdes est responsable de la stérilité observée à 20°C et à 25°C, j'ai réalisé une expérience de croisement avec des mâles sauvages. Pour cela, j'ai utilisé une souche double mutante pour *cfp-1* et pour *dpy-13*. La mutation dans le gène *dpy-13* rend les vers « Dumpy » (*dpy*), et permet de distinguer les animaux qui ont bien été fécondés par du sperme sauvage de ceux qui ne l'ont pas été. En effet, les animaux qui n'ont pas reçu de sperme sauvage vont se reproduire par auto-fécondation et auront une descendance Dumpy. À l'inverse, les animaux qui auront été croisés par des mâles sauvages auront une descendance semi Dumpy (l'allèle *dpy-13* est co-dominant). Le double mutant *cfp-1 dpy-13* présente un fort taux de stérilité (77%) à 20°C, et est complètement stérile à 25°C. 14 hermaphrodites sur les 18 mis en présence de mâles sauvages à 20°C ont eu une descendance (Tableau 7). Tous les descendants observés sont issus d'un croisement (résultats en Annexe 5), pour les 4 hermaphrodites n'ayant pas donné de descendance j'ai pu confirmer la présence de sperme pour un hermaphrodite, je n'ai pas pu tester les 3 autres hermaphrodites. Le nombre de descendants varie grandement entre les vers croisés : de 1 à 92 (26.3 en moyenne). Sur les 18 hermaphrodites non-exposés aux mâles sauvages, seuls 3 hermaphrodites ont eu une descendance avec un nombre très réduit de descendants : 1, 3 et 12. A 20°C, l'apport de sperme sauvage permet donc de restaurer en partie la stérilité associée à la mutation *cfp-1*. Ceci suggère qu'à 20°C, l'absence de spermatozoïdes est une des causes de la stérilité des mutants *cfp-1*. A 25°C les 20 hermaphrodites *dpy-13; cfp-1* mis en présence de mâles sauvages sont stériles. J'ai réalisé un marquage DAPI pour vérifier la présence de spermatozoïdes. Le marquage montre un nombre important de spermatozoïdes dans ces hermaphrodites ce qui indique que le croisement a bien eu lieu (Données non montrées). Ceci montre que la présence de spermatozoïdes n'est pas suffisante pour sauver le phénotype de stérilité des mutants *cfp-1* à 25°C.

Tableau 7 | Sauvetage de la stérilité de *cfp-1(tm6369) dpy-13(e184)* par croisement avec des mâles sauvages

Température	Présence de mâles sauvages	Nb d'hermaphrodites stériles (%)	Nb d'hermaphrodites fertiles (%)
20°C	-	14 (77%)	3 (17%)
	+	4 (22%)	15 (83%)
25°C	-	20 (100%)	0
	+	20 (100%)	0

3.4 Rôle transcriptionnel de *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* dans la lignée germinale

Pour savoir si les protéines CFP-1, SET-2 et SIN-3 co-régulent l'expression de certains gènes dans la lignée germinale de *C. elegans*, j'ai séquencé le transcriptome de la lignée germinale des mutants nuls. Pour cela, j'ai disséqué 100 lignées germinales pour chacun des mutants en triplicatas biologiques. Pour cette analyse, des animaux de la première génération issus d'un parent homozygote mutant ont été utilisés pour les mutants *set-2* et *cfp-1*. Ceci, afin d'éviter que les souches ne dérivent, mais également pour éviter une contribution maternelle si elle existe. Seule la partie distale comprenant la zone mitotique, la zone de transition et les noyaux en pachytène a été utilisée pour préparer les ARNm à séquencer (Figure 42 A). L'alignement des séquences sur le génome de référence et la quantification du nombre de séquences par gène ont été réalisés par Cécile Bedet avec le logiciel Galaxy. J'ai réalisé l'analyse d'expression différentielle à l'aide de DeSeq2 pour trouver les gènes dont l'expression diffère du sauvage pour chaque mutant. Les résultats de l'analyse en composante principale (APC) sont présentés Figure 42 B. L'APC sépare chaque groupe selon le génotype : ceci indique que l'on est capable de détecter des différences entre les mutants et qu'à l'intérieur d'un génotype les données sont très reproductibles avec un faible éparpillement entre répliquas biologiques.

Le nombre total de gènes dérégulés ($p_{\text{adj}} < 0.05$) est de 3640, 4818 et 5503 respectivement pour *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* comparé au sauvage (Figure 42 C). Le nombre de gènes surexprimés ou sous-exprimés est quasiment identique pour *cfp-1* (2378 sous-exprimés, 2440 surexprimés) et *set-2* (1808 sous-exprimés, 1832 surexprimés). Cela indique que *set-2* et *cfp-1* ont à la fois une fonction répressive et activatrice dans la lignée germinale, cependant on ne sait pas s'il s'agit de cibles directes ou indirectes par la dérégulation des facteurs qui les contrôlent. Cette observation concernant un rôle répressif des composants du complexe SET1/SET-2 a déjà été faite par l'équipe

avec des données de micro-array (Robert et al., 2014). Cependant, dans ces nouvelles données, le nombre de gènes surexprimés en l'absence de *set-2* ne constitue pas la majorité des gènes dérégulés contrairement aux observations précédentes. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une souche dérivée de plusieurs générations a été utilisée pour les expériences de micro-array. Or il semblerait qu'il y ait, chez ce mutant, une accumulation de défauts au cours des générations. La régulation de la transcription des gènes pourrait différer entre les générations précoces et plus tardives.

Partie II – Résultats

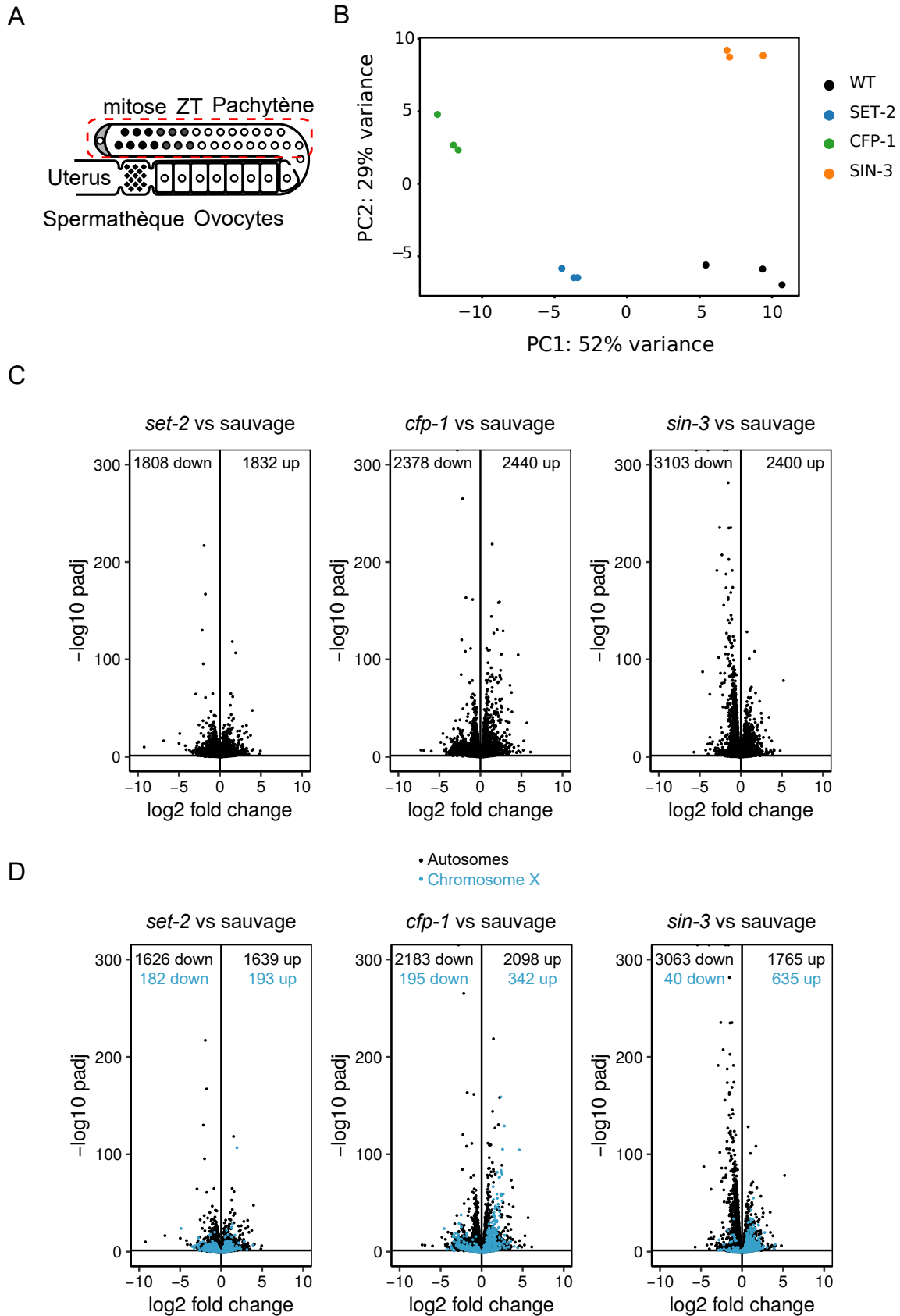


Figure 42 | Transcriptomique des lignées germinales des mutants *set-2*, *cfp-1* et *sin-3*

(A) Représentation schématique de la partie de la lignée germinale utilisée pour établir le transcriptome (entouré en pointillés rouges), ZT : zone de transition. (B) analyse en composante principale (PC1 et PC2) des triplicats biologiques des mutants *set-2*, *cfp-1*, *sin-3* et des sauvages (WT). (C-D) Volcano Plot de la p.valeur ajusté (p.val) en fonction du log2 fold change. Les gènes surexprimés (up) et sous-exprimés (down) sont indiqués. (D) Sont indiqués en noir les gènes autosomaux et en bleu les gènes liés à l'X.

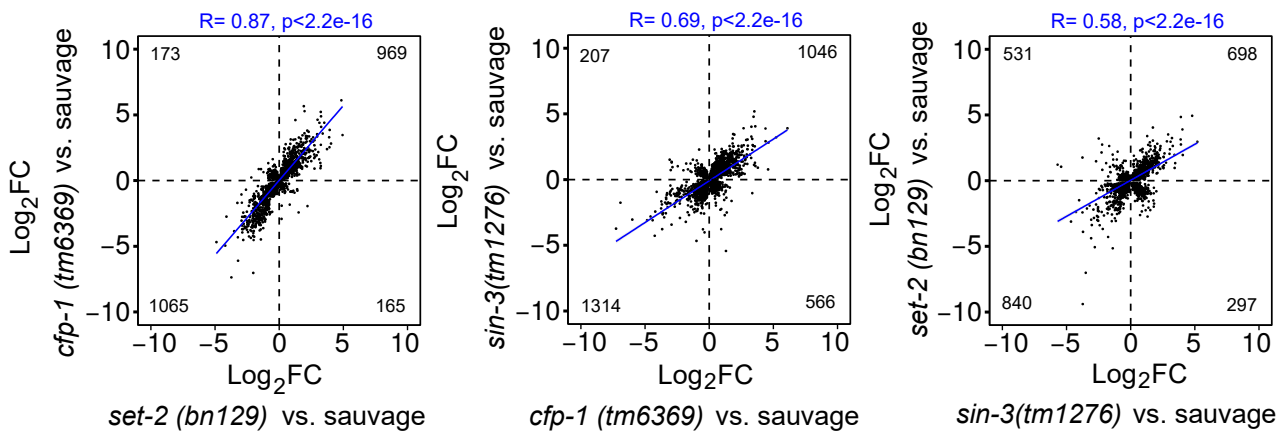
De manière surprenante, un plus grand nombre de gènes sont sous-exprimés chez le mutant *sin-3* (3103 sous-exprimés, 2400 surexprimés), indiquant que *sin-3* pourrait avoir une fonction activatrice dans la lignée germinale. Un rôle activateur de SIN-3 a déjà été documenté dans d'autres espèces (Alland et al., 1997; Gajan et al., 2016; Kadamb et al., 2013; Laherty et al., 1997; van Oevelen et al., 2010; Saha et al., 2016; Saunders et al., 2017; Shi et al., 2006). Notamment dans les cellules de drosophile où l'inactivation de Sin3 montrent un nombre de gènes sous-exprimés ou surexprimés équivalent (Gajan et al., 2016; Saha et al., 2016).

Pour savoir si des gènes sont co-régulés par les gènes *set-2*, *cfp-1* et *sin-3*, j'ai tout d'abord regardé la corrélation des « fold change » des gènes différentiellement exprimés communs entre deux mutants (Figure 43 A). On observe une corrélation positive qui est plus importante entre *cfp-1* et *set-2* ($R=0.87$), et plus faible entre *set-2* et *sin-3* ($R=0.58$). Ainsi, 73% des gènes sous-exprimés chez le mutant *set-2* (82% des gènes surexprimés) sont également sous-exprimés dans au moins un des mutants *sin-3* ou *cfp-1*. Pour le mutant *cfp-1*, 76% des gènes sous-exprimés (64 % des gènes surexprimés) sont sous-exprimés dans au moins un des mutants *sin-3* ou *set-2*. Pour le mutant *sin-3*, les pourcentages de gènes dérégulés dans au moins un autre mutant (*set-2* ou *cfp-1*) sont plus faibles et représentent 51% des gènes sous-exprimés (54% des gènes surexprimés).

Certains gènes sont dérégulés de la même façon (sous- ou surexprimés) entre les trois mutants (Figure 43 B). Ainsi entre 18.8 % et 25 % des gènes sous-exprimés sont communs aux trois mutants (entre 18.6 % et 31.9 % pour les gènes surexprimés). Ces gènes co-régulés ne représentent qu'une minorité des gènes différentiellement exprimés dans chacun des mutants. Le recouvrement entre ces trois mutants n'est donc pas complet et un grand nombre de gènes ne sont pas co-régulés. On peut d'ailleurs remarquer que certains gènes sont même régulés de manière opposée entre deux mutants (corrélation négative) (Figure 42 A), avec 338 gènes entre *set-2* et *cfp-1*, 773 gènes entre *cfp-1* et *sin-3* et 828 gènes entre *set-2* et *sin-3*.

Ces résultats montrent qu'un sous-ensemble de gènes sont co-régulés par les trois mutants, mais ne représentent pas la majorité des gènes différentiellement exprimés. Il semblerait que ces mutants puissent également avoir des fonctions individuelles, voir opposées dans la régulation transcriptionnelle de certains loci.

A



B

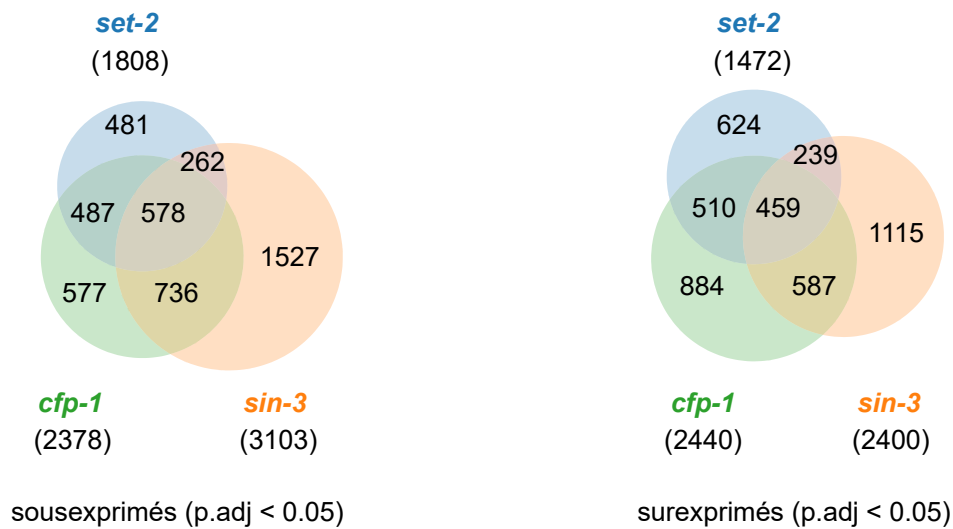


Figure 43| Un sous-ensemble de gènes est positivement régulé par *set-2*, *cfp-1* et *sin-3*

(A) Distribution des gènes en commun dérégulés chez *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* deux à deux selon leur $\log_2$ fold change (Log_2FC), p = corrélation de Pearson, R = coefficient de corrélation. (B) Recouvrement des gènes surexprimés ou sous-ex(p. $\text{adj} < 0,05$) entre les mutants *set-2*, *cfp-1* et *sin-3*. Le nombre total de gènes surexprimés ou sous-exprimés pour chaque mutant est indiqué entre parenthèses.

Pour savoir si des processus biologiques similaires sont régulés par ces gènes, j'ai réalisé une analyse d'enrichissement en termes d'ontologie (Angeles-Albores et al., 2016 ; Angeles-Albores et al., 2018). Cette analyse montre des voies communes associées aux gènes sous-exprimés pour les trois mutants, tels que le vieillissement, le développement embryonnaire et les processus cataboliques des protéines (Figure 44). Pour les gènes surexprimés, seul le processus de métabolisme des ARN ribosomiques est associé aux trois mutants. Un plus grand nombre de termes

est commun à *set-2* et *cfp-1*. Certains termes sont uniques à un mutant, comme la glycosylation pour *set-2*. De manière intéressante, les termes uniques des gènes surexprimés chez *sin-3* sont associés à des fonctions neuronales (« neurogenesis », « regulation of neuron differentiation »), ces termes pourraient être associés à une perte d'identité de la lignée germinale (Robert et al., 2014).

L'ensemble de ces résultats montre que *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* co-régulent un sous-ensemble de gènes dans la lignée germinale. Cependant, il semblerait que ces gènes possèdent également des fonctions indépendantes.

Partie II – Résultats

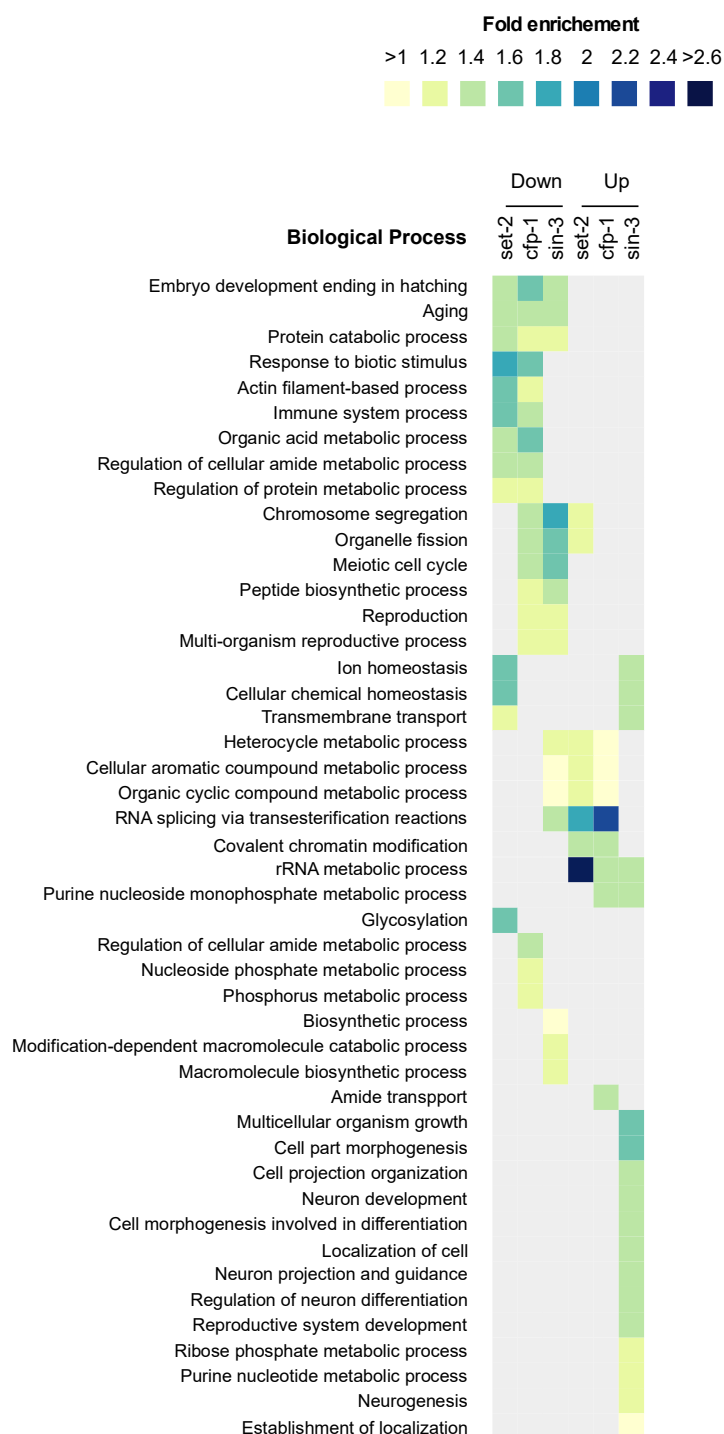


Figure 44| Analyse en termes d'ontologie

Description des termes d'ontologie associés aux gènes significativement surexprimés (up) ou sous-exprimés (down) ($p_{adj} < 0,05$). Les couleurs représentent l'enrichissement d'un terme dans une condition donnée, en gris : le terme n'est pas retrouvé.

3.4.1 En absence de *set-2* et *sin-3*, les transcrits des ovocytes sont surexprimés dans la partie distale de la lignée germinale

Pour savoir dans quels tissus les gènes différentiellement exprimés chez *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* sont exprimés dans les animaux sauvages, j'ai utilisé des listes pré-établies dans la littérature (Lee et al., 2017). Ces listes rassemblent des gènes exprimés dans les prégamètes (zone mitotique et méiotique), dans les ovocytes, durant la spermatogenèse et dans le soma. Les gènes surexprimés dans le mutant *set-2* sont surreprésentés dans la catégorie des gènes prégamétiques et ovocytaires (Figure 45). Aucune catégorie de gènes n'est surreprésentée pour le mutant *cfp-1*. Pour *sin-3* les gènes surexprimés sont très fortement enrichis dans la catégorie ovocyte ; par ailleurs, les gènes sous-exprimés sont enrichis en gènes prégamétiques. Ces résultats suggèrent que SET-2 et SIN-3 contribuent tous les 2 à empêcher l'expression précoce des gènes ovocytaires. De plus, SET-2 semble réprimer les gènes pré-gamétiques alors que SIN-3 pourrait promouvoir leur expression. De manière surprenante, la catégorie soma, n'est pas enrichie dans les mutants *set-2* bien que des expériences précédentes, réalisées sur une souche *set-2(bn129)* dérivée pendant plusieurs générations, montrent une surexpression de cette catégorie dans la lignée germinale (Robert et al., 2014).

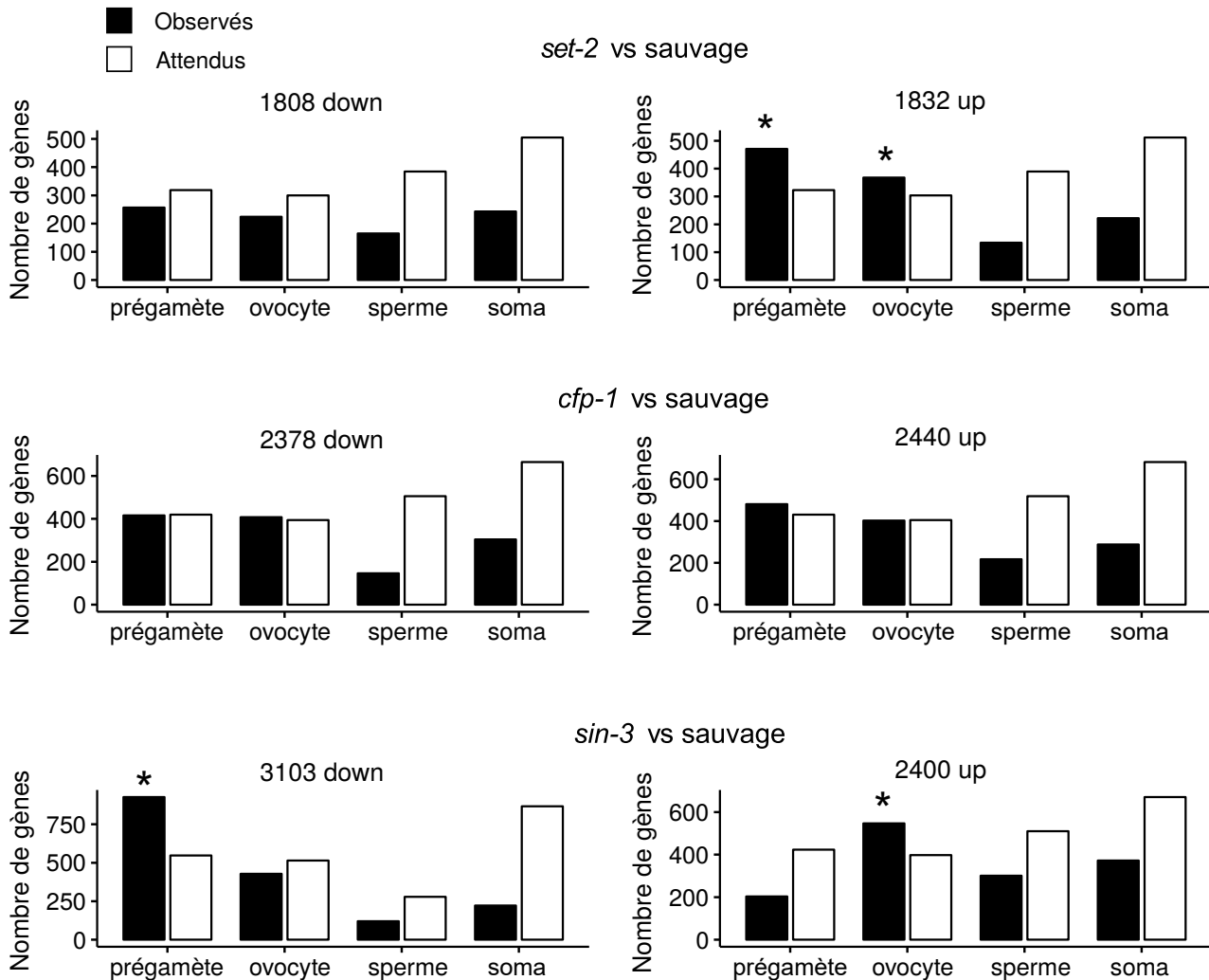


Figure 45| Surreprésentation de catégories de gènes parmi les gènes différentiellement exprimés

Pour les gènes sur- ou sous-exprimés (up down) dans les mutants *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* : diagramme en Barre représentant la valeur observée ou attendue du nombre de gènes (axe y) dans différentes catégories d'expression (axe x). Ces catégories sont tirées de Lee et al. Elles comprennent 1694 gènes exprimés dans les prégamètes, 1594 gènes exprimés dans les ovocytes, 2042 gènes spermatiques et 2684 gènes somatiques. Les astérisques indiquent un nombre de gènes significativement supérieur à la valeur attendue. (Test hypergéométrique, * $p < 0,01$).

3.4.2 Biais de la répartition des gènes différentiellement exprimés entre autosomes et chromosome X pour les mutants *cfp-1* et *sin-3*

Le chromosome X est réprimé dans la partie distale de la lignée germinale et ne s'exprime que dans les ovocytes (Kelly et al., 2002). Il est enrichi en gènes impliqués dans la maturation des ovocytes et est déplété en gènes nécessaires au développement de la lignée germinale (Kelly et al., 2002 ; Reinke et al., 2000 ; Reinke et al., 2004). Pour savoir si le chromosome X est dérégulé, j'ai regardé la répartition des gènes différentiellement exprimés le long du génome selon leur « Fold

Change » (Figure 42 C, Figure 46). Le mutant *set-2* ne présente pas de biais dans la répartition chromosomique des gènes dérégulés. Les gènes surexprimés dans les mutants *cfp-1* et *sin-3* sont enrichis en gènes localisés sur le chromosome X ($p=6,21e-3$, $p=1,11e-113$ respectivement) par rapport à ce qui est attendu de manière aléatoire. Par ailleurs, pour *sin-3*, la moitié des gènes sous-exprimés liés à l’X, (20/40) sont dans les premiers 300 kb du chromosome X. Cette région du chromosome X a été décrite comme n’étant pas régulée de la même façon : le profil des marques d’histones présentes dans cette région ressemble à celui d’un autosome (alternance de blocs dépourvus ou enrichis en H3K27me3 et présence de H3K36me3) et diffère du reste du chromosome X qui est entièrement dépourvu de H3K36me3 et uniformément enrichi en H3K27me3 (Gaydos et al., 2012). Ces résultats indiquent que SIN-3 et dans une moindre mesure CFP-1 joue un rôle dans la répression du chromosome X dans la lignée germinale.

Partie II – Résultats

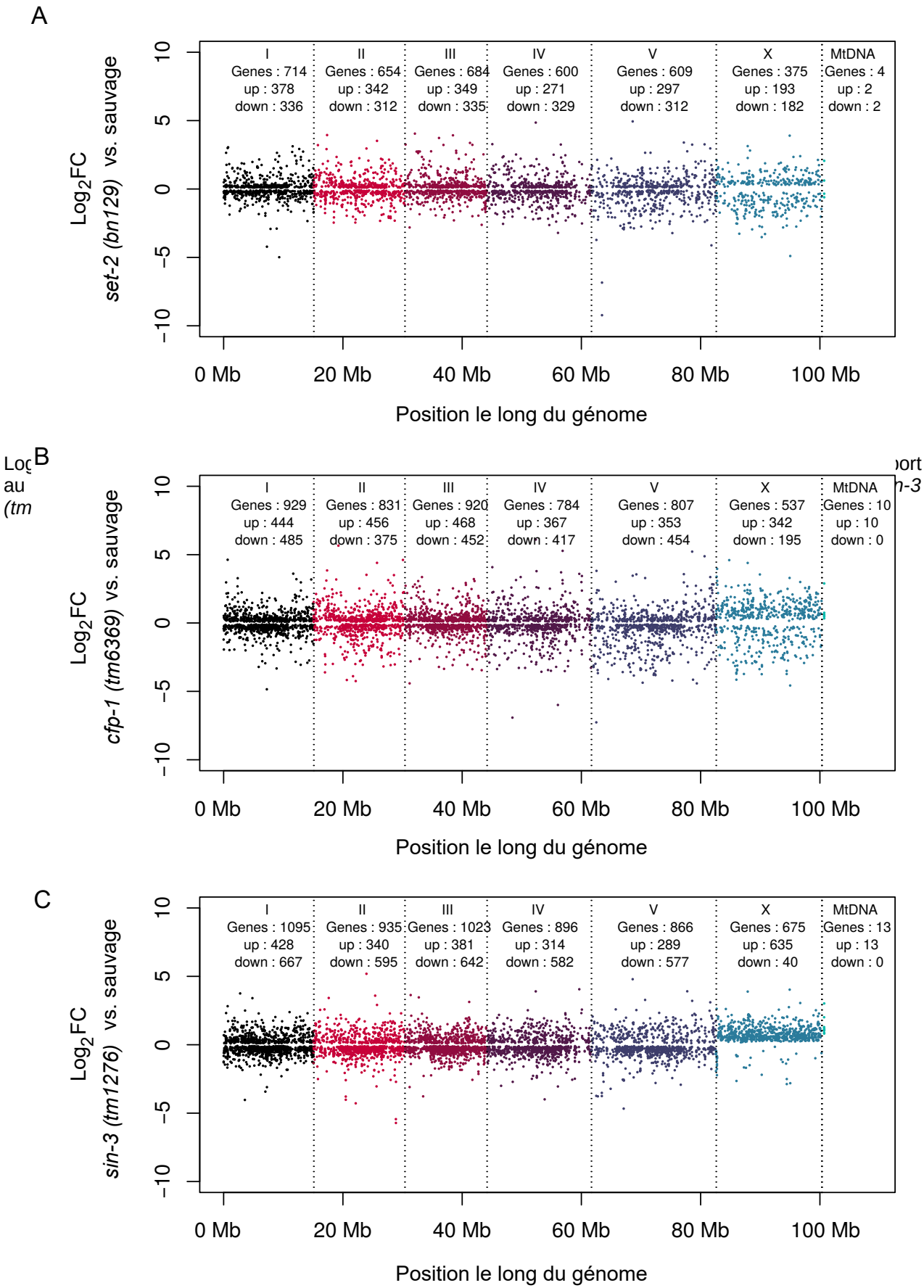


Figure 46 Répartition des gènes différentiellement exprimés le long du génome

3.4.3 SIN-3 réprime l'expression des mêmes gènes que MES/PRC2 sur le chromosome X

Certains complexes d'HMTs et de remodelage de la chromatine sont impliqués dans la régulation du chromosome X dans la lignée germinale. Pour rappel, la répression du chromosome X fait intervenir l'action conjointe du complexe PRC2 qui méthyle H3K27 et qui est composé de MES-2, MES-3 et MES-6 (Gaydos et al., 2012 ; Bender et al., 2006)(Bender et al., 2004) et de MES-4 (homologue de NSD chez les mammifères). Cette répression se fait par le dépôt de la marque H3K36me3 par MES-4 sur les autosomes et par la limitation du dépôt de H3K27me3 par PRC2 sur le X (Gaydos et al., 2012 ; Evans et al., 2016). D'autres acteurs sont responsables de la régulation du chromosome X comme *mrg-1* (Takasaki et al., 2007) qui code une sous-unité conservée du complexe SIN3/HDAC (Hajduskova et al., 2019 ; Beurton et al., 2018), et réprime le X de manière indépendante des gènes *mes* (Takasaki et al., 2007). Pour savoir si les gènes dérégulés sur le chromosome X chez *sin-3*, *cfp-1* et *set-2* font partie des gènes réprimés par les gènes *mes*, j'ai rassemblé les données obtenues dans 3 études transcriptomiques (Bender et al., 2006; Gaydos et al., 2012; Tabuchi et al., 2014). Ces données ont été obtenues par micro-array ou RNAseq, dans la partie distale de la lignée germinale, pour les simples mutants *mes-4* et *mes-2* ou les doubles mutants *mes-2; mes-4* (Tableau 15). Le recouvrement de ces listes n'est pas complet ce qui peut être expliqué par les différentes techniques utilisées, l'analyse ou la profondeur du séquençage. J'ai créé une liste unique rassemblant tous les gènes liés à l'X qui ont été retrouvés surexprimés dans l'une de ces études. Cette liste comprend 554 gènes. Plus de 59 % des gènes surexprimés liés à l'X chez *sin-3* sont présents dans cette liste (Figure 47) ($p < 0,001$). Par ailleurs, les gènes liés à l'X surexprimés chez *cfp-1* et *set-2* sont également retrouvés dans cette liste et 57 % à 58 % sont en commun avec *sin-3*. Ces résultats confirment une dérégulation du chromosome X dans la lignée germinale du mutant *sin-3* mais également du mutant *cfp-1*. L'activité conjointe de régulateurs de la chromatine semble essentielle à la bonne régulation du chromosome X dans la lignée germinale. En effet de nombreuses marques d'histones sont différenciellement associées aux chromosomes X ou aux autosomes dans la lignée germinale (Kelly et al., 2002 ; Tabuchi et al., 2011). Ce point sera discuté plus amplement dans la partie discussion.

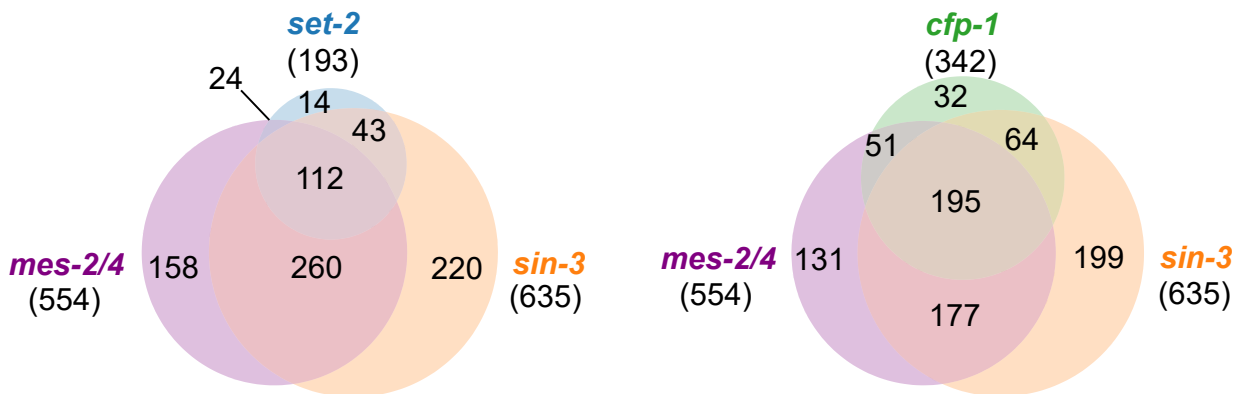


Figure 47 | Diagrammes 3 à 3 entre les gènes liés à l'X surexprimés chez les mutants *mes*, *set-2*, *cfp-1* et *sin-3*

La liste *mes-2/4* comprend 554 gènes liés à l'X surexprimés dans différentes études transcriptomiques (voir matériel et méthode). 635 gènes liés à l'X sont surexprimés chez le mutant *sin-3* ; 193 et 342 pour les mutants *set-2* et *cfp-1* respectivement.

3.4.4 Les lignées germinales des mutants *sin-3* ont une taille réduite

La dérégulation de gènes liés à l'X est associée à la mort des cellules de la lignée germinale (Capowski et al., 1991 ; Garvin et al., 1998 ; Tabuchi et al., 2011). Les mutants qui régulent l'expression du chromosome X dans la lignée germinale ont des gonades atrophiées ou de taille réduite (Takasaki et al., 2007 ; Tabuchi et al., 2014 ; Garvin et al., 1998). J'ai observé au cours de mes expériences que les lignées germinales du mutant *sin-3* avaient une taille réduite (Figure 48 et Figure 41 B). Cette taille réduite des gonades pourrait également expliquer le nombre de descendants réduits chez le mutant *sin-3* (Figure 40). Il faudrait confirmer ces résultats en quantifiant le nombre de noyaux par gonades. Cette observation est en accord avec la fonction de *sin-3* dans la régulation du chromosome X.

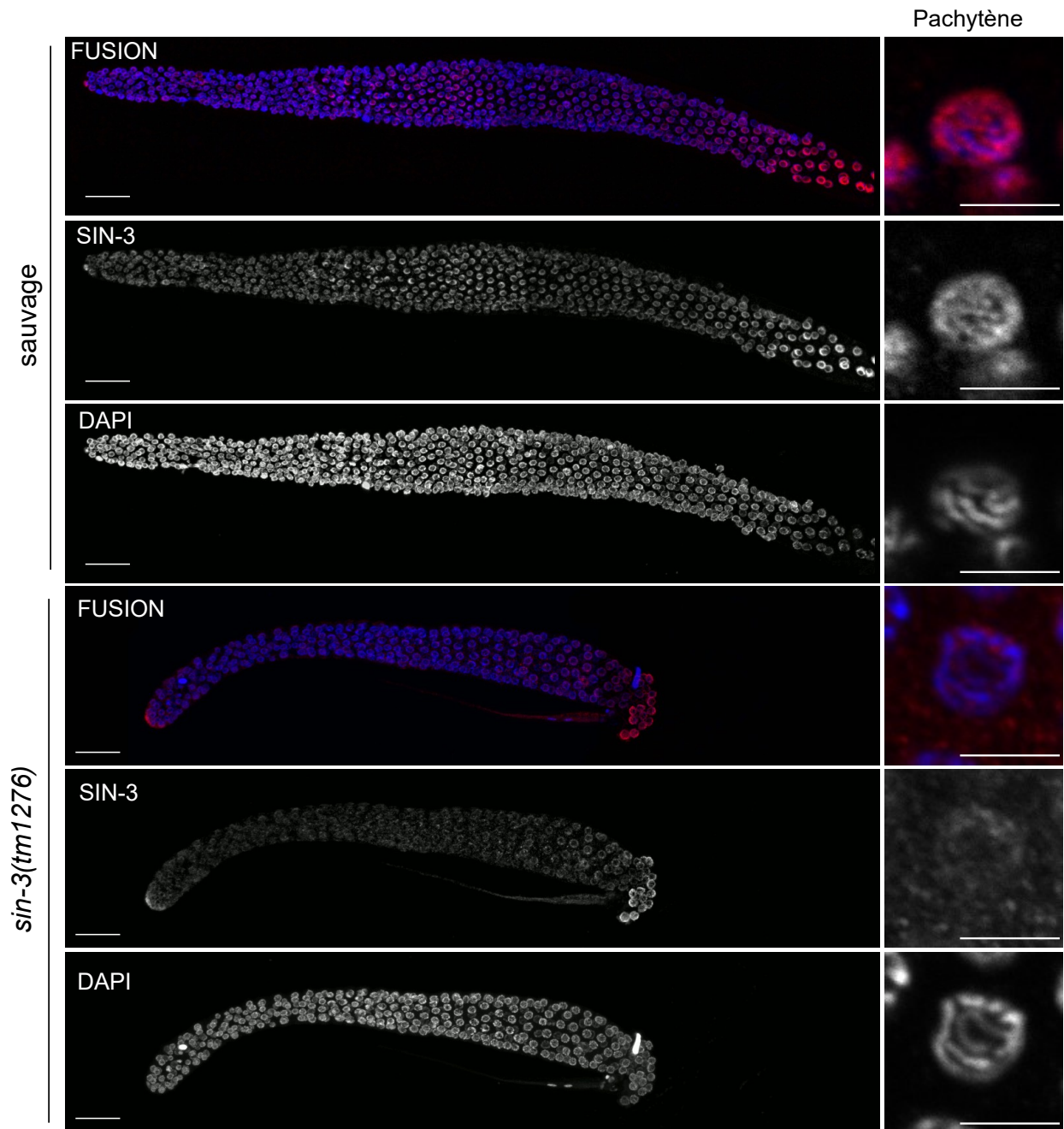


Figure 48| Localisation de la protéine SIN-3 dans la lignée germinale

Immunomarquage de SIN-3 (en rouge) sur la chromatine (en bleu) dans des lignées germinales disséquées ou des noyaux en pachytène (encart) chez le sauvage, ou le mutant *sin-3(tm1276)*. Échelle des gonades : 20µm, échelle des noyaux : 5µm.

Les protéines responsables de la régulation du chromosome X dans la lignée germinale sont localisées de manières différentielles sur les chromosomes. MES-4 et MRG-1 sont localisées sur les autosomes et sont exclues du chromosome X (Takasaki et al., 2007 ; Bender et al., 2006). De manière intéressante, le chromosome X est hypoacétylé (Kelly et al., 2002 ; Tabuchi et al., 2011).

Or l'activité putative du complexe SIN3/HDAC est la déacétylation des marques d'histones. Pour savoir si la protéine SIN-3 est localisée de manière différente sur les autosomes et le chromosome X, j'ai réalisé une expérience d'immunofluorescence avec deux anticorps dirigés contre SIN-3. Le premier anticorps testé s'est révélé peu spécifique : le marquage ne disparaît pas chez le mutant *sin-3(tm1276)*, et il marque d'autres composants cellulaires telle que les centrosomes (données non montrées). Le marquage réalisé avec le second anticorps disparaît en très grande partie chez le mutant *sin-3(tm1276)*. Le marquage dans le sauvage, montre que la protéine SIN-3 a une localisation nucléoplasmique et qu'elle est présente dans l'ensemble de la lignée germinale. De plus, le marquage ne semble pas être localisé directement à la chromatine mais plutôt entre les chromosomes (Figure 48). La qualité de ces marquages n'est pas suffisante pour savoir si la protéine SIN-3 est présente sur la chromatine et par conséquent n'est pas possible d'observer une éventuelle localisation différentielle entre autosome et chromosome X (Figure 48). De nouvelles expériences sont en cours de réalisation en utilisant un allèle CRISPR *sin-3* étiqueté mCherry et que j'ai contribué à développer.

Partie III – Discussion et perspectives

1 Rôle de *set-2* dans l'organisation de la chromatine dans la lignée germinale

La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est une marque communément associée avec les promoteurs de gènes activement transcrits et impliquée dans une variété de processus cellulaires et développementaux. Cette modification post-traductionnelle ainsi que la famille de complexes d'histones méthyltransférases SET1/MLL sont hautement conservées. *Caenorhabditis elegans* possède un homologue de SET1 appelé SET-2 qui est responsable de la méthylation globale de H3K4 dans le soma et dans la lignée germinale à tous les stades développementaux. L'inactivation de *set-2* résulte en une perte progressive de la fertilité au cours des générations à la température restrictive de 25°C, un phénotype appelé « mortal germline » (*mrt*). Puisque le phénotype de mortalité de la lignée germinale est associé dans certains cas à des défauts de réparation de l'ADN (Smelick and Ahmed, 2005), je me suis intéressée à la réponse aux dommages à l'ADN dans le mutant *set-2*. Les résultats obtenus en étudiant *set-2* montrent une sensibilité accrue aux agents génotoxiques. De plus après irradiation du mutant *set-2*, on observe une persistance des cassures double brin visualisées par la présence de foci RAD-51. Cependant, la persistance de ces foci après irradiation ne résulte pas en une augmentation de la fragmentation de l'ADN, ces cassures sont donc réparées. Par ailleurs l'analyse génomique après 30 générations ne montre pas d'accumulation de mutations. Au niveau transcriptionnel, les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ne sont pas non plus affectés par l'absence de *set-2*. À la vue de ces résultats, il semblerait que le phénotype *mrt* de *set-2* ne provienne pas de défauts de réparation. Corroborant cette hypothèse, des expériences réalisées par l'équipe ont montré que le phénotype *mrt* à 25°C est réversible en une génération en transférant les animaux à 20°C. Ces résultats suggèrent que la capacité de réparation des dommages de l'ADN n'est pas affectée en l'absence de SET-2. Il est possible que SET-2 ait un rôle plus global sur la structure de la chromatine et aux sites des cassures.

Corroborant l'hypothèse d'un rôle de SET-2 dans la structure des chromosomes, j'ai mis en évidence une interaction génétique entre le complexe Condensine II et *set-2* dans la lignée germinale. Condensine II est un complexe hautement conservé qui régule la structure des chromosomes dans divers processus tels que la ségrégation des chromosomes, la réparation de l'ADN, la recombinaison. Les mutations ou la déplétion par ARNi des sous-unités de Condensine II

induisent des défauts d'organisation de la lignée germinale et de fertilité qui sont aggravés en l'absence de SET-2. L'analyse par FLIM FRET des noyaux en pachytène des mutants *set-2* montre que l'absence de *set-2* diminue l'efficacité moyenne de FRET entre les histones H2B ce qui indique que *set-2* participe à la compaction de la chromatine en pachytène (Figure 61 Annexe 8). Ces résultats semblent indiquer un rôle structural de *set-2* dans l'organisation de la chromatine dans la lignée germinale en parallèle de Condensine II. Les défauts observés dans les lignées germinales après RNAi contre Condensine II, semblent provenir de défauts mitotiques au moment de la prolifération de la lignée germinale (Figure 33 et 34). La taille réduite des gonades du double mutant *set-2; hcp-6* illustre également des défauts mitotiques avec une prolifération plus faible.

1.1 Modèle fonctionnel pour expliquer l'interaction génétique entre *set-2* et Condensine II

En contexte *in vivo*, chez *S. pombe* des mutations dans des facteurs de remodelage de la chromatine tel que le complexe RSC, Swi/Snf ainsi que l'activité acétyltransférase de Gcn5, influencent positivement ou négativement la liaison de Condensine à l'ADN (Robellet et al., 2014; Toselli Mollereau et al., 2016). Le positionnement des nucléosomes et leur « turn-over » semblent essentiels pour la liaison préférentielle des Condensines au niveau de régions déplétées en nucléosomes (Piazza et al., 2014; Robellet et al., 2017). De façon intéressante, il a été montré chez la levure *S. cerevisiae* que Set1 et Jhd2 (l'histone méthyltransférase de H3K4 et l'histone déméthylase de H3K4me respectivement), malgré leurs activités catalytiques antagonistes, influencent le « turn-over » et la position des nucléosomes (Ramakrishnan et al., 2016). On ne sait pas si le positionnement des nucléosomes est modifié en l'absence de *set-2*. Les expériences de FRAP réalisées par nos collaborateurs dans le mutant *set-2* ne montrent pas de défauts de remplacement des nucléosomes. Je ne peux donc pas exclure que l'absence de *set-2* et de la marque H3K4me3 influencent le positionnement des nucléosomes et en retour la liaison de Condensine II. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions utiliser des techniques telle que la digestion de l'ADN par la Nucléase micrococcale (MNase). La MNase digère l'ADN nu qui n'entoure pas les octamères d'histones. Le séquençage des fragments d'ADN non digéré (MNase-seq) permet d'obtenir un profil des positions des nucléosomes le long du génome. Dans l'idéal, il faudrait réaliser cette technique avec des noyaux de lignées germinales purifiés puisque la position des nucléosomes est spécifique aux types cellulaires (Baldi, 2019).

Par ailleurs, chez de nombreux organismes dont *C. elegans*, Condensine I et II sont enrichies au niveau des promoteurs des gènes transcriptionnellement actifs et leur présence corrèle avec celle de H3K4me3 (D'Ambrosio et al., 2008; Downen et al., 2013; Kim et al., 2013; Kranz et al., 2013). Il semblerait que la transcription influence la liaison de Condensine aux chromosomes, peut-être en créant des régions déplétées en nucléosomes. Il a également été proposé que la queue des histones pouvait jouer un rôle de récepteur des condensines (Robellet et al., 2017). En effet, chez les mammifères plusieurs sous-unités des condensines ont été montrées comme interagissant avec la queue des histones H3, H4 ou H2A.Z (Ball et al., 2002; Liu et al., 2010; Tada et al., 2011). Plus récemment, une étude montre que dans les cellules de mammifères, H3K4me3 participe au recrutement de Condensine II en interphase (Yuen et al., 2017). Compte-tenu de la forte colocalisation entre H3K4me3 et Condensine II chez *C. elegans* (Kranz et al., 2013), il serait intéressant de savoir si *set-2* joue un rôle similaire dans le recrutement de Condensine II dans la lignée germinale. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi j'observe une aggravation du phénotype des lignées germinales en absence de *set-2* : la déplétion de Condensine II n'étant pas complète (Figure 33 C), les complexes restant sont capables d'être recrutés efficacement au niveau des chromosomes lorsque SET-2 est présente. En absence de *set-2*, Condensine II n'est plus efficacement recruté ce qui conduit à une diminution du nombre de complexes sur les chromosomes et à une aggravation du phénotype. Pour tester cette hypothèse, il est envisageable d'utiliser des méthodes de ChIP-seq pour déterminer la quantité de Condensine II à des locus cibles en contexte sauvage et lorsque SET-2 est absente. Alternativement il est possible d'effectuer des expériences de ChIP-qPCR sur des sites cibles. En effet, des expériences réalisées par le consortium ModENcode ont identifié des locus cibles enrichis en Condensine II chez l'adulte (ces données n'existent pas pour Condensine I chez l'adulte, mais sont disponibles chez l'embryon). Par ailleurs, nous avons deux lignées transgéniques pour deux sous-unités des complexes Condensine I et II : CAPG-1 étiquetée GFP (Condensine I) ou KLE-2 étiquetée GFP (Condensine II) qui nous permettrons d'immunoprécipiter ces protéines dans les adultes.

L'interaction génétique *set-2*/Condensine II pourrait provenir d'une régulation de l'activité des condensines par des modifications post-traductionnelles. En effet il a été montré que les condensines peuvent subir plusieurs de ces modifications qui activent ou inhibent leur activité au cours du cycle cellulaire (Piazza et al., 2013). Pour le moment, seules des acétylations ou des phosphorylations des sous-unités des condensines ont été décrites. Par ailleurs, les HMT peuvent aussi modifier des substrats non-histones, c'est le cas de SET1A qui méthyle HSP70 (Cho et al.,

2012). De plus, des données non publiées de l'équipe de Slimane Ait-Si-Ali (Université Paris Diderot) indiquent que SETDB1 (histone méthyltransférase de H3K9) méthyle CapD2 (une sous-unité de Condensine II) ce qui pourrait moduler son activité. On pourrait imaginer un mode d'action similaire pour SET-2. Nous avons récemment obtenu un allèle CRISPR de *set-2* étiqueté par Spot qui nous permettra de tester dans un premier temps une interaction physique entre SET-2 et les sous-unités KLE-2 de Condensine II ou CAPG-1 de Condensine I. Afin de tester les modifications post-traductionnelles des condensines, il faudrait pouvoir purifier ce complexe pour l'analyser en spectrométrie de masse.

1.2 *set-2* a un effet suppresseur de la létalité embryonnaire du mutant *hcp-6(mr17)*

De manière intéressante, l'absence de *set-2* sauve en partie la létalité embryonnaire des mutants *hcp-6* (Figure 34 et 35). Un effet similaire a déjà été observé lorsque *hcp-6* est déplété par ARNi dans un contexte mutant pour *brc-1* (Hong et al., 2016). *brc-1* code l'hélicase BRCA1 qui, au cours de la recombinaison homologue, est impliquée dans la formation des crossing-overs : BRCA1 permet de recruter RAD51 au niveau des cassures double brin (Janisiw et al., 2018; Scully et al., 1997). Lorsque *hcp-6* est inactivé dans un contexte sauvage, des ponts chromatiniens sont formés pendant la méiose. La mutation de *brc-1* supprimerait la formation de ces ponts chromatiniens en perturbant la formation des crossing-over. Dans le mutant *set-2*, la fréquence des crossing-over entre les loci *dpy-13* et *unc-5* n'est pas affectée (Tableau 5), ce qui suggère que la recombinaison homologue est normale. De plus, les expériences de réparation que j'ai réalisées au locus *dpy-10* ne montrent pas de différence d'utilisation de la voie de recombinaison homologue par rapport à la voie de réparation non-conservative NHEJ (Non-homologous end joining) (Figure 4 du manuscrit). Cependant un événement de SDSA (synthesis-dependent strand annealing) a pu être observé après excision d'un élément transposable au locus *unc-5* en contexte mutant pour *set-2*. Le SDSA a lieu au cours de la recombinaison homologue si le brin d'ADN en cours d'élongation se détache de sa matrice (Figure 61). Il est possible qu'au cours de la recombinaison homologue chez le mutant *set-2*, les brins en cours d'élongation se dissocient plus facilement, ce qui pourrait permettre de limiter la formation de ponts chromatiniens dans un contexte mutant pour *hcp-6*. Pour valider ce modèle, Il faudra tester si l'absence de SET-2 permet de réduire le nombre de ponts chromatiniens méiotiques induit par l'absence de *hcp-6*.

Par ailleurs, il a été montré que les cellules mitotiques de la lignée germinale présentant des défauts entrent en méiose avant d'être éliminées par la voie apoptotique au stade pachytène (Stevens et al., 2013). Ceci permet d'éviter la formation d'ovocytes aneuploïdes. De manière cohérente avec des défauts mitotiques plus importants, j'observe une augmentation de l'apoptose dans le double mutant *hcp-6; set-2* comparé aux mutants simples *hcp-6* et *set-2*. Ceci pourrait participer à l'élimination d'un plus grand nombre de noyaux défectueux et améliorer la qualité des gamètes du double mutant *hcp-6; set-2*.

1.3 Spécificité de l'interaction génétique entre Condensine II et *set-2*

La mise en évidence d'une interaction génétique entre Condensine II et *set-2* soulève la question de la spécificité d'une telle interaction. En effet, on peut supposer que toutes les marques d'histones influencent d'une manière ou d'une autre la structure de la chromatine et gênent l'activité des condensines. Comme attendu, j'observe également que le mutant *cfp-1* qui code une sous-unité du complexe SET1/SET-2 interagit avec Condensine II (Figure 37). Pour confirmer que les interactions génétiques observées entre les sous-unités de SET1/SET-2 et Condensine II sont révélatrices d'une fonction de H3K4me3, on pourrait encore tester le mutant *wdr-5.1* qui présente une diminution de la marque H3K4me3 et me2. Les résultats préliminaires que j'ai obtenus avec des mutants d'autres lysines méthyltransférases ou déméthylases ne montrent pas d'aggravation des lignées germinales en absence de H3K9me2/3 (mutant *met-2; set-25*) ou lorsque la marque H3K4me3 augmente (mutants *spr-5* et *rbr-2*) (Figure 37). Par ailleurs, les mutants de l'histone méthyltransférase de H3K36 *met-1(n4337 et tm1738)* n'ont pas d'effet. Il est possible que cette absence d'effet provienne de la présence de MES-4. En effet, MES-4 agit également dans la lignée germinale pour catalyser la marque H3K36me3.

1.4 *set-2* interagit génétiquement avec *top-2*

La topoisomérase II est impliquée dans divers processus biologiques et permet la résolution des chromatides sœurs en mitose grâce à son activité de passage de brins. Elle permet également la compaction axiale des chromosomes en mitose (Ladouceur et al., 2017; Samejima et al., 2012). Des expériences de reconstitution de chromosome *in vitro* ont montré que Condensine et la topoisomérase II sont des constituants structuraux nécessaires et suffisant à la reconstitution de chromatine mitotique (Shintomi et al., 2015). Le mécanisme par lequel la Topoisomérase II permet la compaction axial reste peu connu. Un modèle possible est que la Topoisomérase II introduit un

enchevêtrement dans une même molécule d'ADN : « self-entanglements », ce qui permettrait la compaction axiale des chromosomes (Bauer et al., 2012; Kawamura et al., 2010). Chez *C. elegans*, le mutant thermosensible *top-2(it7)* ou la déplétion par ARNi de *top-2* sont associés à des défauts de prolifération, de condensation et de ségrégation des chromosomes mitotiques dans la lignée germinale et dans l'embryon, avec des phénotypes plus ou moins sévères (Figure 38) (Bembenek et al., 2010, 2013; Jaramillo-Lambert et al., 2016). Le mutant *top-2(it7)* est également associé à des défauts de la méiose mâle (Jaramillo-Lambert et al., 2016). J'ai également observé des ovocytes et des noyaux en pachytène tétraploïdes (ou polyploïdes), un phénotype qui n'avait pas été décrit dans les études précédentes sur cet allèle ou la déplétion de *top-2*. Des défauts de ségrégation des chromosomes en mitose pourraient être à l'origine de la tétraploïdie de ces noyaux. Ce phénotype rappelle les observations faites précédemment en méiose mâle, au cours de laquelle, l'inactivation de *top-2* à une température restrictive engendre la formation de sperme anucléé suite à la formation de ponts chromatiniens en anaphase I qui piègent les chromosomes dans le corps résiduel formé en méiose II (Jaramillo-Lambert et al., 2016). Un modèle pour expliquer cette tétraploïdie serait qu'une première division mitotique engendre une cellule binucléée via le déclenchement du « spindle assembly checkpoint » (qui arrête la cytokinèse en présence de chromatine entre les deux cellules filles) (Nelson et al., 2015). Ces cellules binucléées donnent des cellules filles tétraploïdes après une seconde mitose (Shi and King, 2005). Dans les cellules de mammifères, l'inactivation de la topoisomérase II augmente le nombre de cellules binucléées (Tanabe et al., 1991). Pour mieux caractériser les défauts de mitose du mutant *top-2* dans la lignée germinale, il faudra observer les divisions cellulaires avec des marqueurs de l'ADN, de l'enveloppe nucléaire ou de l'enveloppe cellulaire. Il existe des transgènes exprimant des composants de l'enveloppe nucléaire ou cellulaire fusionnés à une protéine fluorescente, qui permettrait d'observer en temps réel la division mitotique dans les embryons. Dans l'idéal, il faudrait observer ces divisions mitotiques dans la lignée germinale. Toutefois, des difficultés techniques ne permettent pas l'observation de mitose dans la lignée germinale en temps réel ou sur échantillon fixé.

Mes résultats montrent un plus grand pourcentage de lignées germinales atrophiées dans le double mutant *set-2;top-2* par rapport au mutant simple *top-2* (Figure 38 B). Cependant, j'observe moins d'ovocytes tétraploïdes que dans le simple mutant (Figure 38 C et D). Une explication possible est que les défauts plus importants dans les lignées germinales du double mutant masquent la présence d'ovocytes tétraploïdes, car les lignées germinales atrophiées, très présentes dans le double mutant par rapport aux simples mutants, ne produisent pas d'ovocyte. Alternativement, *set-*

2 pourrait avoir un effet suppresseur dans l'apparition de cellules tétraploïdes en intervenant par exemple dans le point de contrôle du « spindle assembly ». Il a d'ailleurs été montré chez la levure *S. cerevisiae* que *set1* (l'orthologue de *set-2*) est impliqué dans ce point de contrôle (Beilharz et al., 2017). Pour le vérifier il faudrait, dans l'idéal, observer la progression des divisions mitotiques dans la lignée germinale des doubles mutants.

1.5 *set-2* et *cfp-1* participent à la compaction des chromosomes en pachytène

Les résultats de FLIM-FRET obtenus pour les mutants *set-2* et *cfp-1* montrent une efficacité de FRET moins importante que chez des animaux sauvages ce qui reflète potentiellement une chromatine moins compacte dans ces mutants (Figure 39 et Figure 61). Les analyses en catégories d'efficacité de FRET (faible FRET à fort FRET) permettent d'identifier des états de compaction croissants de la chromatine dépendants de la protéine à chromodomaine HPL-2, de l'histone méthyltransférase H3K9 MET-2 et des complexes Condensine I et II (Llères et al., 2017). Condensine I et Condensine II favorisent la présence de régions compactées. En l'absence de régions compactées, Condensine II, mais pas Condensine I, semble aussi nécessaire à la formation de régions très décompactées (Llères et al., 2017). De manière intéressante, l'analyse des catégories d'efficacité de FRET montre qu'en l'absence de SET-2, les régions chromatiniennes compactées ne se forment pas et que la chromatine des noyaux méiotiques est enrichie en régions décompactées (Figure 61). Ce profil est identique à celui observé en l'absence de Condensine I et diffère de celui observé en l'absence de Condensine II (Llères et al., 2017). Sur la base de ces résultats, je propose que SET-2 (et H3K4me) pourrai(en)t jouer un rôle similaire à celui de Condensine I et intervenir dans la structuration des grandes boucles initialement formées par Condensine II. En accord avec cette hypothèse les observations faites dans les cellules en pachytène de souris, montrent que la marque H3K4me3 suit des boucles de chromatine extrudant de l'axe central de la chromatine (Prakash et al., 2015). Des analyses de FLIM-FRET, que j'ai initiées, sont en cours avec le mutant *cfp-1*.

2 CFP-1 joue un rôle au cours de la spermatogenèse

cfp-1 semble être requis pour la spermatogenèse chez l'hermaphrodite. L'absence de spermatozoïdes observés chez ce mutant est plus pénétrante à 25°C qu'à 20°C (Tableau 6 et Figure 41). Ce phénotype n'a pas été observé chez les mutants *sin-3* et *set-2* et semble donc être unique à

cfp-1. La stérilité observée à 20°C peut être sauvée par l'apport de sperme sauvage (Tableau 7), ce n'est pas le cas à 25°C. À cette température restrictive, d'autres défauts doivent être aussi responsables de la stérilité des animaux. J'ai noté que les gonades étaient petites et contenaient peu de noyaux en diakinèse. Pour ces expériences, j'ai utilisé une souche possédant le marqueur phénotypique *dpy-13*. Cette souche présente un fort taux de stérilité : 80 % à 20°C. Les raisons de cette plus forte pénétrance d'absence de spermatozoïde dans ce contexte génétique sont inconnues. La mutation *dpy-13* qui code un composant structural du collagène, n'engendre pas de défauts de fertilité : lors de l'expérience de répartition des crossing-over dans le mutant *set-2*, cette même mutation a été utilisée (Tableau 5). Pour s'affranchir de l'utilisation d'une mutation supplémentaire, il serait possible de réaliser les mêmes expériences en utilisant des mâles porteurs d'un transgène exprimant l'histone H2B fusionné à la mCherry sous le contrôle d'un promoteur *mex-5*. Dans cette souche les spermatozoïdes sont fluorescents, ce qui permet de les suivre après fécondation. Ainsi on pourrait croiser des mâles de ce génotype avec des hermaphrodites mutants *cfp-1*. La descendance provenant du croisement pourrait être criblée par la présence du transgène qui s'exprime dans toute la lignée germinale.

La spermatogenèse est initiée au stade larvaire L4 par une cascade de transduction qui fait intervenir un facteur de transcription *tra-1* et qui permet de changer le programme transcriptionnel vers la production d'ovocyte (Berkseth et al., 2013). Les défauts observés dans le mutant *cfp-1* semble indiquer un rôle dans l'initiation de la spermatogenèse. En effet, par marquage DAPI, les stades intermédiaires de la spermatogenèse (spermatocytes primaires et secondaires) ne sont pas observés. Afin de s'en assurer, il est possible d'utiliser un transgène exprimant la protéine H2B fusionné à la GFP sous le contrôle du promoteur *spe-11* (Merritt et al., 2008). Ce transgène est exprimé au stade larvaire L4 dans les cellules en pachytène tardif juste avant l'entrée dans la spermatogenèse jusqu'au spermatozoïde mature ; chez l'hermaphrodite les pachytènes tardifs ne sont pas marqués. Ainsi ce transgène nous permettrait de savoir si des stades intermédiaires de la spermatogenèse sont produits par les animaux *cfp-1* au stade L4 et si les cellules en pachytène sont spécifiées pour l'entrée en spermatogenèse (marquage GFP). Ceci nous permettrait de nous assurer que les cellules en pachytène n'entrent pas en mitose mâle mais entre plutôt en maturation des ovocytes.

Les analyses transcriptomiques montrent que plusieurs acteurs de la voie de transduction sont dérégulés. Cependant ces expériences ont été réalisées bien après que la spermatogenèse ne soit terminée. Pour identifier quels gènes impliqués dans la voie de décision spermatogenèse/ovogénèse

sont dérégulés en l'absence de *cfp-1*, il faudra réaliser une expérience de transcriptomique au moment de la spermatogenèse (L3-L4).

De manière intéressante, *wdr-5.1* qui fait partie du complexe SET1/MLL a été montré comme nécessaire à l'initiation de l'ovogenèse chez l'hermaphrodite. Cette activité de *wdr-5.1* est indépendante du complexe SET-1/MLL, car des mutants *rbp-5*, *ash-2* et *set-2* ne présentent pas ce défaut (Li and Kelly, 2014). Les animaux mutants *wdr-5.1* ne produisent que des spermatozoïdes à l'âge adulte, ce phénotype est plus pénétrant à 25°C qu'à 20°C. De la même manière, l'activité de *cfp-1* dans la spermatogenèse est thermosensible et semble indépendante de *sin-3* ou *set-2*. Le rôle de *wdr-5.1* dans cette voie est d'amener le facteur transcriptionnel *tra-1* vers les gènes cibles permettant l'ovogenèse et réprimant la spermatogenèse (Li and Kelly, 2014). Est-ce que *cfp-1* pourrait agir d'une façon similaire dans la voie de décision de la spermatogenèse ? On peut supposer que *cfp-1* puisse antagoniser l'action de *wdr-5.1* ou de *tra-1* et favoriser la spermatogenèse. Il serait intéressant d'observer le phénotype des doubles mutants *cfp-1; wdr-5.1* ou *cfp-1; tra-1*.

3 Coopération fonctionnelle entre SET-2, CFP-1 et SIN-3 dans la lignée germinale

L'équipe a mis en évidence une interaction physique inattendue entre CFP-1, une sous-unité du complexe SET1/SET-2 et SIN-3 la sous-unité principale du complexe SIN3/HDAC. Des données de spectrométrie de masse obtenue dans l'équipe montrent que, dans les embryons, CFP-1 fait partie de ces deux complexes. Les rôles respectifs des complexes SET1/SET-2 et SIN3/HDAC dans les embryons et dans la lignée germinale sont maintenant en cours d'analyse. J'ai contribué à ce projet, en réalisant une analyse transcriptomique des lignées germinales de mutants nuls pour *set-2*, *cfp-1* et *sin-3*. Ces expériences montrent que seul un nombre restreint de gènes sont co-régulés par SET-2, CFP-1 et SIN-3 (Figure 43). Ces gènes codent des protéines impliquées dans le vieillissement, le développement embryonnaire, le catabolisme des protéines et le métabolisme des ARN ribosomique (Figure 44). Également, CFP-1 partage plus de cibles en commun avec SET-2 ou SIN-3 que SET-2 et SIN-3 ensemble. Cette observation est en accord avec le fait que CFP-1 agit dans deux complexes différents. Cependant on ne peut pas exclure que ce groupe commun soit régulé à des stades différents de la lignée germinale dans chacun des mutants. Il sera nécessaire de réaliser des expériences de ChIP-seq pour vérifier la co-localisation de ces protéines au niveau de ces gènes. De plus, pour vérifier qu'il existe une interaction entre CFP-1 et SIN-3 dans la lignée

germinale, on pourra envisager d'utiliser la technique de PLA (proximity ligation assay) qui permet de détecter par microscopie deux protéines proches.

Cette analyse transcriptionnelle nous a permis de confirmer que SET-2 et CFP-1 possèdent à la fois un rôle dans la répression et dans l'activation de l'expression des gènes dans la lignée germinale. D'une façon inattendue, contrairement à ce que notre équipe a précédemment observé, je n'ai pas observé l'expression des gènes somatiques dans la lignée germinale du mutant *set-2* (Robert et al., 2014) (Figure 45). Cette différence peut être expliquée par le fait que mes expériences ont été réalisées sur des animaux *set-2* homozygotes pour la mutation depuis seulement deux générations, alors que les analyses transcriptomiques précédentes avaient été réalisées après avoir maintenu les animaux à l'état homozygote pendant plus de 10 générations. L'expression des gènes somatiques pourraient donc être un effet secondaire observables plusieurs générations après la perte de SET-2. En accord avec cette hypothèse, j'ai montré que les animaux homozygotes maintenus à 20°C pendant plusieurs générations accumulaient des « défauts » dont la nature moléculaire reste à identifier. Ces « défauts » s'expriment phénotypiquement lorsque les animaux sont placés à 25°C. Ainsi, un mutant nul de *set-2* maintenu à l'état homozygote à 20°C devient plus rapidement stérile à 25°C que les animaux homozygotes dérivés d'animaux maintenus à l'état hétérozygote (Herbette et al., 2017). Une observation similaire a été réalisée pour le mutant *spr-5* (déméthylase de H3K4me2) où une longévité accrue apparaît seulement chez des animaux mutants maintenus à l'état homozygote depuis 10 à 20 générations (Greer et al., 2014). Il est donc possible que la dérégulation des gènes somatiques chez le mutant *set-2* se fasse uniquement en condition de stress (à 25°C) ou après plusieurs générations à l'état homozygote à 20°C.

4 Régulation du chromosome X chez les mutants *set-2*, *cfp-1* et *sin-3*

Dans de nombreuses espèces ou dans certains types cellulaires, le chromosome X est spécifiquement soumis à une régulation transcriptionnelle. Chez l'hermaphrodite de *C. elegans*, le chromosome X est réprimé deux fois dans les cellules somatiques par le complexe DCC (Meyer, 2010). Cette régulation est indépendante de celle qui prend place dans la lignée germinale, où le chromosome X subi une répression globale de son expression (Bender et al., 2006; Gaydos et al., 2012; Reinke et al., 2000; Wang et al., 2009). Cette répression s'effectue dans la partie distale de la lignée germinale comprenant les cellules mitotiques, la zone de transition et les noyaux en

pachytène. Une ré-expression des gènes liés à l’X se fait dans les ovocytes de l’hermaphrodite (Kelly et al., 2002; Reinke et al., 2000, 2004).

Le mutant *set-2* a été identifié comme « enhanceur » du phénotype associé aux gènes *mes*/PRC2 qui sont impliqués dans la répression du chromosome X dans la lignée germinale (Xu and Strome, 2001). Ces expériences indiquent un rôle de *set-2* dans la régulation du chromosome X dans la lignée germinale. Par ailleurs, des analyses transcriptomiques réalisées dans les lignées germinales des mutants *set-2* à 20°C et 25°C, montrent une surexpression des gènes liés à l’X (Robert et al., 2014, 2019). Dans mes expériences, je n’ai pas observé de biais autosomes/chromosome X dans la distribution des gènes dérégulés dans les lignées germinales des mutants *set-2* (Figure 42 et 46). Les gènes sur- et sous-exprimés sont répartis de manière homogène le long des chromosomes avec un nombre identique de gènes sous- et sur- exprimés (Figure 46). Comme expliqué précédemment, il est possible que la dérégulation du chromosome X chez *set-2* se fasse en condition de stress ou après plusieurs générations successives.

J’ai observé une dérégulation du chromosome X dans la partie distale de la lignée germinale des mutants *cfp-1* et *sin-3* (Figure 42 et 46). Les gènes sur-exprimés chez ces deux mutants sont préférentiellement localisés sur le chromosome X (enrichissement significatif par un test hypergéométrique ($p= 6.21e-3$ pour *cfp-1*, $p=1.11e-113$ pour *sin-3*)). Les gènes surexprimés chez le mutant *sin-3* sont enrichis en gènes exprimés dans l’ovocyte dont la moitié sont liés à X (Figure 45). La dérégulation de cette même catégorie de gènes a été observée chez les mutants *nos-1/2*, impliqués dans la répression du chromosome X dans les cellules primordiales de la lignée germinale (Lee et al., 2017).

J’observe également des gènes sous-exprimés sur le chromosome X, plus particulièrement pour les mutants *set-2* et *cfp-1*, cette observation peut s’expliquer par le fait que 15 % du chromosome X est exprimé dans la lignée germinale malgré une répression globale (Tabuchi et al., 2011). Il est possible que *cfp-1* et *set-2* protègent l’expression de certains gènes sur le chromosome X. Concernant les gènes sous-exprimés retrouvés sur le chromosome X chez *sin-3*, la moitié proviennent de l’extrémité gauche du chromosome X dont les profils d’association des marques épigénétiques et de MES-4 ressemblent à ceux d’un autosome (Gaydos et al., 2012).

4.1 Phénotypes de *sin-3* et régulation du chromosome X

Un des phénotypes observés chez les mutants impliqués dans la répression du chromosome X est leur stérilité à effet maternel (Capowski et al., 1991; Takasaki et al., 2007). Ce phénotype pour les gènes *mes* résulte de la mort des cellules de la lignée germinale et d'une absence de prolifération (Garvin et al., 1998; Paulsen et al., 1995). Des mutations dans *mrg-1*, une sous-unité du complexe SIN3/HDAC qui a aussi d'autres fonctions indépendantes dans la lignée germinale, présentent également une mort des cellules de la lignée germinale (Takasaki et al., 2007). À l'inverse, les mutants *cfp-1* et *sin-3* ne présentent pas de stérilité à effet maternel. On observe pourtant une taille réduite des lignées germinales chez le mutant *sin-3* (Figure 41 et Figure 48). À première vue pour le mutant *cfp-1* la taille des gonades semble normale (Figure 41), mais une quantification précise permettrait de savoir s'il existe des défauts dans ce mutant. L'effet maternel des gènes *mes* et *mrg-1* indique que la transmission des protéines MES ou MRG-1 à l'embryon est nécessaire et suffisante pour permettre le développement en adulte fertile. Or les résultats obtenus par l'équipe avec un allèle CRISPR *sin-3* étiqueté mCherry, montre que SIN-3 n'est pas présente dans les étapes d'embryogenèse précoce et apparaît plus tard dans le développement. Ceci semble indiquer que *sin-3* n'est pas apportée maternellement dans l'embryon. Ces observations pourraient expliquer le fait que *sin-3* n'a pas d'effet maternel. Il est possible que *sin-3* soit nécessaire à la répression du chromosome X dans les étapes plus tardives de l'embryogenèse mais ne soit pas requis pour l'établissement de cette répression comme les protéines *mes* ou *mrg-1*. Toutefois, Il est possible que SIN-3 soit maternellement apportée sous forme de transcrit dans l'embryon et pas sous forme protéique, comme observé pour le facteur *oef-1* (McManus and Reinke, 2018). Alternativement il est possible que la protéine SIN-3 soit apportée maternellement mais dans une quantité faible sous la limite de détection. À l'inverse, L'allèle CRISPR *cfp-1* étiqueté GFP montre que CFP-1 est présente dans l'embryon précoce mais n'est pas localisé sur la chromatine.

Sur la base de ces résultats, plusieurs questions sont à explorer afin de comprendre les mécanismes d'action de ces protéines dans la répression du chromosome X.

4.2 Comment SIN-3 et CFP-1 agissent sur la répression du chromosome X ?

Les gènes liés à l'X et surexprimés dans les mutants *sin-3* et *cfp-1* sont en partie dérégulés dans les mutants *mes* (Figure 47). SIN-3, CFP-1 et les protéines MES régulent donc des cibles

communes sur le chromosome X et pourraient agir ensemble ou dans des voies séparées pour la répression de ces cibles. En effet, les protéines CFP-1 et SIN-3 pourraient réguler l'expression du chromosome X directement en agissant dans des complexes de modification des marques d'histones, ou en intervenant sur la localisation d'autres régulateurs sur les autosomes ou le chromosome X. Alternativement, SIN-3 et CFP-1 pourraient avoir un rôle indirect, et réguler l'expression des gènes impliqués dans la répression du chromosome X. Mes analyses montrent que les gènes *mes-4*, *mes-2* et *mes-6* sont faiblement sous-exprimés dans les lignées germinales du mutant *sin-3*, et que le gène *mes-3* est faiblement surexprimé. Pour conclure sur la signification fonctionnelle de ces dérégulations, il faudra réaliser une étude de la distribution des protéines MES dans la lignée germinale du mutant *sin-3*. Dans les lignées germinales de *cfp-1*, *mes-4*, *mes-3* et *mes-6* sont également sous-exprimés. Par ailleurs, le gène *lin-15b* dont le locus est situé sur le chromosome X, est surexprimé chez les 3 mutants. LIN-15B s'oppose à l'activité des MES dans les cellules germinales primordiales (Lee et al., 2017). De la même manière, le gène lié à l'X, *utx-1* qui code la déméthylase de H3K27me3 est surexprimé dans les 3 mutants (Vandamme et al., 2012). Ces observations soulèvent la possibilité que l'expression ectopique de ces gènes pourrait interférer avec la répression médiée par le système MES. Des expériences de génétique nous permettront de savoir si *sin-3* et *cfp-1* interviennent dans la répression du chromosome X dans la même voie que les gènes *mes* ou dans des voies parallèles. Pour cela, nous observerons le phénotype de stérilité des mutants *mes* en combinaison avec les mutations dans les gènes *cfp-1* et *sin-3*. En effet, on s'attend à observer une stérilité dès la première génération si ces gènes agissent dans des voies parallèles (Xu and Strome, 2001).

De manière intéressante, le double mutant *cfp-1; sin-3* est stérile. Cette stérilité pourrait provenir d'une plus grande dérégulation du chromosome X dans ce mutant par rapport au simple mutant. Il serait intéressant d'observer les lignées germinales de ce double mutant pour savoir si celles-ci présentent des phénotypes similaires aux lignées germinales des animaux *mes* stériles.

4.3 Études de la localisation de CFP-1 et SIN-3 dans la lignée germinale : effet direct ou indirect sur le chromosome X ?

Les protéines impliquées dans la régulation du chromosome X présentent une localisation différentielle entre les autosomes et le chromosome X dans la lignée germinale ou dans les embryons précoces. Ainsi, les protéines MES-4, MRG-1 qui réprime le chromosome X ou les composants du complexe DRM qui protège l'expression du chromosome X (LIN-9/35/37/52/54 et

DPL-1) sont tous localisés sur les autosomes et sont absents du chromosome X (Bender et al., 2006; Tabuchi et al., 2011; Takasaki et al., 2007). La localisation de MES-3, MES-2 et MES-6 du complexe PRC2 n'est pas connue. Cependant on peut émettre l'hypothèse que la localisation de MES-2/3/6 suit celle de la marque qu'elle catalyse (H3K27me3) qui est présente sur tous les chromosomes avec un enrichissement sur le chromosome X (Bender et al., 2004). J'ai émis l'hypothèse que SIN-3 ou CFP-1 pouvaient également présenter une localisation différente sur le chromosome X ou les autosomes dans la lignée germinale, cette localisation pourrait suivre celle de MRG-1 sur les autosomes. En effet, MRG-1 interagit physiquement avec SIN-3 dans l'embryon et dans les adultes ((Beurton et al., 2018; Hajduskova et al., 2019) et données non publiées de Matthieu Caron (Equipe Palladino)). Alternativement, le chromosome X est hypoacétylé dans les noyaux en pachytène, les protéines responsables de cette hypoacétylation ne sont pas connues. SIN-3 appartient à un complexe HDAC, il est donc envisageable que SIN-3 puisse être enrichie sur le chromosome X et puisse participer à la déacétylation des marques d'histones. L'expérience d'immunofluorescence de SIN-3 dans les lignées germinales d'animaux sauvages n'a pas permis d'évaluer la localisation de la protéine SIN-3 (Figure 48). En effet, le marquage est de faible qualité, sur ces images il semblerait que SIN-3 soit exclue de la chromatine. Cette localisation peut provenir d'un artefact de fixation des gonades en formaldéhyde. En effet, il a été montré que le formaldéhyde induit des artefacts dans la localisation des facteurs de transcription ou des protéines chromatinienne (Lerner et al., 2016).

Pour s'affranchir de ses biais expérimentaux, j'ai aidé à la construction d'un allèle CRISPR *sin-3* étiqueté mCherry. En combinant cet allèle avec un transgène exprimant l'histone H2B fusionné à la GFP, l'équipe a montré par de la microscopie en temps réel que SIN-3 était nucléoplasmique et co-localisé avec la chromatine dans les noyaux en pachytène et en diakinese. Cette étude de localisation n'a pas permis de mettre en évidence un enrichissement ou une exclusion de la protéine SIN-3 sur un chromosome particulier dans la lignée germinale. Il semblerait que SIN-3 soit présente sur tous les chromosomes. La même observation a été réalisée avec un allèle CRISPR *cfp-1* étiqueté GFP et combiné avec l'histone H2B fusionné avec la mCherry. Ces premières observations réfutent mes deux premières hypothèses. Sur la base de ces observations on peut émettre l'hypothèse que SIN-3 jouerait un rôle distinct sur le chromosome X et les autosomes, et son rôle sur le chromosome X serait alors indépendant de MRG-1 qui en est exclue.

La localisation des protéines MRG-1 et MES-4 sont indépendantes l'une de l'autre sur les autosomes (Takasaki et al., 2007). Il serait intéressant de savoir si la localisation des protéines CFP-1 et SIN-3 sont dépendantes de MES-4 et MRG-1. Cela permettrait d'établir des liens de dépendance entre ces protéines impliquées dans la régulation du chromosome X. Décrire par immunofluorescence ou microscopie en temps réelles profils des différentes protéines dans différents fonds mutants permettraient de répondre à ces questions. En particulier, si nous montrons que la localisation de CFP-1 ou SIN-3 dépend des protéines MES, nous pourrions faire l'hypothèse que CFP-1 et SIN-3 sont recrutées sur les chromosomes par les marques catalysées par ces protéines (H3K36me3 et H3K27me3).

Par ailleurs il serait intéressant de décrire, par des expériences de ChIP-seq, la distribution de CFP-1 et SIN-3 le long du génome de la lignée germinale. En comparant ces résultats avec ceux obtenus par RNA-seq, nous pourrions savoir si SIN-3 et CFP-1 agissent directement au loci dont elles contrôlent l'expression. Comme déjà évoqué, la réalisation de ChIP dans la lignée germinale est techniquement difficile. Cependant, l'équipe met en place une technique de tri de noyaux par FACS qui nous permettra de trier spécifiquement des noyaux de lignée germinale. Une alternative au tri de noyaux consiste à utiliser des animaux possédant une mutation thermosensible qui empêche le développement de la lignée germinale à température restrictive. L'utilisation de cette mutation, permet d'obtenir des informations sur la lignée germinale par soustraction avec des animaux possédant une lignée germinale. L'utilisation d'embryons précoces pour l'immunoprécipitation de la chromatine ne me semble pas pertinente dans le cas de SIN-3 et CFP-1. En effet, on observe une ré-acétylation (Samson et al., 2014) ainsi que la ré-apparition de la marque H3K4me3 sur chromosome X dans les ovocytes et les zygotes au stade 1 cellule. Contrairement aux marques H3K36me2/3 et H3K27me2 dont la localisation reste la même tout le long de la lignée germinale et dans les embryons précoces.

4.4 Effet de *cfp-1* et *sin-3* sur les marques d'histone dans la lignée germinale

De nombreuses modifications post-traductionnelles sont localisées de manière différentielle entre le chromosome X et les autosomes dans la lignée germinale (Figure 20). Les marques associées aux régions transcrites du génome telles que l'acétylation des histones, les marques H3K4me2/3 et H3K36me2/3 sont peu présentes du chromosome X. À l'inverse, la marque H3K27me3 associée à la répression de l'expression des gènes est enrichie sur le chromosome X.

Par spectrométrie de masse, nous avons montré que chez les embryons, les protéines CFP-1 et SIN-3 sont associées à différentes protéines modificatrices ou lectrices de la chromatine. Ainsi CFP-1 interagit avec HDA-1, HDA-3 (deux histones déacétylases putatives), SET-2 et SET-26 (une protéine à domaine SET) (Beurton et al., 2018). Cette dernière est capable de lire la marque H3K4me3 grâce à son domaine PHD (Wang et al., 2018). De même, SIN-3 est associée à SET-26, HDA-1 et HDA-3. Il serait intéressant de savoir si le profil des marques qui sont connues pour leur implication dans la régulation du chromosome X est modifié en l'absence de *sin-3* ou *cfp-1*, et si une ou plusieurs marques sont affectées. Il serait intéressant d'observer si le profil des marques H3K27me3 et H3K36me2/3 est modifié en l'absence de *cfp-1* ou de *sin-3*. En plus, il serait intéressant de comparer le profil des marques acétylées chez le sauvage et en l'absence de *sin-3* ou de *cfp-1*. Notamment, la localisation des marques H4K16ac et H3K9ac sur le chromosome X est en cours de test. En effet, ces marques ont un intérêt particulier, car elles sont plus abondantes chez les mutants *hda-1* et *mrg-1* respectivement (Hajduskova et al., 2019; Whetstine et al., 2005). Par ailleurs la localisation et le niveau des marques H4K5ac et H4K8ac ne sont pas modifiés en absence de *mrg-1* (Xu et al., 2012), il serait intéressant de savoir s'il en est de même en l'absence de *cfp-1* ou *sin-3*. Ceci pourrait permettre de savoir s'il existe une spécificité dans les marques qui sont affectées par leur absence.

Conclusion générale

La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me) est une marque universellement conservée et associée avec des promoteurs activement transcrits ou en pause. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle de cette marque dans la transcription, la recombinaison et la réparation de l'ADN. Toutefois, sa fonction dans un contexte développemental est moins caractérisée. Au cours de ma thèse j'ai utilisé la lignée germinale de *C. elegans* comme modèle pour étudier la fonction de la méthylation de H3K4 *in vivo*, dans le contexte d'un organisme entier. J'ai montré que la protéine SET-2, qui appartient à la famille des histones méthyltransférases SET1/MLL et qui, dans la lignée germinale de *C. elegans* est responsable de la méthylation globale de H3K4, est requise pour la stabilité du génome de la lignée germinale. Nous avons montré que cet effet ne semble pas provenir d'un défaut dans la réponse aux dommages de l'ADN ou à l'accumulation de mutations. Mes résultats suggèrent plutôt que la méthylation de H3K4 pourrait jouer un rôle au site du dommage à l'ADN, peut être en influençant l'organisation de la chromatine en amont ou en aval du processus de réparation. Dans la continuité de ces résultats, mes travaux de thèse ont mis en évidence une interaction génétique entre *set-2* et les gènes codant les sous-unités du complexe Condensine II. Ce complexe conservé joue un rôle essentiel dans la structuration des chromosomes. Ces résultats nous réorientent vers un rôle plus global de *set-2* et de la méthylation de H3K4 dans l'organisation de la chromatine. La façon dont les histones et les condensines interagissent pour structurer la chromatine est encore largement débattue. À l'avenir il faudra expliquer les mécanismes moléculaires à la base de l'interaction entre *set-2* et Condensine II dans l'organisation de la chromatine.

Les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse ont également permis de montrer un rôle inattendu de la protéine SIN-3 du complexe d'histone déacétylase SIN3/HDAC et de la protéine CFP-1 appartenant aux complexes SIN3/HDAC et SET1/SET-2 dans la répression du chromosome X dans la lignée germinale de *C. elegans*. La répression du chromosome X est essentielle pour la fertilité de la lignée germinale. Ces résultats ouvrent un nouveau projet de recherche dans le laboratoire et la poursuite de cette étude permettra de clarifier les fonctions de ces protéines dans la lignée germinale, mais aussi permettra de mieux comprendre les mécanismes épigénétiques responsables de la répression du chromosome X dans la lignée germinale.

Partie IV – Annexe

1 Nombre de variants par lignée pour les expériences d'accumulation de mutations

Analyse réalisée à partir des données de Roerink et al. (2014) pour les données des mutants *polh-1* et *msh-6* et de nos données pour le mutant *set-2*.

Tableau 8 | Nombre de variants bruts par lignée pour les données d'accumulation de mutations : *set-2*

Échantillons	Génération	Nb SNPs (/gen)	# Insertions (/gen)	# Délétions (/gen)	#Total (/gen)
<i>set-2(bn129)</i>	30	4806 (160.2)	835 (13.9)	668 (22.3)	6309 (210.3)
<i>set-2(bn129)</i>	30	4995 (166.5)	875 (29.2)	704 (23.5)	6574 (219.1)
<i>set-2(bn129)</i>	30	4990 (166.3)	876 (29.2)	726 (24.2)	6592 (219.7)
<i>set-2/qC1</i>	30	5094 (169.8)	830 (27.7)	701 (23.4)	6625 (220.8)
<i>set-2/qC1</i>	30	4831 (161)	858 (28.6)	656 (21.9)	6345 (211.5)
<i>set-2/qC1</i>	30	4904 (163.5)	859 (28.6)	661 (22)	6424 (214.1)

Tableau 9 | Nombre de variants bruts par lignée pour les données d'accumulation de mutations : *polh-1* et *msh-6*

Échantillons	Génération	# SNPs (/gen)	# Insertions (/gen)	# Délétions (/gen)	#Total (/gen)
<i>wt</i>	60	5148 (85.8)	808 (13.5)	716 (11.9)	6672 (111.2)
<i>wt</i>	60	4699 (78.3)	765 (12.8)	623 (10.4)	6087 (101.5)
<i>polh-1</i>	60	5495 (91.6)	872 (14.5)	769 (12.8)	7139 (119)
<i>polh-1</i>	60	5499 (91.7)	903 (15.1)	802 (13.4)	7204 (120.1)
<i>msh-6</i>	10	7088 (708.8)	1344 (134.4)	1866 (186.6)	10 300 (1030)
<i>msh-6</i>	10	5758 (575.8)	1240 (124)	1754 (175.4)	8755 (875.5)

Tableau 10 | Nombre de variants filtrés avec une qualité supérieure à 10 par lignée pour les données d'accumulation de mutations : *set-2*

Échantillons	Génération	# SNPs (/gen)	# Insertions (/gen)	# Délétions (/gen)	#Total (/gen)
<i>set-2(bn129)</i>	30	247 (8.2)	33 (1.7)	52 (1.1)	332 (11.1)
<i>set-2(bn129)</i>	30	227 (7.6)	38 (2.7)	80 (1.3)	345 (11.5)
<i>set-2(bn129)</i>	30	230 (7.7)	41 (1.8)	53 (1.4)	324 (10.8)
<i>set-2/qC1</i>	30	352 (11.7)	34 (2.1)	62 (1.1)	448 (14.9)
<i>set-2/qC1</i>	30	198 (6.6)	44 (1.7)	52 (1.5)	294 (9.8)
<i>set-2/qC1</i>	30	253 (8.4)	39 (1.7)	52 (1.3)	344 (11.5)

Tableau 11 | Nombre de variants filtrés avec une qualité supérieure à 10 par lignée pour les données d'accumulation de mutations : polh-1 et msh-6

Échantillons	Génération	# SNPs (/gen)	# Insertions (/gen)	# Délétions (/gen)	#Total (/gen)
wt	60	608 (10.1)	54 (1.5)	91 (0.9)	753 (12.6)
wt	60	426 (7.1)	47 (1.3)	77 (0.8)	550 (9.2)
polh-1	60	322 (5.4)	60 (1.6)	96 (1)	478 (8)
polh-1	60	346 (5.8)	67 (1.4)	84 (1.1)	497 (8.3)
msh-6	10	1583 (158.3)	413 (89.9)	899 (41.3)	2895 (289.5)
msh-6	10	678 (67.8)	350 (80.8)	808 (35)	1836 (183.6)

Tableau 12 | Nombre de variants filtrés avec une fréquence supérieure à 80 par lignée pour les données d'accumulation de mutations : set-2

Échantillons	Génération	# SNPs (/gen)	# Insertions (/gen)	# Délétions (/gen)	#Total (/gen)
set-2(bn129)	30	10 (0.3)	12 (0.3)	8 (0.4)	30 (1)
set-2(bn129)	30	18 (0.6)	9 (0.6)	17 (0.3)	44 (1.5)
set-2(bn129)	30	18 (0.6)	13 (0.2)	5 (0.4)	36 (1.2)
set-2/qC1	30	20 (0.7)	10 (0.2)	7 (0.3)	37 (1.2)
set-2/qC1	30	21 (0.7)	14 (0.3)	8 (0.5)	43 (1.4)
set-2/qC1	30	20 (0.7)	9 (0.2)	7 (0.3)	36 (1.2)

Tableau 13 | Nombre de variants filtrés avec une fréquence supérieure à 80 par lignée pour les données d'accumulation de mutation : polh-1 et msh-6

Échantillons	Génération	# SNPs (/gen)	# Insertions (/gen)	# Délétions (/gen)	#Total/ (gen)
wt	60	81 (1.4)	14 (0.6)	34 (0.2)	129 (2.2)
wt	60	49 (0.8)	13 (0.4)	24 (0.2)	86 (1.4)
polh-1	60	69 (1.2)	34 (0.4)	21 (0.6)	124 (2.1)
polh-1	60	58 (1)	38 (0.6)	35 (0.6)	131 (2.2)
msh-6	10	205 (20.5)	297 (79.4)	794 (29.7)	1296 (129.6)
msh-6	10	199 (19.9)	237 (71.6)	716 (23.7)	1152 (115.2)

2 Étude phénotypique du mutant *met-1(n4337)*

2.1 L'arrêt du cycle cellulaire du mutant *met-1(n4337)* est normale après irradiation

L'arrêt du cycle cellulaire des cellules mitotiques est un phénomène qui a lieu après des dommages de l'ADN (Gartner et al., 2000). Cela permet de retarder le cycle cellulaire pour pouvoir réparer les dommages avant la réplication. Chez *C. elegans*, les cellules arrêtées dans leur cycle cellulaire sont visibles au microscope DIC par un élargissement du noyau dans la zone mitotique de la lignée germinale. Pour savoir si le mutant *met-1(n4337)* présente des défauts d'arrêt du cycle cellulaire, j'ai irradié des animaux au stade L4 avec une dose de 60 Gy (Figure 49). J'ai utilisé deux allèles de *met-1* : *met-1(n4337)* (voir caractérisation moléculaire en partie 1.5.2) et une insertion d'un élément transposable Mos1 (insertion dans l'exon 5), noté *met-1(Mos1)*. 8 h après irradiation, les noyaux sont arrêtés dans les 2 mutants *met-1* comme dans le sauvage. 24 h et 48 h après irradiation, la plupart des noyaux ont repris leur cycle cellulaire (taille réduite des noyaux). Je n'ai pas observé de différence notable entre les deux allèles de *met-1* et le sauvage.

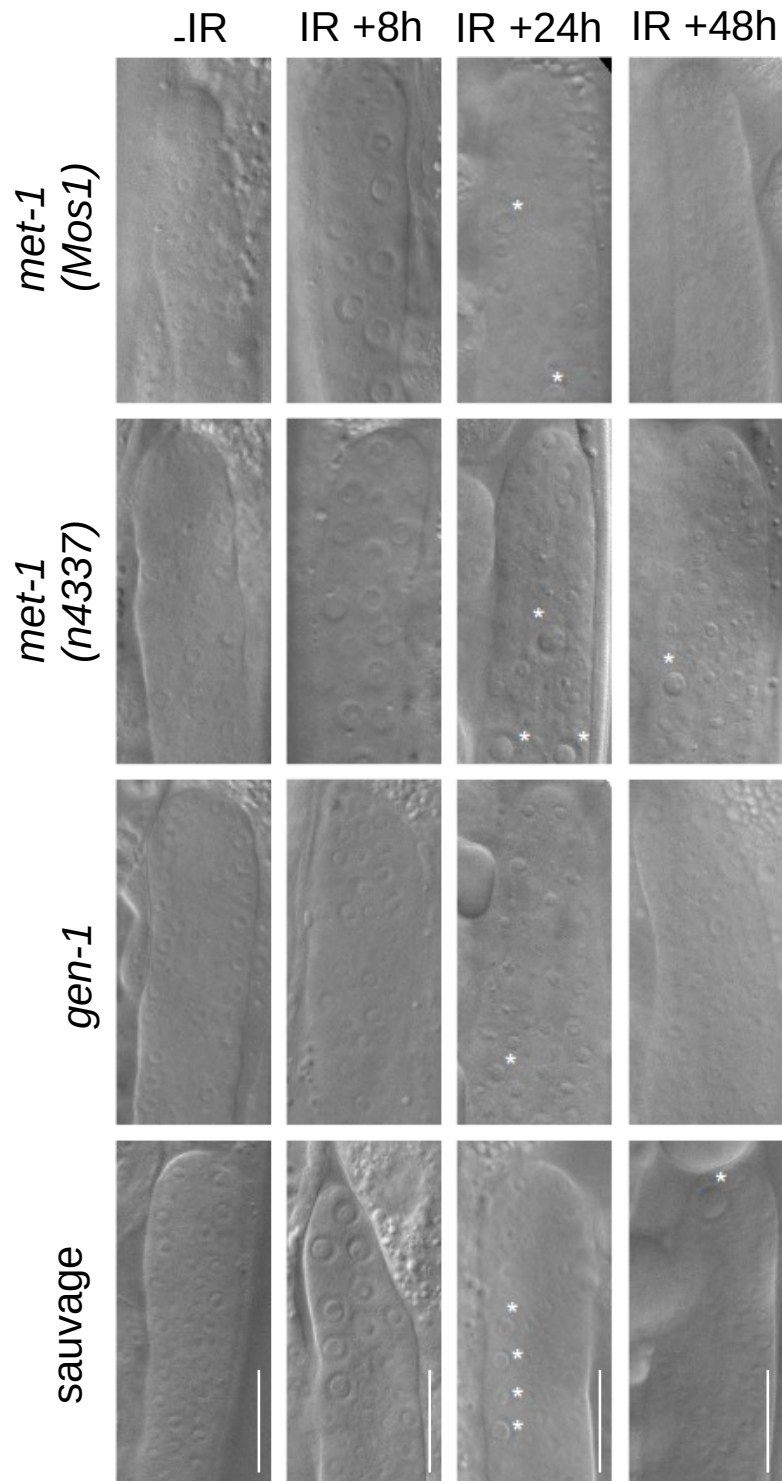


Figure 49| L'arrêt du cycle cellulaire est fonctionnel chez les mutants *met-1*

Images prises au microscope DIC de lignées germinales 8h, 24h ou 48h (IR+8h, IR+24h, IR+48h) après irradiation à 60Gy. Contrôle non irradié : -IR). Le mutant *gen-1* (résolvase) sert de contrôle positif. Les astérisques montrent des noyaux arrêtés 24h et 48h post-irradiations. 8h après irradiation tous les noyaux sont arrêtés sauf dans le mutant *gen-1*. Echelle : 10µm.

2.2 Apoptose après irradiation du mutant *met-1(n4337)*

Les dommages de l'ADN déclenchent également l'apoptose dans les cellules en pachytène via l'activation de CEP-1/P53 (Derry et al., 2001; Schumacher et al., 2001). Pour savoir si la voie de réparation des dommages à l'ADN est fonctionnelle dans le mutant *met-1(n4337)*, j'ai irradié des animaux possédant un transgène *ced-1::GFP* qui marque les cellules apoptotiques (Zhou et al., 2001). 24h après irradiation (60Gy) une augmentation du nombre de cellules apoptotiques est visible chez le sauvage et le mutant *met-1(n4337)*. Le nombre de corps apoptotiques chez le mutant *met-1(n4337)* est identique à celui du sauvage avant et après irradiation (Figure 50 A). 48h après irradiation, le nombre de corps apoptotiques est équivalent entre les conditions irradiées et non irradiées et entre le sauvage et le mutant *met-1(n4337)* (Figure 50 B). Ces résultats confirment que la voie de l'apoptose est bien activée après irradiation.

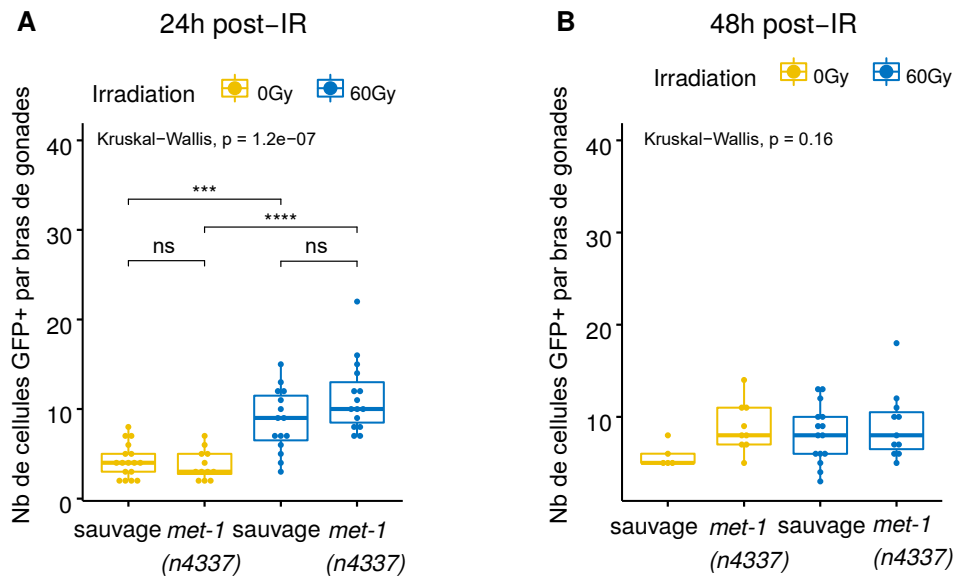


Figure 50| L'apoptose est normale chez le mutant *met-1(n4337)*

Nombre de cellules apoptotiques détectées par le transgène *ced-1::GFP* dans les lignées germinales non-irradiées (0Gy) ou irradiées (60Gy) après 24h ou 48h post traitement. Chaque point représente un animal. Test post-hoc de Wilcoxon (après un test significatif de Kruskal-Wallis) : *** p < 0.001 ; **** p < 0.0001 ; ns : non-significatif

3 Étude de la dérégulation des petits ARN chez les mutants *set-2* et *met-1(tm1738)*

3.1 Les ARN piwi dans la lignée germinale de *C. elegans*

Trois voies interconnectées constituent le système d'ARN interférence de *C. elegans*, elles permettent la régulation d'ARN exogènes et endogènes dans le soma et dans la lignée germinale. L'inactivation des acteurs de cette voie résulte en une stérilité, ou en une perte de la fertilité progressive au cours des générations (Rechavi and Lev, 2017).

La voie des petits ARN protège les cellules de la lignée germinale du « non-soi » tels que les transposons et autres éléments génomiques invasifs, mais régule aussi l'expression de gènes endogènes dans la lignée germinale. Ainsi, cette voie assure l'intégrité génomique des cellules germinales et l'expression correcte des gènes. Les protéines de la famille Argonaute sont des acteurs importants de cette voie. Elles sont porteuses de domaines fonctionnels qui reconnaissent les petits ARN. Ces petits ARN sont produits par deux locus principaux sur le chromosome IV et sont appelés 21U, car ils ont une longueur de 21 nucléotides et une uridine en 5' (Ruby et al., 2006). Ces ARN 21U se lient à PRG-1 (PIWI Related Gene) pour former un complexe nucléoprotéique qui reconnaît les ARNm qui ont une homologie de séquences avec les ARN 21U chargés sur la protéine PRG-1 (Batista et al., 2008; Das et al., 2008; Wang and Reinke, 2008). Les ARN 21U sont capables de tolérer plusieurs mésappariements avec leurs cibles ce qui leur permet, théoriquement, de reconnaître toutes les séquences d'ARNm (Bagijn et al., 2012; Lee et al., 2012). Le pool d'ARN 21U est amplifié grâce à l'intervention d'ARN polymérases ARN-dépendante (RdRP) (Gu et al., 2009). Elles produisent un des ARN secondaires dit « 22G » (car ils ont une longueur de 22 nucléotides et une guanine en 5'). Les ARN 22G se lient à la protéine Argonaute HRDE-1. Le complexe nucléoprotéique ainsi formé entre dans le noyau et se localise au niveau des ARN pré-messagers naissant cible pour l'expression génique (Bagijn et al., 2012; Das et al., 2008; Lee et al., 2012). Cette répression nécessite le recrutement des protéines NRDE-1/2/4 qui inhibent l'élongation des transcrits naissants. La répression du locus cible serait également associée au recrutement de la protéine HP1/HPL-2 et à l'accumulation des marques H3K9me3 (Figure 51) (Ashe et al., 2012; Buckley et al., 2012; Lee et al., 2012; Shirayama et al., 2012). Les histones méthyltransférases SET-32 et SET-25 sont requises pour catalyser le dépôt de cette marque (Figure 52) (Kalinava et al., 2018; Woodhouse et al., 2018). Elles sont également requises pour l'établissement de la répression. Il est aussi proposé que les petits ARN puissent avoir une activité

de répression post-transcriptionnelle par le clivage des ARNm cibles, mais on n'en connaît pas les acteurs.

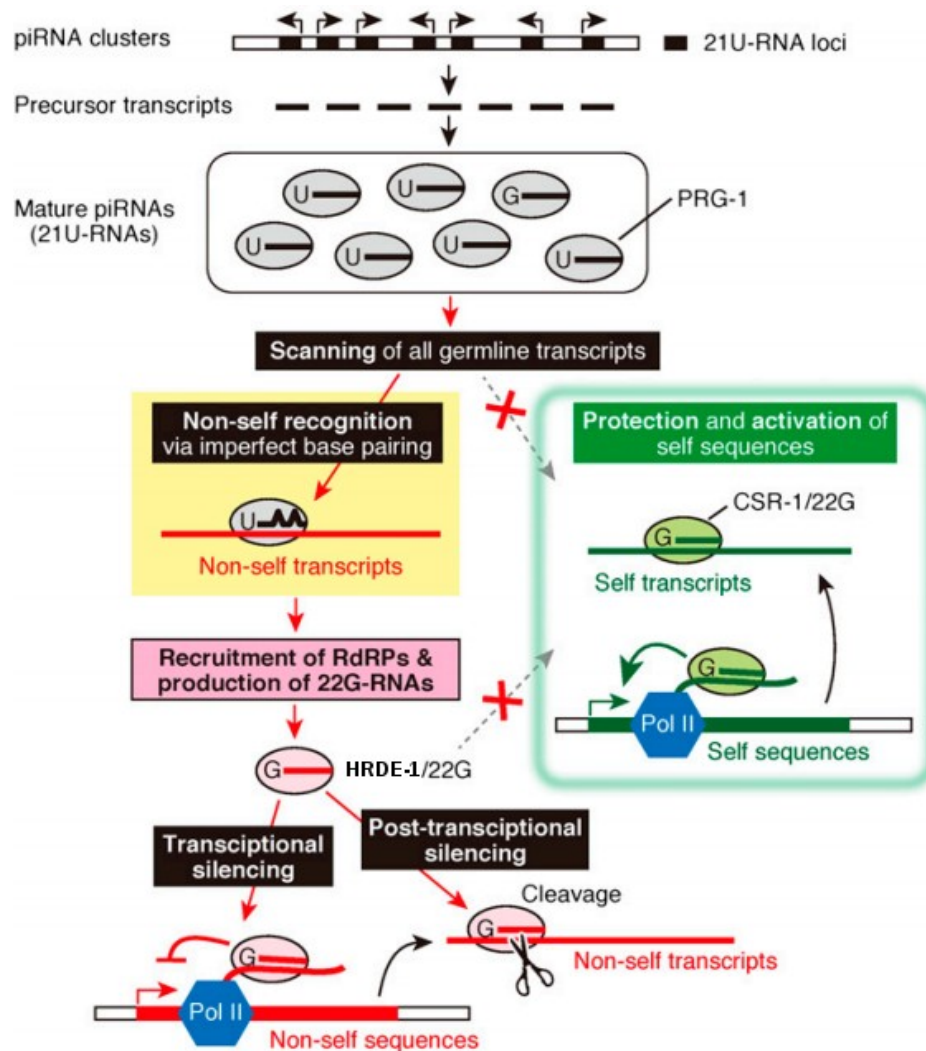


Figure 51| Voie de reconnaissance du soi et du non-soi par les petits ARN

Cluster du chromosome IV produisant des ARN 21U. PRG-1 associée aux ARN 21U scanne tous les transcrits de la lignée germinale. Cette reconnaissance se fait de manière imparfaite avec plusieurs mésappariements entre les séquences du transcrit et de l'ARN 21U. Lorsque le complexe PRG-1/ARN21U reconnaît une cible, les ARN polymérases ARN-dépendantes (RdRPs) sont recrutées et produisent une autre catégorie de petits ARN : les ARN 22G. Ceux-ci s'associent à HRDE-1 et répriment leurs cibles transcriptionnellement et possiblement post-transcriptionnellement via le clivage de l'ARNm. La voie CSR-1 et des ARN 22G marquent les gènes codants des protéines endogènes, les protégeant de la répression et activant leur transcription. Cette reconnaissance se fait par l'appariement parfait entre les séquences du transcrit et de l'ARN 22G associé à CSR-1. Figure tirée de (Izumi and Tomari, 2014)

En parallèle de cette voie de répression, il existe une voie de protection de l'expression de certains gènes endogènes de la cellule. Elle fait intervenir la protéine Argonaute CSR-1, celle-ci

vient s'apparier à des ARN 22G produits à partir des ARNm de gènes codants s'exprimant dans la lignée germinale (Claycomb et al., 2009). La complémentarité parfaite des ARN 22G liés à CSR-1 avec leur cible empêche la répression post-transcriptionnelle par PRG-1 et les 21U qui ont une complémentarité imparfaite avec ces mêmes ARNm (Bagijn et al., 2012; Lee et al., 2012) ; dans le cas d'une complémentarité parfaite avec un ARN 21U lié à PRG-1, c'est la répression qui prime sur la protection par CSR-1 (Shirayama et al., 2012). CSR-1 liée aux ARN 22G se localise également au niveau des ARN pré-messagers cibles dans le noyau. À l'inverse des cibles de HRDE-1, les cibles de CSR-1 sont enrichies en marques d'histone associées à l'euchromatine comme H3K36me2/3, H3K4me1/2/3, H3K9ac, H4K8ac, H4K16ac (Cecere et al., 2014; Claycomb, 2012; Wedeles et al., 2013). Cependant, les marques d'histones et les histones méthyltransférases responsables ne sont pas identifiées (Figure 52).

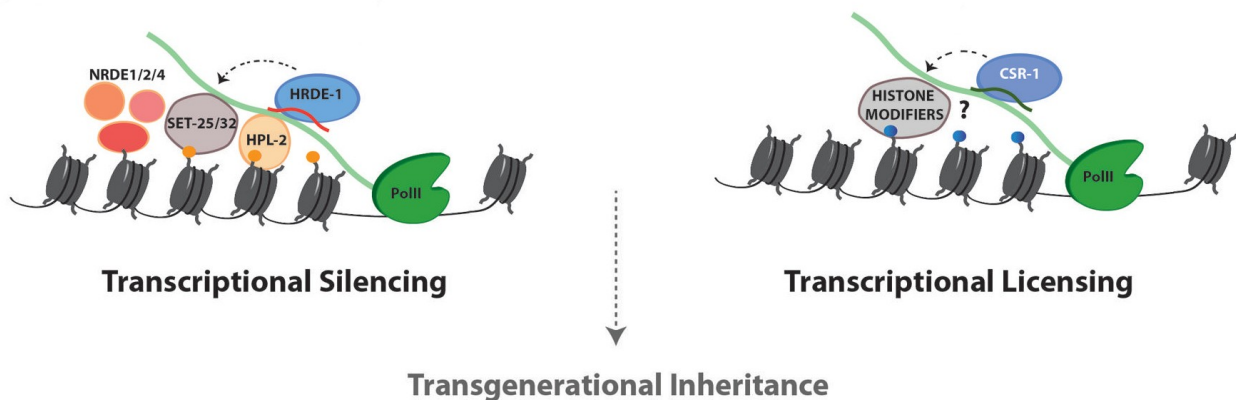


Figure 52| Contrôle de l'expression des gènes par les voies HRDE-1 et CSR-1

La voie PRG-1, aboutie à la translocation de HRDE-1 dans le noyau pour médier la répression transcriptionnelle par l'inhibition de l'élongation des ARNm par la polymérase II et par la déposition de la marque H3K9me3 au locus cible. SET-25/32 permettent la déposition de la marque H3K9me3 ce qui permettrait de recruter HP1/HPL-2. A l'inverse, CSR-1 associée aux ARN 22G s'associe à la chromatine aux locus cibles et maintient l'état euchromatique permissif à la transcription. Ces deux voies semblent mutuellement exclusives. Elles aboutissent à la transmission de l'état transcriptionnel du locus à la génération suivante. Figure tirée de (Claycomb, 2012)

La voie exogène d'ARN interférence, utilise comme substrats des ARN double brin exogènes. Les ARN double brin sont amplifiés en ARN 22G par les ARN polymérases ARN-dépendante. Cette voie est active dans le soma et dans la lignée germinale, et utilise la voie Nrde (NRDE-1/2/3/4) avec NRDE-3 qui joue le rôle de HRDE-1 dans le soma (Ashe et al., 2012; Burkhart et al., 2011; Guang et al., 2010).

Les mutants *met-1(n4337)*, *met-1(tm1738)* et *set-2(bn129)* présentent un phénotype de perte de la fertilité progressive au cours des générations à une température de 25°C. Pour le mutant *set-2*, ce phénotype *mrt* est réversible en une génération en transférant les animaux à une température de 20°C (données récentes non-montrées). Cette réversibilité indique que l'accumulation de mutations n'est pas la cause de ce phénotype à 25°C. De nombreux acteurs de la voie des petits ARN présentent également un phénotype *mrt* qui dépend de la température. Par ailleurs, le mutant *met-1* a été identifié dans un crible génétique visant à trouver des gènes impliqués dans la répression d'éléments répétés dans la lignée germinale (Robert et al., 2005). Cette répression fait notamment intervenir les voies des ARN interférants de *C. elegans*. Le mutant *met-1(n4337)* et la déplétion de *met-1* par ARNi mènent à la dé-répression de ces éléments répétés. Je me suis donc demandée si la voie de régulation des petits ARN était fonctionnelle dans les mutants *set-2* et *met-1*. Pour tester la dérégulation de la voie des petits ARN, j'ai utilisé deux transgènes rapporteurs de la régulation par des ARN 21U ou par des ARN 22G.

3.2 La voie des ARN 21U est dérégulée chez le mutant *met-1(tm1738)* mais pas chez le mutant *set-2(bn129)*

La reconnaissance d'une cible par les ARN 21U constitue la première étape de la répression de cette cible par la voie des petits ARN dans la lignée germinale. Pour tester la fonctionnalité de cette étape, j'ai utilisé un transgène « senseur » contenant l'histone H2B fusionné à la GFP sous le contrôle du promoteur *mex-5* (expression dans la lignée germinale et les embryons précoces) et contenant une séquence cible reconnue par les ARN 21U (Figure 53) (Bagijn et al., 2012). Dans des animaux sauvages, ce transgène est complètement éteint dans la lignée germinale. Un transgène « contrôle » a aussi été utilisé. Il est presque identique au transgène senseur, mais porte une séquence cible des ARN 21U en orientation antisens. Dans le sauvage, ce transgène contrôle est exprimé dans les noyaux de la lignée germinale. À 20°C et à 25°C, je n'observe pas d'expression du transgène senseur dans les mutants *set-2*, celui-ci reste silencieux (Figure 53). Par ailleurs à 25°C, les animaux mutant pour *set-2* et porteur des transgènes (senseur et contrôle) deviennent stériles après seulement deux générations à cette température.

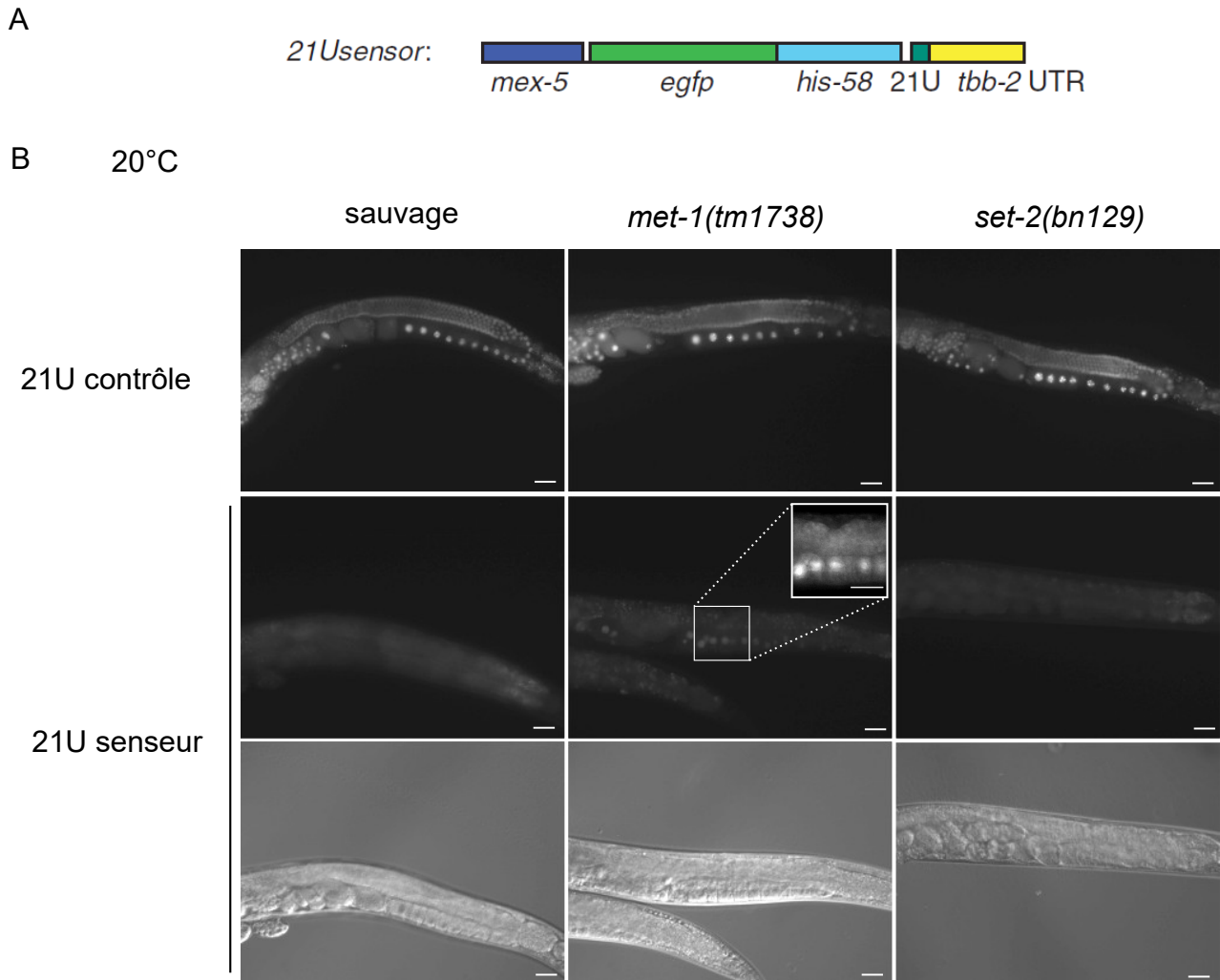


Figure 53| *MET-1* est requis pour la répression du transgène senseur par les ARN 21U

(A) Transgène senseur utilisé (21U sensor). Il exprime la GFP (*egfp*) fusionnée à l'histone H2B (*his-58*) sous le contrôle du promoteur *mex-5* et contient une séquence cible des ARN 21U (21U) et la séquence 3' UTR du gène *tbb-2* (d'après (Luitjens et al., 2000)). (B) Images de microscopie des animaux sauvages ou mutants avec une copie intégrée du transgène contrôle (21U contrôle) ou senseur (21U senseur) à 20°C. Les images au DIC montrent la lignée germinale. L'encart est un zoom sur les ovocytes du mutant *met-1(tm1738)*, le contraste et la luminosité ont été augmentés pour mieux visualiser la présence de la fluorescence. Échelle : 20µm.

À l'inverse, dans le mutant *met-1(tm1738)*, j'observe une faible expression du transgène senseur à 20°C (Figure 3.1), tous les animaux ne ré-expriment pas le transgène (au niveau de la limite de détection du microscope). A 25°C l'expression du transgène est plus forte (Figure 53 A). J'ai observé la ré-expression de ce transgène au cours des générations en plaçant des animaux à 25°C jusqu'à stérilité de la souche (Génération 14). J'ai quantifié le nombre d'animaux ré-exprimant le transgène aux limites de détection du microscope, ainsi que l'intensité de la fluorescence observée. La proportion d'animaux ré-exprimant le transgène senseur augmente au

cours des générations jusqu'à atteindre 100 % à la génération 8 (Figure 53 A, B). Les animaux sauvages ne réexpriment jamais le transgène 21U senseur à 20°C ou à 25°C (données non montrées, environ 20 animaux observés par génération). Chez les animaux *met-1(tm1738)*, l'intensité de la fluorescence augmente également au cours des générations et atteint le niveau de fluorescence du transgène contrôle à la génération 12 et 13 (Figure 53 C). Ces résultats montrent que *met-1* est nécessaire à la répression par les ARN 21U, et est également nécessaire pour le maintien transgénérationnel de cette répression.

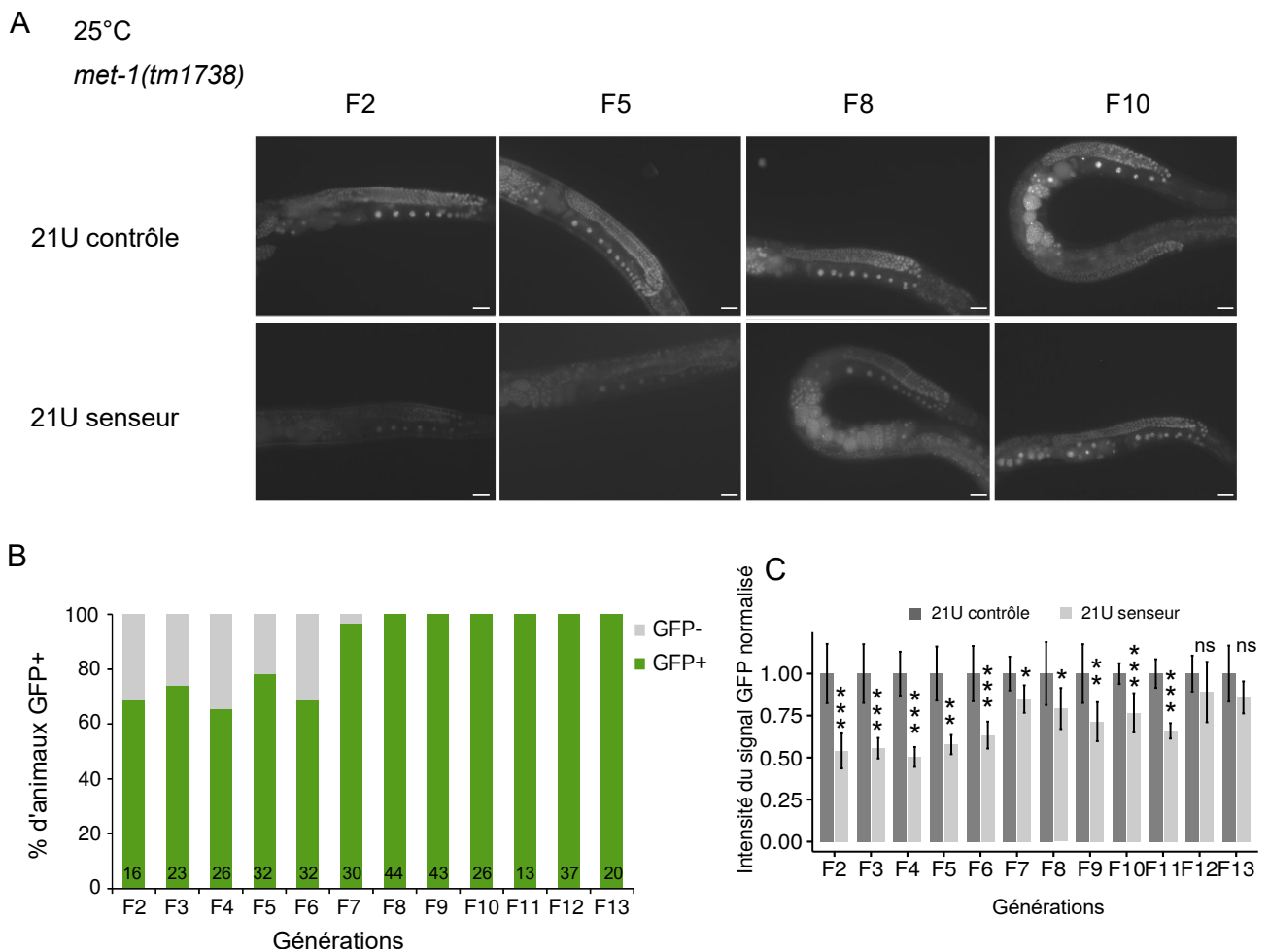


Figure 54| MET-1 est requis pour la répression du transgène senseur par les ARN 21U à 25°C de façon transgénérationnelle

(A) Images de microscopie du mutant *met-1(tm1738)* à différentes générations à 25°C avec une copie intégrée du transgène contrôle (21U contrôle) ou senseur (21U senseur). Échelle : 20µm. (B) Quantification du nombre d'animaux *met-1(tm1738)* réexprimant le transgène 21U senseur au cours des générations (n=nombre d'animaux observés par générations). (C) Quantification de l'intensité de la GFP dans les mutants *met-1(tm1738)* réexprimant le transgène 21U senseur ou le transgène 21U contrôle. Test statistique : t-test avec une correction de Bonferroni : ns = non-significatif, * <0,05 ; ** <0,01 ; ***<0,001.

3.3 La voie des ARN 22G n'est pas dérégulée chez les mutants *met-1(tm1738)* et *set-2(bn129)*

Les ARN 22G, sont issus de l'amplification secondaire après la reconnaissance d'une cible par les ARN 21U. De la même manière, pour savoir si la répression par les ARN 22G est dérégulée en l'absence de *met-1* ou de *set-2*, j'ai utilisé un transgène rapporteur (Montgomery et al., 2012). Le transgène « contrôle » est composé de la GFP exprimée sous le contrôle du promoteur ubiquitaire *ubl-1* (Ubiquitine ligase 1) et contient une séquence cible en antisens des ARN 22G (Figure 54). Le transgène « senseur » est identique, à l'exception de la séquence cible des ARN 22G qui est sens, ce transgène est réprimé. A 20°C je n'observe pas d'expression plus forte de ce transgène dans les animaux *met-1* ou *set-2* comparés aux animaux sauvages. A 25°C, l'expression du transgène senseur fuit et est au niveau d'expression du transgène contrôle pour le sauvage et les mutants. Il semblerait que ni *met-1*, ni *set-2* ne soient impliqués dans la répression par les ARN 22G.

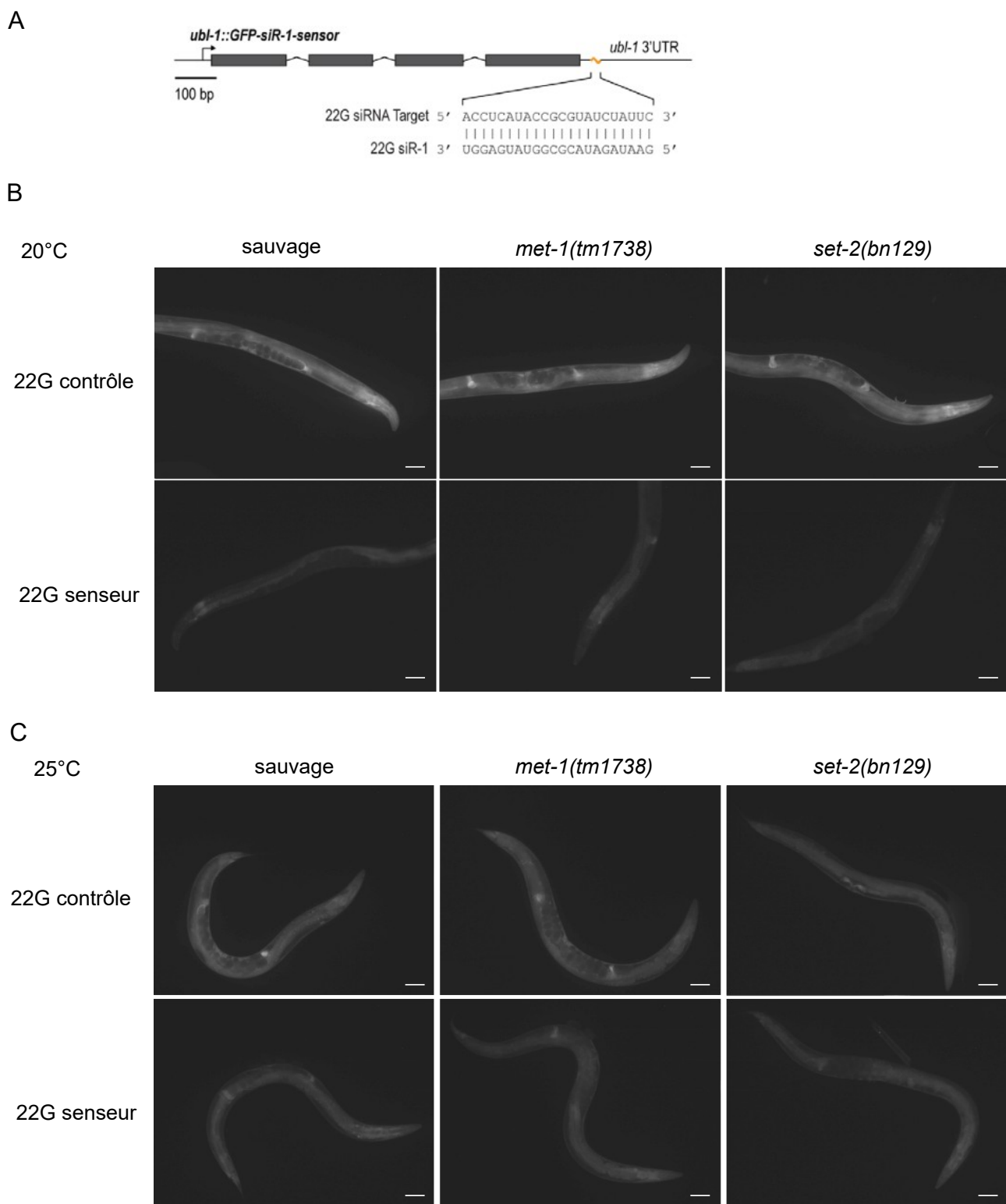


Figure 55| *MET-1* et *SET-2* ne sont pas requises pour la répression du transgène senseur par les ARN 22G

(A) Transgène senseur utilisé (22G sensor) : exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur *ubl-1* et contenant une séquence cible des ARN 22G (22G siRNA target), ainsi que la séquence 3' UTR du gène *ubl-1*, d'après (Montgomery et al., 2012). (B) Images de microscopie des animaux sauvages ou mutants avec une copie intégrée du transgène contrôle (22G contrôle) ou senseur (22G senseur) à 20°C, (C) ou après une génération à 25°C. Échelle : 20µm.

3.4 Conclusion

J'ai observé une dé-répression du transgène rapporteur de la voie des ARN 21U. Cette dé-répression est plus forte au cours des générations avec une plus grande proportion d'individus ré-exprimant le transgène rapporteur (Figure 53). De plus, l'expression de ce transgène semble également augmentée au cours des générations (Figure 54). Ceci indique que MET-1 est requis pour le maintien transgénérationnel de la répression. À l'inverse, Je n'observe pas de dérégulation du transgène rapporteur de la voie des ARN 22G à 20°C ou à 25°C. Confirmant ces résultats de l'implication de *met-1* dans la régulation des petits ARN, une étude récente montre une interaction génétique entre *morc-1* et *met-1* (Weiser et al., 2017). MORC-1, impliquée dans la voie des petits ARN, permet le maintien transgénérationnel de la marque H3K9me3 aux sites cibles des ARN interférants et limite l'activité de MET-1 et l'intrusion de la méthylation H3K36 au niveau de ces mêmes sites. Il a aussi été montré que la marque H3K36 est présente au niveau des loci cibles de la voie de protection CSR-1 (Gushchanskaia et al., 2018). Il est possible que MET-1 agisse dans la voie CSR-1, cependant, cela n'explique pas la dé-répression du transgène rapporteur. Les résultats semblent indiquer que MET-1 est requis pour l'initiation de la répression via la production de 21U, mais n'est pas requis pour l'amplification secondaire des ARN 22G. MET-1 pourrait contrôler l'expression des 21U, ceux-ci sont présents en cluster sur le chromosome IV et sont organisés en domaines enrichis en H3K27me3 et séparés par des domaines riches en H3K36me3 (Beltran et al., 2019). La marque H3K36me3 pourrait être nécessaire à leur expression. Afin de poursuivre ce travail, il serait intéressant de réaliser une analyse en RNA-seq afin d'identifier quelle catégorie de petits ARN est dérégulée en l'absence de MET-1.

J'ai également testé le rôle de *set-2* dans la voie des ARN 21U et 22G. Les résultats que j'ai obtenus ne montrent pas de dérégulation de la répression par les petits ARN. Des résultats récents obtenus par l'équipe, montrent qu'au contraire, en l'absence de SET-2 la ré-expression de transgènes éteints transitoirement par ARNi prend plus de générations que dans le sauvage (Loïc Gely, communication personnelle). Dans ces conditions, on ne s'attend pas à voir un défaut de répression des transgènes rapporteurs des voies de petits ARN. Ces résultats indiqueraient un rôle de H3K4me dans la mémoire transcriptionnelle et dans la ré-expression d'un locus éteint.

4 Description des allèles *set-2(bn129)*, *set-2(ok952)*, *cfp-1(tm6369)* et *sin-3(tm1276)*

- *set-2(bn129)* (Figure 56 A)

L'allèle *set-2(bn129)* a été décrit précédemment (Xiao et al., 2011). *set-2* possède deux isoformes *set-2 s* et *set-2 l*. *bn129* est une délétion de 748 paires de bases dans l'exon 11 du gène. Il est prédit que *bn129* produit une protéine SET-2 tronquée de 891 acides aminés ne possédant pas les domaines catalytiques SET et Post-SET. En revanche, le domaine de reconnaissance à l'ARN (RRM) est conservé. Cette prédiction a été validée par les expériences de RNA-seq que j'ai réalisées.

- *set-2(ok952)* (Figure 56 A)

L'allèle *set-2(ok952)* a été décrit précédemment (Xiao et al., 2011). Cet allèle est une délétion de 1269 paires de bases qui affecte les 2 isoformes du gène. Il est prédit que *ok952* produit une protéine SET-2 tronquée de 1299 acides aminés qui contient encore les domaines catalytiques RRM, SET et Post-SET.

- *cfp-1(tm6369)* (Figure 56 B)

L'allèle *cfp-1(tm6369)* est une délétion de 254 paires de bases couvrant l'intron 4, l'exon 5 et l'intron 5. Il est prédit que *tm6369* produit une protéine CFP-1 tronquée de 374 acides aminés dont le domaine conservé « C-rich » est tronqué. Ce gène est prédit pour avoir au moins 4 isoformes (*cfp-1a* à *d*). Elles sont toutes affectées par la délétion *tm6369*.

- *sin-3(tm1276)* (Figure 56 C)

L'allèle *sin-3(tm1276)* a été caractérisé précédemment (Choy et al., 2007). Cet allèle est une délétion de 315 paires de bases couvrant l'exon 2. Cet allèle est prédit comme produisant une protéine SIN-3 tronquée de 233 acides aminés, dépourvue de tous domaines conservés : PAH (Paired amphithic helix superfamily) et HID (Histone deacetylase Interacting Domain) et Sin3-Cter. Les résultats de RNAseq réalisés dans la lignée germinale ou dans les embryons ne sont pas en accord avec cette prédiction. Il semblerait qu'un transcrit alternatif soit présent. Celui-ci commencerait à partir de l'exon 8 et qui contiendrait alors les domaines HID et Sin3 C-ter.

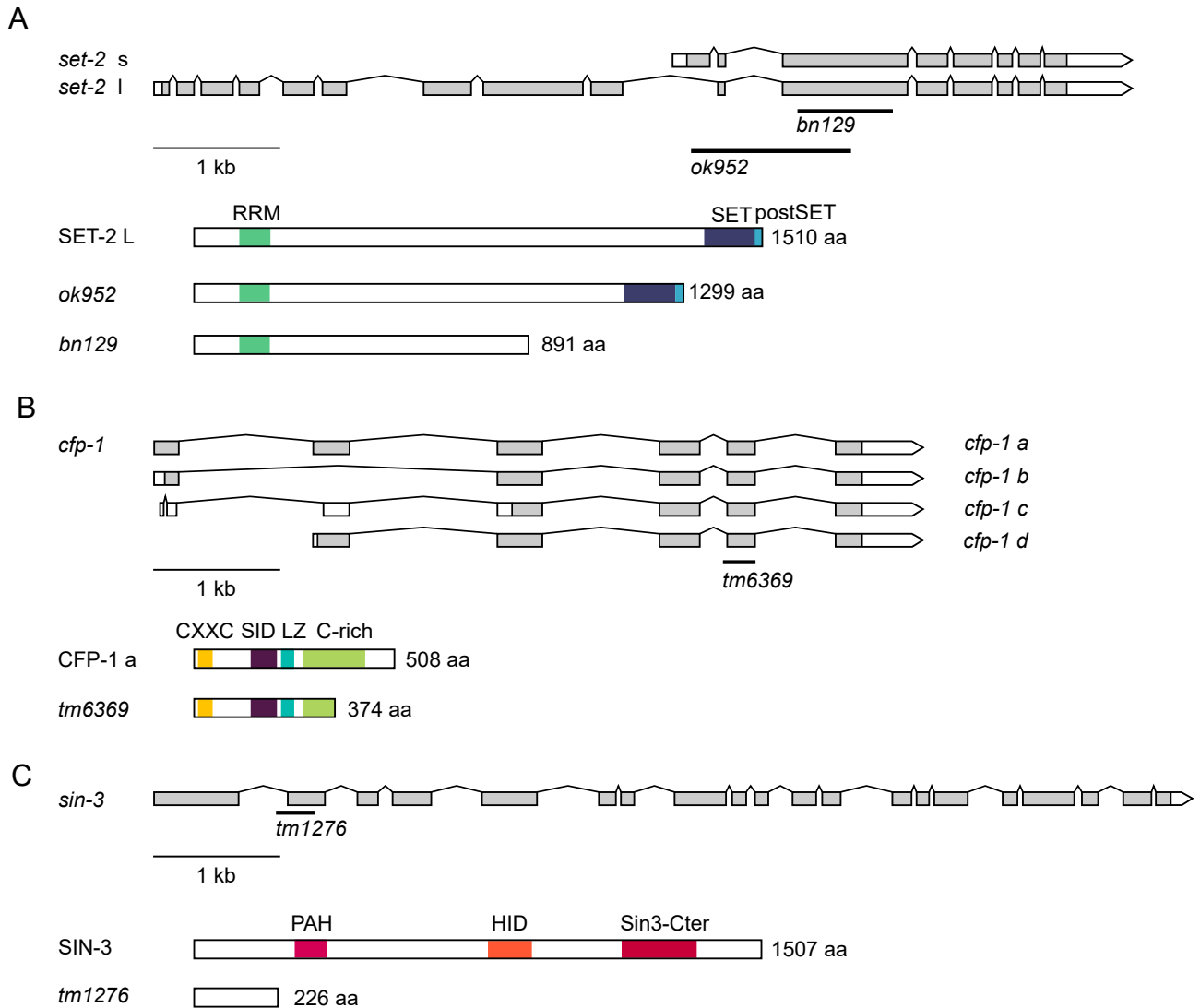


Figure 56| Représentation des gènes et protéines de *set-2*, *cfp-1* et *sin-3* et des mutations utilisées dans cette étude

La représentation de chaque gènes (et isoformes) (haut) et protéines (bas). (A) Représentation des deux isoformes de *set-2* : *set-2 s* et *set-2 l* et position des délétions *ok952* et *bn129*. Représentation de la protéine SET-2 L sauvage et mutantes et des domaines fonctionnels (RRM : RNA Recognition Motif, SET, post-SET). (B) Représentation des isoformes de *cfp-1* (de a à d) et de la position de la délétion *tm6369*. Représentation de la protéine CFP-1 sauvage et mutante et des domaines fonctionnels (CXXC, SID : SET1 Interacting Domain, LZ : Leucine zipper, C-rich : riche en cystéine). (C) Représentation du gène *sin-3* et position de la délétion *tm1276*. Représentation de la protéine SIN-3 sauvage et mutante et des domaines fonctionnels (PAH : Paired amphithic helix superfamily, HID: Histone deacetylase Interacting Domain, Sin3-Cter).

5 Sauvetage de la stérilité de *cfp-1 dpy-13* par croisement avec des mâles sauvages

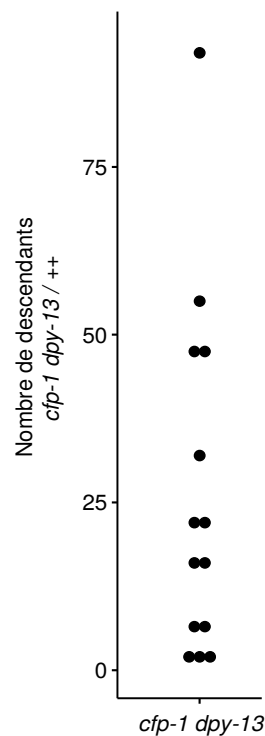


Figure 57| Nombre de descendants issus du croisement d’hermaphrodites *cfp-1 dpy-13* avec des mâles sauvages

6 Résultats de séquençage de l’allèle *hcp-6(mr17)*

La mutation *mr17* est une mutation ponctuelle dans le gène *hcp-6* décrit comme modifiant une Guanine en Adénine dans l’exon 8 (position 3413). Au niveau protéique, il est prédit qu’une glycine est changée en acide glutamique à la position 1024 de la protéine (Figure 58 A) (Stear and Roth, 2002). Pour vérifier ces informations, j’ai séquencé le site supposé de la mutation *mr17* chez la souche sauvage de référence (N2) et la souche porteuse de la mutation (AR1). Je n’ai pas observé la mutation attendue dans la souche mutante (Figure 58 B). J’ai donc séquencé l’intégralité du gène *hcp-6*, pour confirmer la présence d’une mutation. Celle-ci se trouve dans l’exon 5 (position 2252), et modifie une guanine en adénine, ce qui modifie une glycine en acide glutamique en position 683 de la séquence protéique. Cette mutation se trouve dans le domaine conservé à répétition Armadillo (ARM) ou HEAT (la nature de ces domaines est proche évolutivement et structurellement (Gul et

al., 2017). De manière intéressante ce domaine est retrouvé muté dans des cribles génétiques réalisés pour identifier des mutants thermosensibles chez *S. pombe* (Xu et al., 2015). Ce domaine est essentiel pour le maintien de l'haploïdie chez la levure à fission et interagit avec l'ADN (Kschonsak and Haering, 2015).

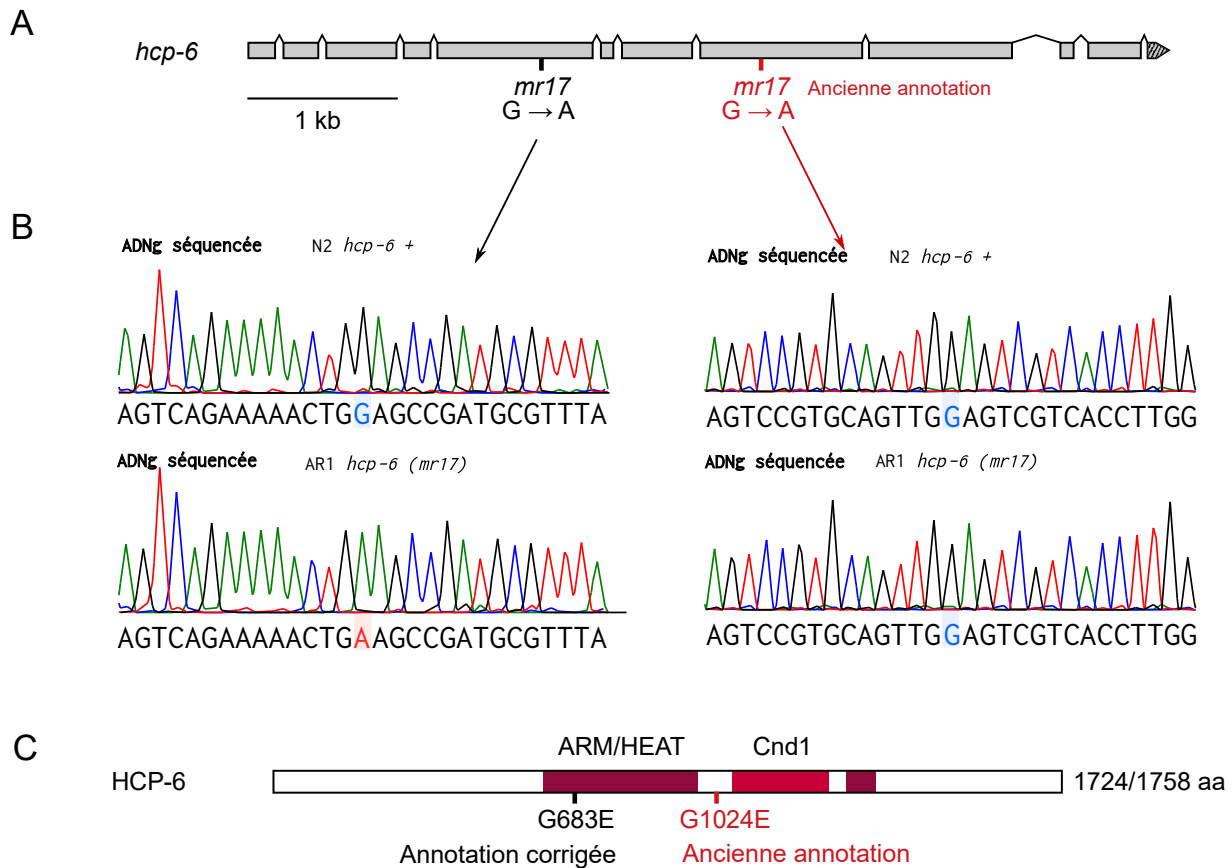


Figure 58| Reséquencage de la mutation *mr17* du gène *hcp-6*

(A) Représentation schématique du gène *hcp-6* et de la position de la mutation *mr-17* (ancienne annotation d'après Wormbase) en rouge, et la position de la mutation après reséquencage (en noir). Le changement de base est indiqué. (B) Résultats de séquençage de l'ADN génomique de la souche sauvage (N2), ou mutante *hcp-6(mr17)* (souche AR1), à droite au site de l'ancienne annotation de la mutation (en bleu est représentée la base sur laquelle doit se porter la mutation *mr17* selon l'annotation de Wormbase), et à gauche au site de la mutation (en bleu est représentée la base sauvage et en rouge la base mutée dans la souche AR1). (C) Représentation schématique de la protéine HCP-6 et des domaines conservés (ARM/HEAT et Cnd1), la position et le changement d'acide aminé de la mutation *mr17* sont représentés (en rouge : ancienne annotation, en noir : annotation corrigée).

7 Niveau de H3K4me3 dans la lignée germinale des mutants *set-2(bn129)* et *set-2(ok952)*

J'ai analysé le niveau de H3K4me3 dans les lignées germinales des mutants *set-2(bn129)* et *set-2(ok952)* par quantification du signal immunofluorescent par microscopie confocale (Figure 59 A). Ces analyses montrent qu'il y a une diminution significative du signal H3K4me3 dans le mutant *set-2(bn129)* comparé au sauvage (diminution par 2 du signal) (Figure 59 B). Le signal H3K4me3 pour le mutant *set-2(ok952)* n'est pas différent de celui du sauvage.

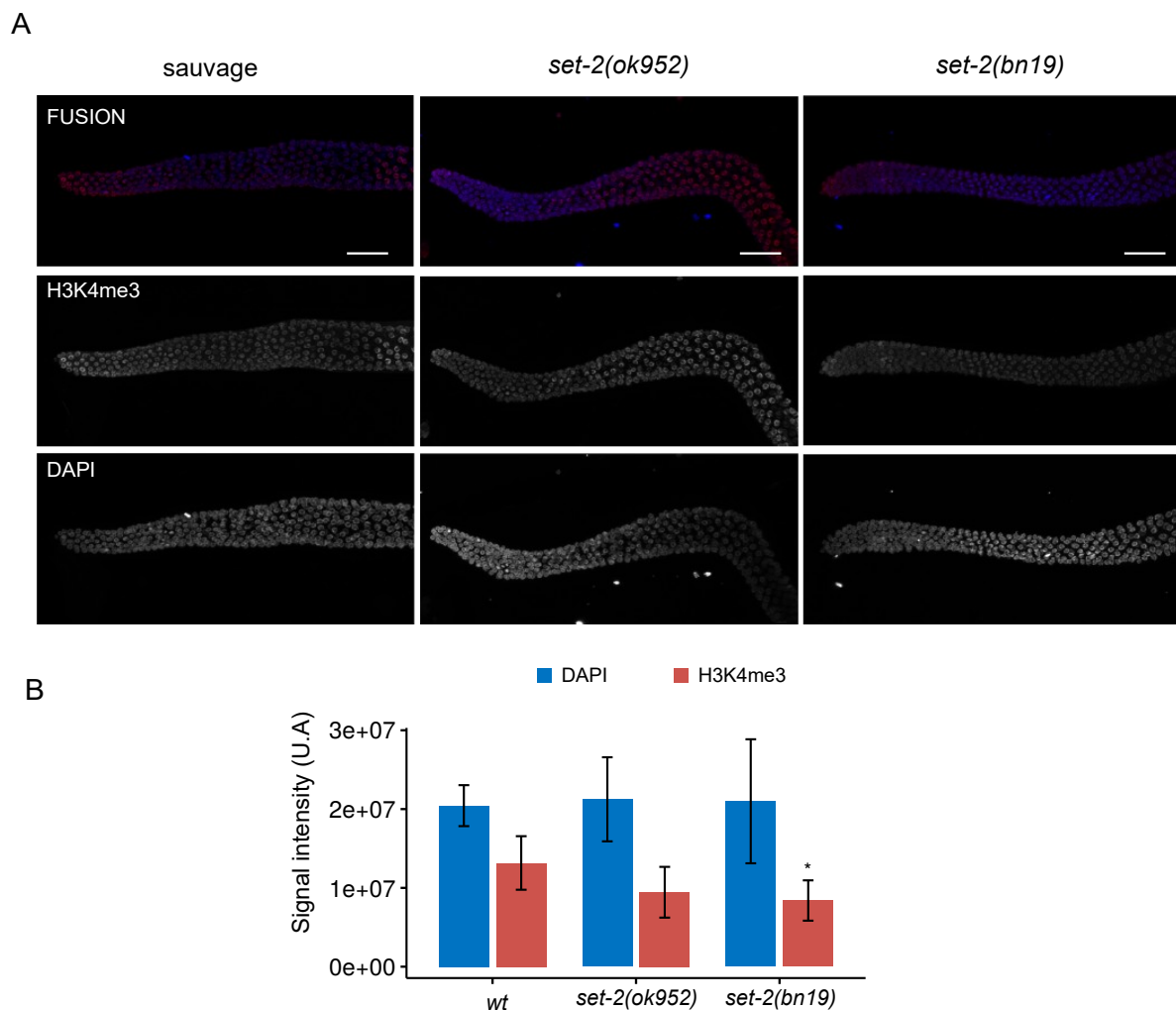


Figure 59| Niveau de H3K4me3 dans les lignées germinales des mutants *set-2(bn129)* et *set-2(ok952)*

(A) Image de microscopie de lignées germinales disséquées marquées en rouge pour la marque H3K4me3 et en bleu pour l'ADN (DAPI). Echelle : 20µm. (B) Quantification de l'intensité du signal H3K4me3 normalisée par rapport au signal DAPI de la souche sauvage. 5 lignées germinales ont été analysées par génotype. Test statistique : t-test, différence significative * $p < 0,05$.

8 Données de Flim FRET pour le mutant *set-2(bn129)*

Le principe de la technique de Flim FRET est expliqué dans la partie résultats (partie 2.6). Les résultats obtenus par David Llères et Aymeric Bailly pour le mutant *set-2(bn129)* montrent une augmentation du temps de vie de la fluorescence (Figure 60 A) et par conséquent une diminution globale de l'efficacité du FRET (Figure 60 B). Cette diminution de FRET reflète une compaction moins importante de la chromatine dans les noyaux en pachytène des lignées germinales du mutant *set-2*. Ces analyses permettent de définir plusieurs catégories d'efficacité de FRET qui correspondent aux pourcentages d'efficacité de FRET. Ces catégories reflètent des états de compaction de chromatine : plus l'efficacité de FRET est importante plus la chromatine est compactée. Ainsi la classe « high FRET » avec une efficacité de FRET de 60 à 80 % correspond à une chromatine compacte. À l'inverse, la classe « sub-low FRET » avec une efficacité de 0 à 10 % correspond à une chromatine peu compacte. Le mutant *set-2* présente une diminution significative de la classe high FRET et une augmentation de la classe sub-low FRET, indiquant que les classes de plus haute compaction de la chromatine sont altérées dans ce mutant. Les mesures de FRET sont directement influencées par le turnover des protéines impliquées dans la réaction de FRET. Pour savoir si le turnover des nucléosomes dans le mutant *set-2* est affectée, des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) ont été réalisées. Ces expériences montrent que le turnover des nucléosomes n'est pas modifié chez ce mutant (Figure 60 D). Par conséquent, la diminution globale de l'efficacité de FRET observée chez ce mutant ne dépend pas d'une altération du turnover. L'ensemble de ces résultats indique que *set-2* joue un rôle dans la compaction de la chromatine dans les noyaux en pachytène.

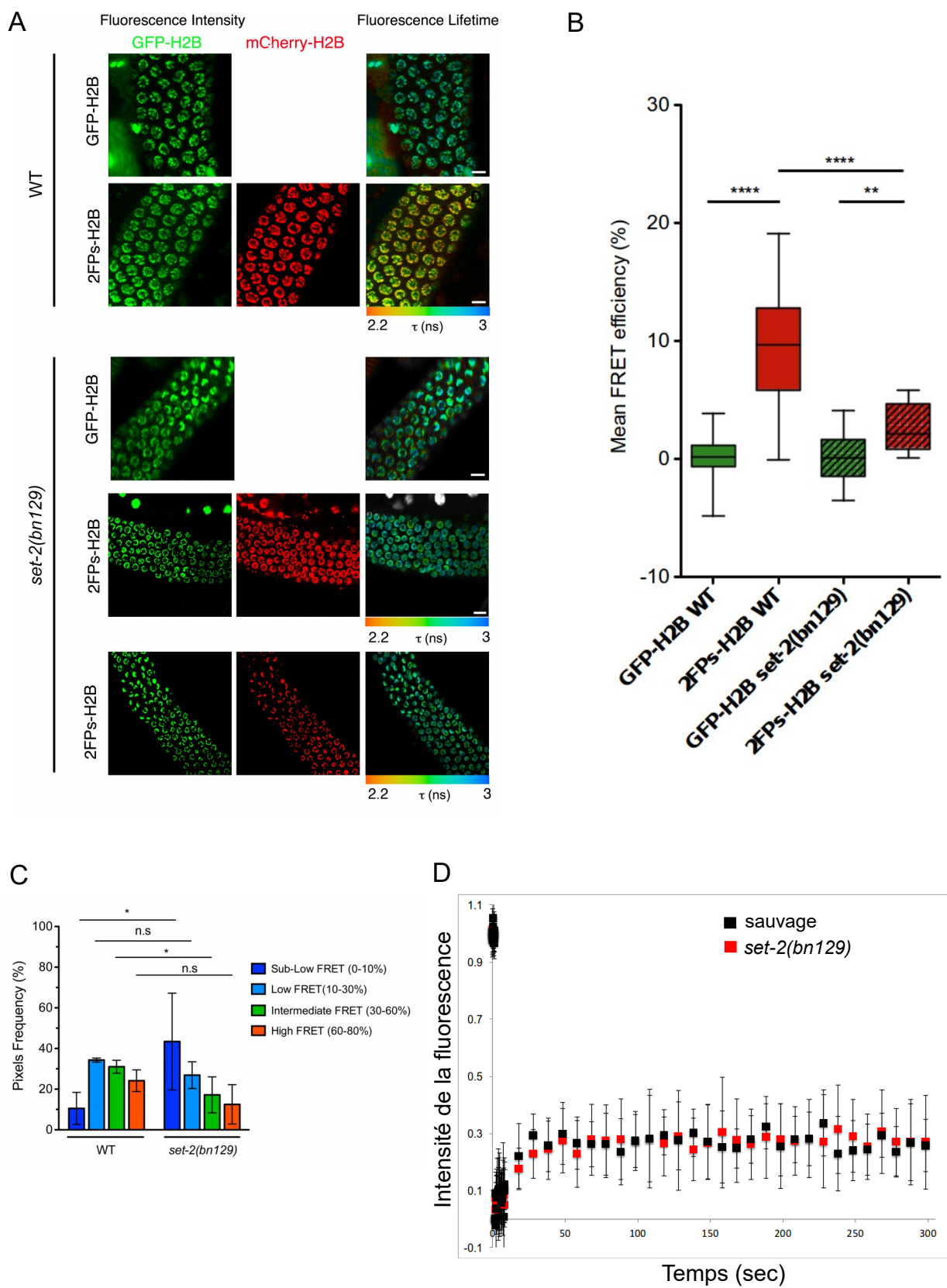


Figure 60| SET-2 est impliquée dans la compaction de la chromatine

Légende voir page suivante

(A) L'expression de la GFP (H2B-GFP) et de la mCherry (mCherry-H2B) n'est pas affectée dans le mutant *set-2(bn129)*. 2FP-H2B : souches contenant les transgènes exprimant la GFP et la mCherry fusionnées à l'histone H2B ; GFP-H2B : souches contenant le transgène exprimant la GFP fusionnée à l'histone H2B. Distribution du temps de vie de la GFP dans les noyaux pachytènes dans le fond sauvage (WT) ou mutant *set-2(bn129)*. Échelle : 5µm. (B) Efficacité du FRET (pourcentage) pour chaque condition. Test de Mann Whitney : ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. (C) Fraction relative des quatre populations de FRET : sub-low (efficacité de FRET entre 0 et 10%), low (10 à 30%), Intermediate (30 à 60%), et High (60 à 80%), dans les noyaux. T-test * $p < 0,05$, n.s : non-significatif. (D) Mesure de l'intensité de la redistribution de la fluorescence GFP après photobleaching.

9 Modèle de la recombinaison homologue

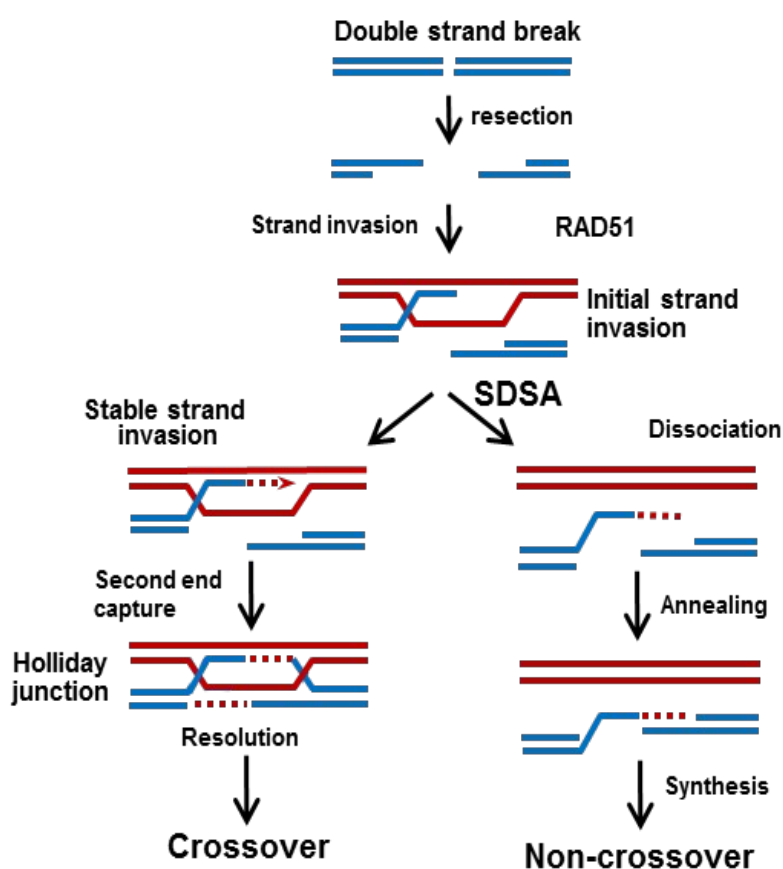


Figure 61| Modèle de la recombinaison homologue

Deux copies d'ADN d'une paire de chromosomes homologues sont représentées en bleu et en rouge. Les cassures double brin peuvent être réparées en utilisant la machinerie de recombinaison homologue de différentes manières. Le mécanisme de résection de l'ADN forme une extrémité 3' simple brin. La recombinaise RAD51 permet l'invasion d'un des brins au niveau de la séquence homologue et sert de matrice pour la synthèse de l'ADN (pointillé). Deux résultats de ce processus sont illustrés. A gauche, la réparation canonique des cassures double brin capture le second brin d'ADN pour former une jonction de Holliday. La résolution de cette jonction conduira (ou non) à la formation d'un crossing-over. A droite, le SDSA (Synthesis-dependent strand annealing) se produit lorsque le brin invasif (et le segment nouvellement synthétisé) est décroché et se ré-apparie avec l'extrémité simple brin de la cassure. Ceci conduit à une réparation dite non-crossover. D'après pezza.omrf.org

Partie V – Matériels et méthodes

1 Table des souches

Tableau 14 | Tableau des souches utilisées

Figure	Nom	Génotype
Figure 28	N2	sauvage
	PFR574 PFR405	<i>met-1(n4337)I</i>
Figure 29	N2	sauvage
	TM1738	<i>met-1(tm1738)I</i>
Figure 30	N2	sauvage
	PFR405 PFR574	<i>met-1(n4337)I</i>
	PFR592	<i>met-1(tm1738)I</i>
	PFR469	<i>polq-1(we20)III</i>
	PFR510	<i>set-2(bn129)III/qC1</i>
Tableau 3	NL960	<i>unc-22(st136::TC1)</i>
	PFR599	<i>met-1(tm1738)I, unc-22(st136::TC1)</i>
	PFR353	<i>mut-16(pk710)I, unc-22(st136::TC1)</i>
Figure 31	N2	sauvage
	PFR592	<i>met-1(tm1738)I</i>
Table 4	N2	sauvage
	PFR405	<i>met-1(n4337)I</i>
	PFR592	<i>met-1(tm1738)I</i>
Figure 32	N2	sauvage
	PFR510	<i>set-2(bn129)III/qC1</i>
	PFR590	<i>sin-3(tm1276)I</i>
	PFR624	<i>cfp-1(tm6369)IV/nT1 [unc?(n754) let-?] (IV;V)</i>
	PFR635	<i>set-2(bn129)III, cfp-1(tm6369)IV/nT1 [unc?(n754) let-?] (IV;V)</i>
	PFR629	<i>sin-3(tm1276)I, set-2(bn129)III</i>
Figure 33	N2	sauvage
	PFR510	<i>set-2(bn129)III/qC1</i>
Figure 34	N2	sauvage
	PFR510	<i>set-2(bn129)III/qC1</i>
	PFR656	<i>hcp-6(mr17)I</i>
	PFR651	<i>hcp-6(mr17)I, set-2(bn129)III</i>
Figure 35	PFR510	<i>set-2(bn129)III/qC1</i>
	AR1	<i>hcp-6(mr17)I</i>
	PFR656	<i>hcp-6(mr17)I</i> (rétrocroisée à partir de AR1)
	PFR651	<i>hcp-6(mr17)I, set-2(bn129)III</i>

Partie V – Matériels et méthodes

Figure 36	N2	sauvage
	PFR510	<i>set-2(bn129)III/qC1</i>
	DW102	<i>brc-1(tm1145)III</i>
	PFR656	<i>hcp-6(mr17)I</i> (rétrocroisée à partir de AR1)
	PFR651	<i>hcp-6(mr17)I ; set-2(bn129)III</i>
Figure 37	N2	sauvage
	PFR510	<i>set-2(bn129)III/qC1</i>
	PFR401	<i>set-2(ok952)III</i>
	PFR658	<i>cfp-1(tm6369)IV</i>
	BR3417	<i>spr-5(by134)I</i>
	PFR394	<i>rbr-2(tm1231)IV</i>
	PFR492	<i>met-2(ok2307)III</i>
	PFR496	<i>met-2(ok2307) set-25(n5021)III</i>
	PFR574	<i>met-1(n4337)I</i>
	PFR598	<i>met-1(tm1738)I</i>
Figure 38	KK381	<i>unc-4(e120) top-2(it7)II</i>
	PFR691	<i>unc-4(e120) top-2(it7)II ; set-2(bn129)III</i>
Figure 39	EG6787	oxSi487 [mex-5p::mCherry::H2B::tbb-2 3'UTR::gpd-2 operon::GFP::H2B::cye-1 3'UTR + unc-119(+)] II; unc-119(ed3) III
	EG4601	oxIs279[Ppie-1::GFP::H2B + unc-119(+)] II, unc-119(ed3) III
	PFR666	oxSi487 [mex-5p::mCherry::H2B::tbb-2 3'UTR::gpd-2 operon::GFP::H2B::cye-1 3'UTR + unc-119(+)] II; cfp-1(tm6369) IV
	PFR667	cfp-1 (tm6369) IV, oxIs279[Ppie-1::GFP::H2B + unc-119 (+)] II
Tableau 5	PFR542	<i>set-2(bn129)III</i> ; <i>dpy-13(e184)unc-5(ox171)</i> Mâle <i>set-2(bn129)III/+</i> (provenant de PFR510)
Figure 40	N2	sauvage
	PFR510	<i>set-2(bn129)III/qC1</i>
	PFR590	<i>sin-3(tm1276)I</i>
	PFR624	<i>cfp-1(tm6369)IV/nT1 [unc?(n754) let-?] (IV;V)</i>
	PFR635	<i>set-2(bn129)III, cfp-1(tm6369)IV/nT1 [unc?(n754) let-?] (IV;V)</i>
	PFR629	<i>sin-3(tm1276)I, set-2(bn129)III</i>
Tableau 6	N2	sauvage
	PFR624	<i>cfp-1(tm6369)IV/nT1 [unc?(n754) let-?] (IV;V)</i>
Figure 41 à 47	N2	sauvage
	PFR510	<i>set-2(bn129)III/qC1</i>
	PFR590	<i>sin-3(tm1276)I</i>
	PFR624	<i>cfp-1(tm6369)IV/nT1 [unc?(n754) let-?] (IV;V)</i>
Tableau 7	PFR660	<i>cfp-1(tm6369) dpy-13(e184)IV</i>

Partie V – Matériels et méthodes

		Mâle sauvage (Provenant de N2)
Figure 48	N2 PFR590	sauvage <i>sin-3(tm1276)</i> I
Figure 49	N2 PFR405 PFR425 TG1540	sauvage <i>met-1(n4337)</i> I <i>met-1(ttTi101519::Mos1)</i> I <i>gen-1(tm2940)</i> III
Figure 50	N2 PFR405	sauvage <i>met-1(n4337)</i> I
Figure 53	SX1316 PFR619 PFR623 SX1287 PFR618 PFR622	<i>mjIs144[mex-5p::GFP::his-58::21UR-1target::tbb-2 3'UTR]</i> II, <i>unc-119(ed3)</i> III <i>set-2(bn129)</i> III; <i>mjIs144[mex-5p::GFP::his-58::21UR-1target::tbb-2 3'UTR]</i> II <i>met-1(tm1738)</i> I; <i>mjIs144[mex-5p::GFP::his-58::21UR-1target::tbb-2 3'UTR]</i> II <i>mjIs145[mex-5p::GFP::his-58::21UR-1sense::tbb-2 3'UTR]</i> II, <i>unc-119(ed3)</i> III <i>set-2(bn129)</i> III; <i>mjIs145[mex-5p::GFP::his-58::21UR-1sense::tbb-2 3'UTR]</i> II <i>met-1(tm1738)</i> I, <i>mjIs145[mex-5p::GFP::his-58::21UR-1sense::tbb-2 3'UTR]</i> II
Figure 54	PFR623 PFR622	<i>met-1(tm1738)</i> I; <i>mjIs144[mex-5p::GFP::his-58::21UR-1target::tbb-2 3'UTR]</i> II <i>met-1(tm1738)</i> I, <i>mjIs145[mex-5p::GFP::his-58::21UR-1sense::tbb-2 3'UTR]</i> II
Figure 55	GR1720 PFR617 PFR621 GR1719 PFR616 PFR620	<i>unc-119(ed-3)</i> III, <i>mgSi4[(pCMP2)ubl-1p::GFP::siR-1sensor-ubl-13'UTR + cbr-unc-119(+)]</i> IV <i>set-2(bn129)</i> III; <i>mgSi4[(pCMP2)ubl-1p::GFP::siR-1sensor-ubl-13'UTR + cbr-unc-119(+)]</i> IV <i>met-1(tm1738)</i> I; <i>mgSi4[(pCMP2)ubl-1p::GFP::siR-1sensor-ubl-13'UTR + cbr-unc-119(+)]</i> IV <i>unc-119(ed3)</i> III, <i>mgSi3[(pCMP2)ubl-1p::GFP::ubl-1-3' UTR + Cbr-unc-119(+)]</i> IV <i>set-2(bn129)</i> III; <i>mgSi3[(pCMP2)ubl-1p::GFP::ubl-1-3' UTR + Cbr-unc-119(+)]</i> IV <i>met-1(tm1738)</i> I; <i>mgSi3[(pCMP2)ubl-1p::GFP::ubl-1-3' UTR + Cbr-unc-119(+)]</i> IV
Figure 57	PFR660	<i>cfp-1(tm6369) dpy-13(e184)</i> IV Mâle sauvage (Provenant de N2)
Figure 58	N2 AR1	sauvage <i>hcp-6(mr17)</i> I
Figure 59	N2 PFR510	sauvage <i>set-2(bn129)</i> III/qC1

2 Culture et méthodes usuelles

2.1 Milieu de culture et maintien

C. elegans est cultivé dans des boîtes de pétri de 6 cm de diamètre sur du milieu de culture NGM (Nematode Growth Medium : NaCl 3 g, Bactopeptone 2,5 g, Agar agar 11 g, H₂O qsp 1 L, autoclave, Cholestérol 5 µg/ml, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, KPO₄ 25 mM)ensemencé avec 200 µl de culture de la souche OP50 d'*Escherichia coli*, comme décrit par Brenner (Brenner, 1974). Les souches sont cultivées à 20 °C (ou 15 °C pour les mutants thermosensibles). Les expériences ayant nécessité d'autres températures sont précisées, pour celles-ci la température a été contrôlée à l'aide d'une sonde électronique (Ebro) et les cultures ont été placées dans un incubateur avec des variations de température de $\pm 0,1$ °C.

2.2 Synchronisation des vers

Les cultures de vers peuvent être synchronisées au premier stade larvaire. Pour cela une culture de vers de tous stades est récoltée dans de l'eau distillée, et additionnée de 1 volume de solution de Javel/Soude (Javel 1,3 % de chlore actif, NaOH 0,6 M) puis agitée et vortexée pendant 5 à 10 min. Cette solution dissout les vers gravides et les larves, ne laissant que les embryons qui y sont résistants. Les embryons sont alors centrifugés et le surnageant est retiré, 4 lavages en solution saline isotonique M9 (NaCl 86 mM, KH₂PO₄ 22 mM, Na₂HPO₄ 42 mM) sont effectués. Les embryons sont mis à éclore sur des boîtes NGM sans bactéries. Après 18 h à 20 °C, tous les embryons ont éclos en L1. En absence de nourriture, le développement des larves est arrêté au stade L1, lorsque la nourriture est à nouveau disponible, leur développement reprenne. Au bout de 18 h les larves sont remises sur boîtesensemencées de bactérie, on obtient ainsi une culture de vers synchrone.

2.3 Croisement

Les croisements sont réalisés en utilisant des mâles sauvages (maintenus par croisement avec des hermaphrodites sauvages) qui sont croisés avec des hermaphrodites d'une souche mutante ou transgénique afin d'obtenir dans la descendance des mâles hétérozygotes pour la mutation ou le

transgène. Ces mâles hétérozygotes peuvent alors être croisés avec des hermaphrodites de fond génétique souhaité. La descendance de ce croisement donnera des hermaphrodites double hétérozygote qui sont sélectionnés sur la base du phénotype ou par génotypage PCR. Ces hermaphrodites sont isolés et leur descendance est analysée pour trouver les doubles homozygotes.

2.4 Génotypage par PCR

Les vers sont lisés selon le protocole suivant : un ver est placé dans un tube contenant 5 µl de tampon de lyse (Protéinase K (Sigma) ajouté extemporanément 0,5 mg/ml, TrisHCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, Tween 20 (Sigma) 0,45 %, gélatine 0,01 %). La réaction de lyse se fait pendant 1 h à 65 °C. La Protéinase K est désactivée 15 min à 95 °C. 1 µl de la lyse est utilisé comme ADN matrice pour la PCR. Le mélange PCR a la composition suivante réalisé comme suit : Tampon 1X (ThermoFisher), dNTP 0,25 mM (Promega), Amorces 0,5 µM chacune, DreamTaq (ThermoFisher) 1 U, H₂O qsp 20 µl/réaction, lysat 1 µl. Le programme d'amplification standard est le suivant : 95 °C 3 min, 30 cycles [95 °C 30 secs, 58 à 62 °C (variable selon le couple d'amorces) 30 secs, 72 °C de 30 secs à 2 min (variable selon la taille de l'amplicon)] élongation finale : 72 °C 10 min.

2.5 Observations au microscope

2.5.1 Observations des vers vivants

Les vers sont placés sur coussin d'Agarose 2 % dans une goutte de 10 µl de Levamisole (10 mM dilué dans du M9) et recouverts d'une lamelle. Les vers peuvent ainsi être observés au microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC) ou par fluorescence.

2.5.2 Marquage de l'ADN par DAPI

Les vers sont récoltés avec une solution de M9 dans un tube de 1,5 ml, puis culottés par centrifugation de 2 min à 800 g à 4 °C et le surnageant est ôté. La fixation des vers est réalisée dans 1 ml de méthanol froid (-20 °C) pendant 10 min. Après centrifugation (15 secs), le surnageant est ôté, deux lavages dans 1 ml de PBS Tween 20 0,1 % sont effectués, l'ajout de détergent (Tween 20) permet d'éviter que les vers ne collent aux parois du tube. Le marquage de l'ADN se fait en mettant 25 µl de DAPI Fluoroshield (Sigma) sur le culot de vers fixés. Après 30 min d'incubation 10 µl sont déposés entre lame et lamelle pour observation au microscope à fluorescence.

3 Matériels et méthodes du chapitre 1

3.1 Étude des transcrits *met-1(tm1738)* et *met-1(n4337)*

Une boîte de vers de tous stades de génotype *met-1(tm1738)* ou *met-1(n4337)* a été récoltée et lavée 3 fois avec du M9. Après estimation du volume de culot de vers (entre 25 et 50 µl), 5 volumes de Trizol (Invitrogen) sont ajoutés. Après 45 secs de vortex les tubes sont plongés dans de l'azote liquide. Afin de casser la cuticule des vers et d'en extraire l'ARN, 4 cycles de décongélation (dans un bain marie à 37 °C), vortex 45 secs et congélation (dans l'azote liquide) ont été effectués. Les échantillons sont transférés dans un tube Phase Lock Gel-Heavy (Brinkmann Instrument) pré-centrifugés à 12 000 g pendant 1 min, complétés avec 20 µl de Chloroforme par 100 µl de Trizol puis agités pendant 15 secs. La suite du protocole se fait selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). L'élution se fait dans 12 µl d'eau, 2 µl sont utilisés pour mesurer la concentration en ARN au DropSense 96 (Trinean). Le kit PrimeScript RT Master Mix (Takara) est utilisé pour rétrotranscrire 500 ng à 1 µg d'ARN selon les recommandations du fournisseur. L'ADN complémentaire obtenu et l'ADN génomique ont été utilisés en PCR (voir protocole ci-dessus). Les couples d'amorces suivantes ont été utilisés pour les ADNc et ADNg pour *met-1(tm1738)* : oVR447-oMH013, oVR447-oVR385, oVR447-oVR379, oVR447-oMH014 (ADNc uniquement) ; pour *met-1(n4337)* : oVR358-oVR379. Les produits de PCR sont purifiés avec le kit PCR Clean Up (Macherey Nagel) et envoyés à séquencer avec l'amorce oVR447 ou oVR358 (à GATC).

3.2 Analyse bioinformatique des données *msh-6* et *polh-1*

Les séquences ont été téléchargées à l'aide de l'outil SRA tool kit version 2.4.1 (Staff, 2011). Une première analyse des fichiers de séquences a été réalisée à l'aide de FastQC pour connaître leur qualité (Andrews, 2010). La suite du nettoyage a été faite avec l'outil cutadapt version 1.9.1 (Martin, 2011). Pour les deux répliques biologiques sauvages, les séquences adaptatrices Nextera Illumina contaminantes ont été otées avec l'option --trim -n -a CTGTCTCTTATA -A CTGTCTCTTATA. Les extrémités 5' et 3' de moindre qualité (qPhred inférieur à 20) ont été coupées avec l'option -q 20,20. Les premières et dernières bases de toutes les séquences ont été coupées avec l'option -u 1 -u 1 -U 1 -U 1. Pour les répliques biologiques des mutants *msh-6* et *polh-1*, les séquences adaptatrices Truseq Illumina ont été otées avec l'option --trim-n -a AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC -A

AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT.

Les extrémités 3' et 5' de bonne qualité ont été retirées avec l'option -u -1 -u 1 -U -1 -U 1. Ceci afin de permettre l'élimination des bases internes de mauvaise qualité. Les bases des extrémités 5' et 3' de qualité inférieure à un qPhred de 20 ont été retirées avec l'option -q 20,20. Enfin pour toutes les lignées, les séquences de longueur inférieure à 10 pb sont éliminées avec l'option --trim-n --minimum-length 10. Une deuxième analyse qualité est réalisée avec FastQC pour vérifier qu'il y a bien une amélioration de la qualité générale des séquences après nettoyage. La suite est identique aux matériels et méthodes de l'article Herbette et al. mise à part la dernière étape qui est expliquée ci-après.

L'intersection des fichiers a été faite avec la commande isec -n =2 de BCFtools. Les variants avec au plus deux allèles (une référence et une alternative) ont été conservés (commande -e 'GT="1/2c' de BCFtools), les variants couverts par plus de 4 séquences sont conservés (commande -e "(DP4[0]+DP4[1]+DP4[2]+DP4[3])<5' de BCFtools). Enfin les séquences ont été filtrées sur la base de leur qualité (Roerink et al., 2014) ou sur la base de leur fréquence (Herbette et al., 2017). Les variants ayant une qualité Phred calculée par BCFtools qui est inférieure à 10 sont éliminés (commande -e 'QUAL<10' de BCFtools). Les variants ayant une fréquence allélique inférieure à 0,8 par rapport à l'allèle de référence sont éliminés (commande -e 'AF<0,8' de BCFtools).

3.3 Estimation du nombre de descendants

Pour chaque génotype, 10 à 11 L4 sont isolés et déplacés sur une boîte fraîche toutes les 24 h jusqu'à arrêt de la ponte. La descendance est comptée 48 h après avoir retiré le parent.

3.4 Sensibilité aux irradiations au stade L4

Des vers au stade L4 + 12 h ont été irradiés 120 Gy aux rayons X. 2 h après traitement, 5 vers ont été isolés sur une boîte pendant 24 h pour permettre la ponte, puis ont été éliminés. La survie embryonnaire a été quantifiée 24 h plus tard en comptant les larves et les embryons non éclos. Pour chaque génotype au moins 2 boîtes ont été quantifiées et 3 réplicas biologiques indépendants ont été réalisés.

3.5 Essai de réversion *unc-93* et *unc-22::Tc1*

Trois vers possédant la mutation *unc-93(e1500)* ou possédant l'insertion du transposon Tc1 dans le gène *unc-22* (allèle *st136::Tc1*) sont transférés sur une boîte 9 cm et incubé à 20 °C, jusqu'à disparition complète du tapis bactérien. Un carré de 2 cm x 2 cm est découpé dans l'agar et déposé sur une boîte fraîche avec nourriture. Les animaux de phénotype sauvage sont quantifiés 3 jours après. 14-15 boîtes par génotype ont été utilisées pour le test de réversion *unc-93*. Pour les deux répliques biologiques indépendants du test *unc-22::Tc1*, 30 boîtes par génotype ont été utilisées. Le taux de réversion est estimé en divisant le nombre d'événement de réversion par le nombre total de génome haploïde observé.

3.6 Mortal germline

À chaque nouvelle génération 6 animaux au stade L4 sont déplacés sur une boîte fraîche. Pour chaque génotype, trois lignées parallèles sont ainsi maintenues au cours des générations à 20 °C ou 25 °C comme précisé. Les lignées sont considérées comme stériles lorsque le nombre de descendants est inférieure à 10 animaux.

4 Matériels et méthodes du chapitre 2

4.1 ARN interférence

Les expériences utilisant l'ARN interférence (ARNi) dirigé contre les sous-unités des Condensines a été réalisé suivant ce protocole.

4.1.1 Génotypage des bactéries

Les bactéries *E. coli* de la souche HT115 possédant un plasmide codant un ARN double brin du gène cible proviennent de la banque commerciale d'ARN interférence (Ahringer laboratory-Gene Service Inc). Les souches de bactéries ont été étalées sur boîte LB et Ampicilline (100 mg/ml) (LBA) et incubées à 37 °C pendant une nuit. 4 clones isolés ont été amplifiés en culture liquide LBA, et l'insert contenant la séquence du gène ciblé a été amplifié par PCR avec ce protocole : 1 µl culture, Tampon 1X, dNTP 25 mM, amorce T7P 1 µM, Dream Taq 1 U, H₂O qsp 20 µl/réaction, et avec le programme d'amplification : 95 °C 3 min, 30 cycles [95 °C 30 secs, 58 °C 30 secs, 72 °C de 1 min], 72 °C 10 min. Après vérification sur gel d'agarose 1 %, les produit de PCR sont purifiés

avec le kit Gel and PCR clean-up (Macherey Nagel) et envoyés à séquencer avec l'amorce oVR445. Une colonie possédant la bonne séquence cible est congelée dans du glycérol (15 % final). Ce stock est utilisé pour toutes les expériences d'ARN interférence : les bactéries sont décongelées en grattant le stock et en striant une boîte LBA (incubée à 37 °C sur la nuit). De cette boîte, un clone isolé est utilisé pour faire une culture liquide. Pour chaque expérience une nouvelle strie est réalisée.

4.1.2 préparation des boîtes et culture ARNi

Les boîtes NGM additionnées d'IPTG (Sigma) pour l'induction de l'ARN double brin ont été préparées comme suit : NaCl 3 g, Bactopeptone 2,5 g, Agar agar 11 g, H₂O qsp 1 L, autoclave, Cholestérol 5 µg/ml, CaCl₂ 1 mM, MgSO₄ 1 mM, KPO₄ 25 mM, IPTG 1 mM, le milieu a été coulé dans des boîtes de 3 cm de diamètre et laissé refroidir une nuit avant d'êtreensemencées. 6 ml de culture liquide LBA de la souche désirée est préparée en sélectionnant un clone isolé d'une strie (voir ci-dessus) et en laissant une nuit à 37 °C, puis 6 µl d'IPTG 1M sont ajoutés pour induire l'expression de l'ARN double brin, les bactéries sont incubées à 37 °C pendant 2h30. 300 µl de culture servent à ensemencer les boîtes NGM additionnées d'IPTG, et sont laissés à sécher 24 h à 20 °C, les boîtes sont stockées à 4 °C jusqu'à leur utilisation (mais ne sont pas conservées plus d'un mois). Les vers sont synchronisés au stade L1 suivant le protocole décrit en 2.2. Environ 100 à 200 larves ont été mises sur les boîtes ARNi et placées à 20 °C. Les animaux sont laissés à développer jusqu'au stade désiré, puis ils sont récoltés et leur ADN est marqué au DAPI suivant le protocole décrit en 2.5.2. L'observation se fait avec L'Axiolmager A2.

4.2 Acridine Orange (AO)

Pour chaque génotype, entre 20 et 30 larves L4 sont mis sur une boîte fraîche à température restrictive (20 °C) pendant 18 h. Pour marquer les vers avec de l'Acridine Orange (Sigma), 1 ml d'AO à 50 µg/ml dilué dans du M9 1X est déposé sur la boîte. Après 2 h d'incubation à 20 °C dans le noir, les vers sont déplacés sur une boîte fraîche pour se laver (pendant 2 h) de l'excédent d'AO et ainsi éviter une trop forte fluorescence de l'intestin. Après cette étape de lavage, les vers sont montés sur coussin d'agar (voir protocole en 2.5.1) puis imagés avec le microscope confocale LSM710 (Zeiss). Les images sont traitées avec Fiji (Schindelin et al., 2012). La gonade postérieure des vers est prise en photo en faisant un z-stack (suivant la méthode : MAX INTENSITY), les cellules positives sont comptées. 20 gonades par génotypes sont imagées.

4.3 Comptage des défauts de lignée germinale du mutant *top-2*

Les vers sont synchronisés au stade L1 suivant le protocole décrit en 2.2. et mis sur boîte à 23.5°C, jusqu'à atteindre le stade de jeune adulte. Les animaux sont alors marqués par DAPI (voir protocole 2.5.2). Les vers sont observés à l'AxioImager A2. Les défauts phénotypiques de la lignée germinale sont déterminés selon les catégories définies par (Heestand et al., 2018), comme suit : les lignées « Sauvages » sont d'aspect sauvage, les lignées « Courtes » possèdent un nombre réduit de cellule (50-100) mais possèdent un coude et les zones mitotique et méiotique sont toujours visibles, « Atrophées » désigne les gonades avec un très petit nombre de cellule, les zones mitotique et méiotique ne sont plus distinguables, « Tumeurs » lorsque un grand nombre de cellules mitotiques sont observées et remplissent l'intégralité du bras de gonade. Des catégories supplémentaires sont définies sur l'aspect des noyaux de la lignée germinale : Normal, Élargi, de Taille variable. Pour chaque génotype, 100 gonades ont été observées.

4.4 Détermination de la fréquence de recombinaison

Des mâles de génotypes *set-2(bn129)/+* ont été croisés avec des hermaphrodites de génotype *set-2(bn129)*, *dpy-13(e184) unc-5(ox171)* (Figure 62). 24 animaux issus de ce croisement ont été isolés sur des boîtes et changés de boîtes chaque jour jusqu'à arrêt de la ponte. Les phénotypes [wt], [dpy-unc], [unc] et [dpy] de leurs descendance ont été comptabilisés. À la fin de la ponte, les parents ont été génotypés par PCR pour déterminer s'ils étaient de génotypes *set-2(bn129)* homozygote ou hétérozygote. Pour cela, le protocole de lyse et de PCR utilisé est présenté en 2.4, les amorces utilisées sont CB331F et 1953R, avec une température d'hybridation de 58 °C et une élongation d'une minute, après migration sur gel d'agarose 1 %, le génotype est déterminé par la présence d'une bande de 425 pb (homozygote *set-2(bn129)*) ou de deux bandes de 425 pb et 1173 pb (*set-2(bn129)/+*). La fréquence de recombinaison (p) a été calculée comme décrit (Brenner, 1974), par la formule $p = 1 - \sqrt{1 - 2R}$ où R est la fréquence de phénotype recombinant ([dpy], et [unc]) dans la descendance.

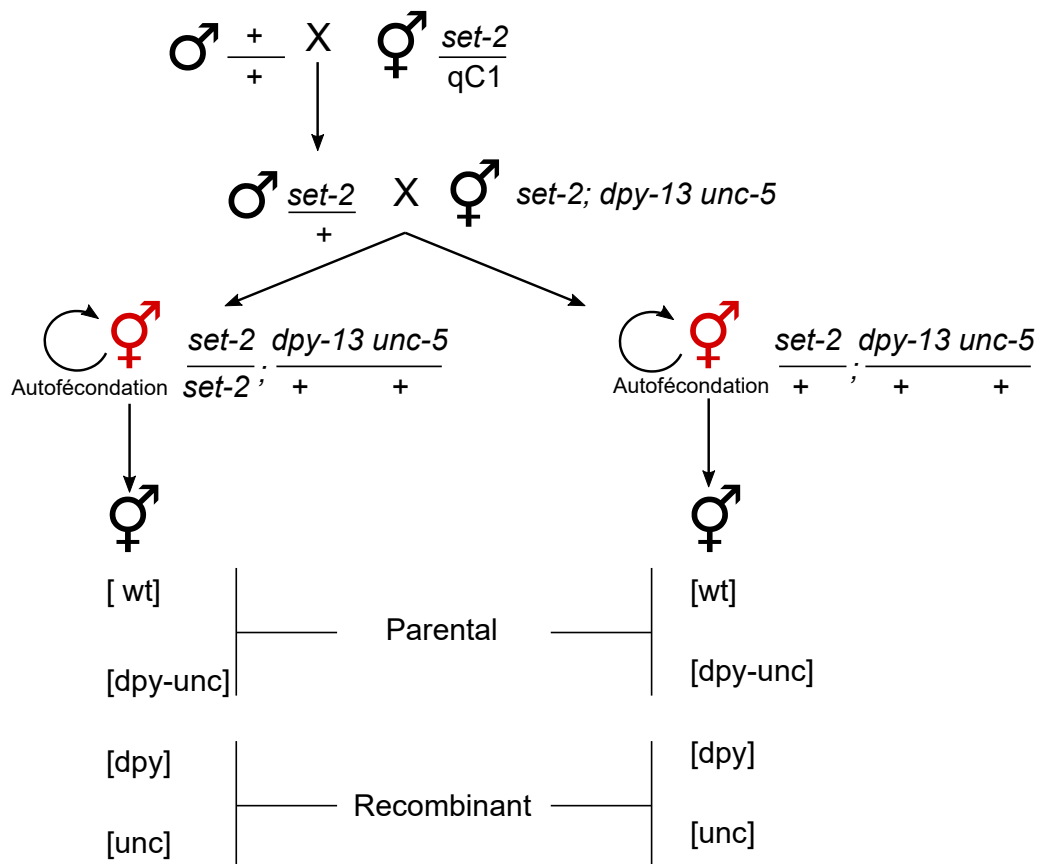


Figure 62| Schéma de croisement pour déterminer la fréquence de recombinaison entre *dpy-13* et *unc-5*.

Des mâles hétérozygotes *set-2(bn129)*, obtenus par croisement entre un mâle sauvage et un hermaphrodite *set-2(bn129)/qC1*, sont croisés avec des hermaphrodites homozygotes pour *set-2(bn129); dpy-13(e184) unc-5(ox171)*. De ce croisement, 24 descendants hermaphrodites (en rouge) sont isolés et génotypés et les phénotypes de leurs descendances sont quantifiés.

4.5 Estimation du nombre de descendants et de la létalité embryonnaire

Le nombre de descendants ainsi que la létalité embryonnaire à 20 °C pour les mutants, *set-2(bn129) M-Z*, N2 (wt), *hcp-6(mr17)* et *set-2(bn129); hcp-6(mr17)*, a été estimé comme suit : pour chaque génotype maintenu à 15 °C, 10 à 11 L4 sont isolés et déplacés sur des boîtes fraîches à 20 °C toutes les 24 h jusqu'à arrêt de la ponte. La descendance et les embryons non éclos sont comptés 48 h après avoir retiré le parent.

4.6 Étude des niveaux de transcrit *kle-2* et *capg-1* par RT qPCR

4.6.1 Extraction d'ARN

Cinq boîtes (de diamètre 3 cm) de vers adultes ont été récoltées dans du M9 1X et lavées 3 fois pour enlever les bactéries. Le culot de vers obtenus a été estimé et 250 µl de NucleoZOL (Macherey Nagel) pour 25 µl de culot de vers ont été ajoutés. Les tubes sont vortexés pendant 45 secs puis congelés dans l'azote liquide. 4 cycles de décongélation en bain marie à 37 °C, vortex 45 secs et recongélation dans l'azote liquide sont effectués. Après décongélation, 100 µl d'eau sont ajoutés pour 250 à 300 µl de mélange vers/NucleoZOL. Après incubation 10 min à température ambiante, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 10 min. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et 1 volume d'éthanol 100 % est ajouté et agité par inversion. Ce mélange est transféré sur une colonne de silicate du kit RNeasy (Qiagen), les centrifugations et lavages se font selon les recommandations du fournisseur. L'élution se fait dans 30 µl d'eau sans nucléase. L'intégrité des ARN est évaluée avec la Tape Station 4200 (Agilent), la concentration d'ARN est évaluée avec le DropSense 96 (Trinean).

4.6.2 RT et qPCR

Pour chaque échantillon, 2 fois 500 ng d'ARN ont été utilisés pour la rétrotranscription avec le kit Transcriptor Universal cDNA Master (Roche), puis rassemblés. Les ARN dilués à 500 ng/µl et dont le volume a été ajusté à 15 µl ont été préalablement dénaturés en chauffant 3 min à 65 °C. Les ADN complémentaires sont dilués 5 fois avant d'être utilisés pour la qPCR. L'analyse qPCR a été faite avec l'appareil CFX Connect (Biorad) avec le mix Fast Start Universal SYBR Green Master (Roche). Les qRT PCR ont été faites sur 3 répliques biologiques, en duplicas techniques. Les niveaux de transcrit ont été normalisés avec les gènes de ménage *cdc-42* et *pmp-3*. La courbe de fusion de chaque couple d'amorces a été effectuée afin de vérifier la spécificité du produit amplifié. L'efficacité des couples d'amorces pour *kle-2* et *capg-1* a été déterminée à l'aide d'une gamme de 8 dilutions d'ADN complémentaire. L'analyse statistique a été réalisée avec un t-test. Les couples d'amorces utilisés sont les suivants : *pmp-3* : CB62F-CB63R, *cdc-42* : CB60F-CB61R, *kle-2* : oMH092-oMH093 (efficacité 2.04), *capg-1* : oMH106-oMH107 (efficacité 1.98).

4.7 DAPI sur gonades disséquées

Entre 30 et 40 L4 des souches *hcp-6(mr17)*, *hcp-6(mr17)* ; *set-2(bn129)*, *set-2(bn129)* M-Z- et sauvage sont transférées de 15 °C à 23.5 °C et restent pendant 24 h à cette température. Le protocole est identique à celui de la section 5.5. jusqu'à la cryo-fracture. Après cryo-fracture, les lames sont rincées 2 fois 5 min dans un bain de PBS Tween 0.2 %. Les lames sont placées dans un bain de PBS Tween 0.2 % additionné de 50 µl de Hoechst 1 mg/ml (Sigma) pendant 5 min. Enfin les lames sont rincées deux fois en PBS pendant 5 min. Les lames sont montées avec 12 µl de milieu de montage (PBS 1X, n-Propyl-Gallate 4 %, DE Glycérol 90 %). les lames sont imagées au microscope confocal LSM710 (Zeiss).

4.8 Flim Fret

La préparation des gonades, l'acquisition du Flim-Fret et l'analyse ont été réalisées suivant le protocole décrit dans Llères et al., (2017). L'acquisition du temps de vie de la fluorescence a été faite pour une durée de 90sec.

4.9 Arrêt du développement embryonnaire

20 vers de géotypes *hcp-6(mr17)* ou *set-2(bn129);hcp-6(mr17)* de stade L4 ont été placés à 20 °C pendant 24 h, puis sont ôtés. Après 24 h, les embryons ont été récoltés dans du M9 1X et placés sur coussin d'agarose 2 %. Le stade du développement embryonnaire a été déterminé par observation au microscope à contraste interférentiel différentiel (AxioImager A2 Zeiss).

5 Matériels et méthodes du chapitre 3

5.1 Extraction d'ARN de gonades isolées

Pour cette expérience l'ARN a été extrait de gonades issues de trois répliques biologiques indépendants par souche. Les souches N2 (sauvage), PFR510 (*set-2(bn129)*, M-Z-), PFR624 (*cfp-1(tm1738)*, M-Z-) et PFR590 (*sin-3(tm1276)*) ont été utilisées. Le génotype des souches a été testé par PCR (voir protocole 2.4) avant de disséquer les gonades. Les couples d'amorces utilisés pour chaque géotypage est décrit dans la section 7. 15 min avant la dissection, les vers sont placés sur une boîte NGM sans nourriture, pour éviter la contamination par l'ARN de bactérie. Les gonades de 5 à 7 jeunes adultes (L4 + 12 h) sont disséquées dans 15 µl de tampon de dissection (Egg Buffer

1.1 X (HEPES pH 7,3 25 mM, NaCl 118 mM, KCL 48 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM), Levamisole 0.5 mM, Tween 20 0,1 %) sur lame. Un maximum de 7 vers à la fois est préférable afin d'éviter un trop grand nombre de têtes, carcasses ou embryons qui risqueraient d'être aspirés et de contaminer la préparation d'ARN. La lame est nettoyée entre chaque tour de dissection avec une solution de RNase AWAY (Sigma). Les vers sont coupés au niveau du pharynx à l'aide d'aiguille (BD Microlance), sous l'effet de la contraction musculaire induite par la présence de Lévarmisole, les gonades sortent de la carcasse. Une fois sortie, les gonades sont coupées au niveau du coude et la partie distale est récupérée à l'aide d'un capillaire étiré en verre borosilicate 1 mm OD, 0,58 mm ID (Harvard Apparatus). Les gonades sont placées dans 30 µl de tampon d'extraction XB (Kit Picopure, Life technology) sur la glace. 100 gonades par génotype et par répliques biologique sont ainsi disséquées. Le mélange de gonades et de tampon est congelé dans l'azote liquide et conservé à -80 °C jusqu'à extraction de l'ARN. Les tubes sont mis à décongeler, le volume de tampon d'extraction XB est ajusté à 100 µl, la suite du protocole se fait avec le kit PicoPure (Life Technology) suivant les indications du fabricant. L'élution se fait dans 13 µl d'eau dépourvu de nucléase (Invitrogen). L'intégrité des ARN est évaluée avec la Tape Station 4200 (Agilent), et la concentration en ARN est évalué avec le DropSense 96 (Trinean). La librairie a été construite à la plateforme GenomEast (IGBMC, Strasbourg, France), avec le kit Illumina Truseq Stranded total RNA-seq (Illumina) après déplétion des rRNA et séquencée par l'appareil Illumina Hiseq 4000.

5.2 Analyse bioinformatique

L'analyse bioinformatique du nettoyage des séquences, alignements sur le génome de référence de *C. elegans* (version WS254) ainsi que la quantification du nombre de séquence par gène ont été réalisés sous Galaxy (Afgan et al., 2016). Les outils et les paramètres suivants ont été utilisés : Les séquences ont été cartographiées sur le génome de référence (WS254) avec l'outil RNA-STAR (Version 2.4.1d). Les séquences avec une qualité de cartographie inférieure à 10 ont été retirées avec SAMtools (Version 0.1.19). Le niveau d'expression de chaque gène pour chaque échantillon a été calculé avec htseq-count (Version 0.7.2).

L'analyse différentielle d'expression des gènes entre les différentes souches a été réalisée avec le package DESeq2 version 1.16.1 (Love et al., 2014) sous R version 3.4.4 (R Development Core Team, 2009), avec les options suivantes : lfcThreshold=0.4, altHypothesis="greaterAbs". Les analyses supplémentaires ont été réalisées avec R.

5.3 Analyse des termes d'onthologie

Les termes d'onthologie ont été analysés avec l'outil « gene set enrichment analysis » de Wormbase. Une liste de 9067 gènes exprimés (avec une moyenne de couverture supérieure à 10 séquences) a été utilisée comme « background » pour l'analyse.

5.4 Établissement des listes de gènes dérégulés chez les mutants *mes-2* et *mes-4*

Les listes utilisées sont les suivantes : (Bender et al., 2006; Gaydos et al., 2012; Tabuchi et al., 2011). Elles ont été rassemblées à l'aide du logiciel R pour obtenir une liste de 554 gènes uniques. La technique, le tissu, et le génotype des souches utilisées dans ces études sont expliqués par le tableau suivant :

Tableau 15 | Données de transcriptomique réalisées sur les mutants *mes* dans la lignée germinale

Étude	Techniques séquençage	de Tissus	Génotype	Nombre de gènes surexprimés sur le X
Gaydos et al. 2012	Micro-Array	Lignées germinales disséquées	<i>mes-2</i>	16
			<i>mes-4</i>	154
			<i>mes-2;mes-4</i>	210
Tabuchi et al. 2014	Micro-Array	Lignées germinales disséquées (partie distale)	<i>mes-4</i>	446
Bender et al. 2006	Micro-Array	Lignées germinales disséquées	<i>mes-4</i>	61

5.5 Immunomarquage de SIN-3

Pour que les gonades collent à la lame de microscopie, celles-ci sont recouvertes d'une couche de polylysine 2X (Sigma) étalée à l'aide d'une spatule en caoutchouc. Les lames sont séchées pendant 10 min à 170 °C sur une plaque chauffante, le processus est recommencé une deuxième fois après avoir fait refroidir les lames. Les vers sont transférés sur une boîte sans nourriture pour retirer les bactéries. Puis ils sont placés dans 10 µl de tampon de dissection (M9 0.4 X, lévamisole 20 mM) sur la lame. Les vers sont coupés au niveau du pharynx à l'aide d'aiguilles, les gonades peuvent ainsi sortir. L'excédent de liquide est retiré par aspiration avec un

capillaire effilé. 11 µl de PFA 3 % sont déposés sur les lames et recouverts d'une lamelle 15mmx15mm. Après 5 min d'incubation à température ambiante, les lames sont flash-congelées sur une plaque d'aluminium placée sur glace carbonique. Après 30 minutes d'incubation des échantillons sur glace carbonique, la lamelle est retirée à l'aide d'un scalpel. Cette étape de cryo-fracture permet de retirer la gaine membranaire qui recouvre la gonade et empêche la pénétration des anticorps dans le tissu. Les lames sont immédiatement placées dans un bain de méthanol froid (Conservé à -20°C), pendant 1 min, puis rincées 3 fois dans un bain de PBS Triton 1 % (Sigma) (PBST) pendant 7 min. Une étape de blocage est réalisée, 35 µl de solution de blocage (PBS 1X, Triton 1 % et BSA 1 %) sont déposés sur les lames et laissés à incuber en chambre humide pendant 25 min à température ambiante. L'hybridation de l'anticorps primaire se fait en déposant 35 µl d'anticorps dilué dans la solution de blocage. L'hybridation se fait sur la nuit à 4 °C dans une chambre humide. Le lendemain les lames sont lavées 3 fois 7 min dans un bain de PBST. 35 µl d'anticorps secondaire dilué également dans la solution de blocage est déposé, l'hybridation se fait pendant 50 min à température ambiante. Les lames sont lavées dans un bain de PBST de Hoechst 2 µg/ml (Sigma) pendant 7 min, puis deux lavages de 7 min en PBST sont effectués. Les échantillons sont montés entre lames et lamelles avec 10 µl de milieu de montage (PBS 1X, n-Propyl-Gallate 4 %, DE Glycérol 90 %). les lames sont imagées au microscope confocal LSM710 (Zeiss) et traités avec le logiciel Fiji. Les anticorps suivants ont été utilisés :

Primaires : anti-SIN-3 Q59861015 de lapin (1/1000) [ou anti-SIN3 Q60131017 de lapin (1/1000)(marquage aspécifique)]

Secondaire : Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (Molecular Probe), dilution : (1/1000)

5.6 Spermatogenèse

Des vers sauvages, *set-2(bn129)*, *sin-3(tm1276)* et *cfp-1(tm6369)* ont été synchronisés au stade L1 puis placés à 20 °C pendant 48 h ou 62 h, ou à 25 °C pendant 42 h ou 54 h. Ils ont été observés après DAPI staining (section 2.5.2) au microscope Zeiss AxioImager A2. La présence de spermatozoïdes a été évaluée à 62 h post-L1 à 20 °C ou 54 h post-L1 à 25 °C .

20 animaux *cfp-1(tm6369); dpy-13(e184)* ont été croisés ou non, avec des mâles sauvages (N2) à 20 °C ou à 25 °C (animaux pondus à cette température). La descendance a été quantifiée 48 h après croisement, les mâles ont été retirés 24 h après croisement. La présence de spermatozoïdes a été observé après DAPI staining (protocole : section 2.5.2).

5.7 Estimation du nombre de descendants et de la létalité embryonnaire

Le nombre de descendants ainsi que la létalité embryonnaire pour les mutants *set-2(bn129)*, *sin-3(tm1276)*, *cfp-1(tm6369)* et les double mutants *set-2(bn129); cfp-1(tm6369)* et *set-2(bn129); sin-3(tm1276)*, ont été évalués comme décrit dans le manuscrit (Beurton et al., 2018).

6 Matériels et méthodes des Annexes

6.1 Apoptose et Arrêt du cycle cellulaire

Pour quantifier les cellules en apoptose, des animaux au stade L4 portant le transgène rapporteur *ced-1::GFP* ont été irradiés (ou non) 60 Gy aux rayons X (Precision X-Ray, PTW), avec les paramètres suivant : filtre : F2 (0,8 mm Sn, 0,25 mm Cu, 1,5 mm Al); voltage : 320kV ; ampérage : 12,5mA ; hauteur : 50cm ; offset : 6cm. Le nombre de cellules GFP+ a été quantifié 24 h et 48 h après irradiation. Au moins 5 à 10 gonades ont été quantifiées pour chaque génotype et temps.

Des animaux au stade L4 + 12 h ont été irradiés (ou non) 60 Gy par rayons X. Les vers ont été observés 8 h, 24 h et 48 h après irradiation. Toutes les images ont été acquises avec L'Axiomager A2 (Zeiss).

6.2 Étude de la dérégulation des petits ARN

Les animaux PFR616, PFR617, PFR618, PFR619, PFR620, PFR621, PFR622, PFR623, (voir génotype complet dans le tableau des souches) ont été placés à 20 °C ou 25 °C et la fluorescence a été observée au microscope à épifluorescence (Axiomager A2 Zeiss). À 25 °C, pour chaque souche, 6 animaux de stade L4 ont été déplacés sur une boîte fraîche tous les 3 jours, jusqu'à stérilité de la lignée (F13). À chaque génération environ 20 animaux ont été observés pour la fluorescence de la GFP. La quantification du signal GFP a été faite avec le logiciel Fiji.

6.3 Séquençage du gène *hcp-6*

Le gène *hcp-6* a été re-séquéncé intégralement, les souches utilisées pour l'extraction d'ADN sont AR1 (*hcp-6(mr17)*), et N2 (sauvage). Les couples d'amorces ont été dessinées pour amplifier par PCR des fragments de 1,5 kb chevauchant sur environ 200 pb. Le protocole de lyse utilisé est

présenté dans la partie 2.4. La PCR a été réalisée avec une polymérase haute fidélité suivant ce protocole : 1 µl/réaction de lyse (N2 ou AR1), Tampon HF 1 X (NEB), dNTP 0,2 mM, amorces 0,4 µM chacune, Phusion (NEB) 1 U, H₂O qsp 25 µl/réaction. Le programme d'amplification est le suivant : 95 °C 3 min, 30 cycles [95 °C 15 secs, 60 °C 15 secs, 72 °C 45 secs], 72 °C 5 min. Après vérification sur gel d'agarose 1 %, les produit d'amplification ont été purifiés avec le kit Gel and PCR Clean up (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Les fragments ont été séquencés avec l'amorce sens et anti-sens (par Eurofins). Les couples d'amorces suivant ont été utilisés : oMH074-oMH075, oMH076-oMH077, oMH078-oMH078, oMH080-oMH081, oMH082-oMH083, oMH084-oMH085, oMH086-oMH087, oMH086-oMH077.

6.4 Immunomarquage de H3K4me3

Le protocole est identique a celui décrit dans la section 5.5.

Primaire : H3K4me3 de lapin (Diagenode), dilution : 1/12000^e

Secondaire : Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (Molecular Probe), dilution : 1/1000^e

Les images ont été prises avec un microscope confocal LSM710 (Zeiss) et traitées avec Fiji. Pour la quantification du signal, le logiciel Fiji a été utilisé.

7 Ressources

RESSOURCES	SOURCE	IDENTIFIANT
Anticorps		
H3K4me3 (rabbit)	Diagenode	15310003[CS-003-100]
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit	Molecular probes	A21428
Anti-SIN-3 rabbit Q59861015	Haringer Lab	-
Anti-SIN-3 rabbit Q60131017	Haringer Lab	-
Souches de Bactérie		
OP50 (Résistante : streptomycine)	CGC	OP50
HT115 (Résistante : tétracycline et ampicilline L4440)	Ahringher laboratory-Gene Service Inc	N/A
HT115 ARNi kle-2 (C29E4.2)	Ahringher laboratory-Gene Service Inc	III-4M09
HT115 ARNi capg-2 (F55C5.4)	Ahringher laboratory-Gene Service Inc	V-8A10
HT115 ARNi hcp-6 (Y110A7A.1)	Ahringher laboratory-Gene Service Inc	I-9A14
HT115 ARNi smc-4 (F35G12.8)	Ahringher laboratory-Gene Service Inc	III-2E18
HT115 ARNi dpy-28 (Y39A1B.3)	Ahringher laboratory-Gene Service Inc	III-5B22

Partie V – Matériels et méthodes

HT115 ARNi capg-1 (F28D11.2)	Ahringher laboratory- Gene Service Inc	I-3D12
HT115 ARNi dpy-27 (R13G10.1)	Ahringher laboratory- Gene Service Inc	III-1L16
Enzymes et produits chimiques		
Tween® 20	Sigma Aldrich	P1379
H ₂ O Nuclease Free	Invitrogen	10977-035
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10X)	Dutscher	X0515
Fluoroshield™ with DAPI	Sigma Aldrich	F6057
Rnase AWAY	Sigma Aldrich	83931
DreamTaq	ThermoFisher	EP0701
Phusion	NEB	M0530S
Proteinase K	Sigma Aldrich	P4850
Triton X-100	Sigma Aldrich	T8787
Acridine Orange	Sigma Aldrich	A9231
Hoechst 33258	Sigma Aldrich	861405
Levamisole	Sigma Aldrich	L9756
Polylysine	Sigma Aldrich	P5899
IPTG	Sigma Aldrich	I6758
dNTP	Promega	U1330
Kit commerciaux		
RNeasy RNA Isolation Kit	Qiagen	74104
PicoPure™ RNA Isolation Kit	Life technology	12204-01
Nucleospin Gel and PCR clean-up	Macherey Nagel	740609
PrimerScript RT Master Mix	Takara	RR036Q
NucleoZOL	Macherey Nagel	740404-200
Trizol® Reagent	Invitrogen	15596-018
Transcriptor Universal cDNA Master	Roche	5893151001
FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)	Roche	4913914001
Données déposées		
Séquences des lignées d'accumulation de mutations <i>msh-6 polh-1</i>	(Roerink et al., 2014)	SRP011413
Séquences des lignées d'accumulation de mutations <i>set-2</i>	Cette étude	SRP111401
RNAseq de lignées germinales disséquées	Cette étude	-
<i>C. elegans</i> génome et annotation version WS254	WormBase	ftp://ftp.wormbase.org/pub/wormbase/releases/WS254/species/c_elegans/PRJNA13758/
Listes de gènes surexprimé sur le chromosome X chez les mutants <i>mes-2, mes-4, mes-2;mes-4</i>	(Gaydos et al., 2012)	
Listes de gènes surexprimé sur le chromosome X chez les mutants <i>mes-4</i>	(Tabuchi et al., 2014)	
Listes de gènes surexprimé sur le chromosome X chez les mutants <i>mes-4</i>	(Bender et al., 2006)	
Souches		
Tableau section 1		
Oligonucleotides		
Séquençage cDNA et gDNA des allèles tm1738 et n4337		
OVR447 (met-1 exon#2, Forward) GGTCCAAACGAGACGAAAGAC	Cette étude	oVR447

Partie V – Matériels et méthodes

OMH013 (met-1 exon#6, Reverse) AGAGGACAATGGGTTTCGATG	Cette étude	oMH013
OVR358 (met-1 exon#5, Forward) CTGCCGATCCTCCAGTATC	Cette étude	oVR358
OVR385 (met-1 exon#6, Reverse) GCCGATGTCTTCAAGATAGG	Cette étude	oVR379
OVR379 (met-1 exon#9, Reverse) GAACAGTTTCCACCAGTTCG	Cette étude	oVR385
OMH014 (met-1 exon#5/6, Reverse) TTTCTCTTGCTCGCTCCCAA	Cette étude	oMH014
RT-qPCR kle-2 et capg-1		
CB60F (cdc-42 exon#2, Forward) CTGCTGGACAGGAAGATTACG		CB60F
CB61R (cdc-42 exon#2, Reverse) CTCGGACATTCTCGAATGAAG		CB61R
CB62F (pmp-3 exon#2, Forward) GTTCCCGTGTTTCATCACTCAT		CB62F
CB63R (pmp-3 exon#3, Reverse) ACACCGTCGAGAAGCTGTAGA		CB63R
OMH092 (kle-2 exon#4, Forward) GAGAAAACGGACAGCTCGTGTG	Cette étude	
OMH093 (kle-2 exon#4/5, Reverse) CGTCATATTTCAGCTCCGAGGGT	Cette étude	
OMH106 (capg-1 exon#5, Forward) TCGAATTGGCCAGTAGATGC	Cette étude	
OMH107 (capg-1 exon#6, Reverse) ACTGCAACAAGTCGGCATTTC	Cette étude	
Séquençage hcp-6		
OMH074 (hcp-6 promoteur, Forward) ATAGTCAACCTCGATTGCTGGCTG	(Stear and Roth, 2002) (modifié)	oMH074
OMH075 (hcp-6 exon#4, Reverse) GAGGGCGAATAAGTCTTCCGTAAG	Cette étude	oMH075
OMH076 (hcp-6 exon#3, Forward) GATCGTTGGAGCGATTTACGGATC	Cette étude	oMH076
OMH077 (hcp-6 exon#6 Reverse) CTTTCTGGCATGTTTCAGTGACGTC	Cette étude	oMH077
OMH078 (hcp-6 exon#6, Forward) TGGCTTCACACCTTGATCTCGATG	Cette étude	oMH078
OMH079 (hcp-6 exon#8, Reverse) TCTTCATCGTGACCAACTCCAACC	Cette étude	oMH079
OMH080 (hcp-6 exon#8, Forward) GTTTCGGAATGACGCAAACT	Cette étude	oMH080
OMH081 (hcp-6 exon#9, Reverse) CACAGTTTTCTCCGCATCAACATG	Cette étude	oMH081
OMH082 (hcp-6 exon#9, Forward) CACTGAAATGCGCCTTAATCCTCC	Cette étude	oMH082
OMH083 (spd-5 exon#1, Reverse) TGATATGGGAGGAGCTGTGAAGGA	(Stear and Roth, 2002)	oMH083
OMH084 (hcp-6 exon#2, Forward) GGAGTTTCTGCTGCCAGTAGTTAT	Cette étude	oMH084
OMH085 (hcp-6 exon#4, Forward) TGTGGATAAACGTGGCGATA	Cette étude	oMH085
OMH086 (hcp-6 exon#5, Reverse) GAAATCCCGAAGCAAGAGAG	Cette étude	oMH086
OMH087 (hcp-6 exon#7, Reverse) GTCCATGTGAGATCCGATGAGT	Cette étude	oMH087
Genotypage des Bactéries		

Partie V – Matériels et méthodes

T7P TAATACGACTCACTATAGGG		
OVR445 GGTCGACGGTATCGATAAGC		
Logiciels		
SRA tool kit version 2.4.1	(Staff, 2011)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/docs/toolkitsoft/
FastQC	(Andrews, 2010)	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
Cutadapt 1.9.1	(Martin, 2011)	https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/index.html
BWAmem 0.7.5	(Li, 2013)	http://bio-bwa.sourceforge.net/
SAMtools 0.1.19	(Li et al., 2009)	http://samtools.sourceforge.net/
GATK 3.6	(McKenna et al., 2010)	https://software.broadinstitute.org/gatk/
Picard 1.140	(Broad Institute, 2018)	http://broadinstitute.github.io/picard/
Rtg-tools' 3.7	(Cleary et al., 2014)	https://www.realtimegenomics.com/products/rtg-tools
Tabix 0.2.6	(Li, 2011a)	http://www.htslib.org/doc/tabix.html
BCFtools 1.1	(Li, 2011b)	http://www.htslib.org/doc/bcftools.html
R 3.4.4	(R Development Core Team, 2009)	http://www.R-project.org/
DESeq2 1.16.1	(Love et al., 2014)	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html
Galaxy	(Afgan et al., 2016)	https://usegalaxy.org/
RNA-STAR	(Dobin and Gingeras, 2015)	https://github.com/alexdobin/STAR
htseq-count	(Anders et al., 2015)	https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.11.1/#
Gene set enrichment analysis	(Angeles-Albores et al., 2016, 2018)	https://wormbase.org/tools/enrichment/tea/tea.cgi
Fiji	(Schindelin et al., 2012)	https://imagej.net/Fiji
Équipements		
Rayon X	Precision X-ray	X-RAD 320
Dosimètre	PTW	UNIDOS E T10010
Sonde électronique de température	Ebro	EBI 310
Phase Lock Gel-Heavy	Brinkmann Instrument	955-15404-5
Borosilicate glass capillaries 1,0 mm O.D. x0,58 mm I.D.	Harvard Apparatus	GC100F-10

Partie V – Matériels et méthodes

Aiguille 30 G ^{1/2"} 0,3 x 13 mm	BD Microlance 3	304000
Tape Station 4200	Agilent	
Dropsense 96	Trinean	
Thermocycler CFX Connect	Biorad	
Fluorescence microscope AxioImager A2	Zeiss	
Microscope confocal LSM 710	Zeiss	

Bibliographie

- Accari, S.L., and Fisher, P.R. (2015). Emerging Roles of JmjC Domain-Containing Proteins. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **319**, 165–220.
- Adamietz, P., and Rudolph, A. (1984). ADP-ribosylation of nuclear proteins in vivo. Identification of histone H2B as a major acceptor for mono- and poly(ADP-ribose) in dimethyl sulfate-treated hepatoma AH 7974 cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 6841–6846.
- Adey, A., Morrison, H.G., Asan, X., Kitzman, J.O., Turner, E.H., Stackhouse, B., MacKenzie, A.P., Caruccio, N.C., Zhang, X., et al. (2010). Rapid, low-input, low-bias construction of shotgun fragment libraries by high-density in vitro transposition. *Genome Biol.* **11**, R119.
- Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Eberhard, C., et al. (2016). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W3–W10.
- Ahmed, S., and Hodgkin, J. (2000). MRT-2 checkpoint protein is required for germline immortality and telomere replication in *C. elegans*. *Nature* **403**, 159.
- Ahringer, J., and Gasser, S.M. (2018). Repressive Chromatin in *Caenorhabditis elegans*: Establishment, Composition, and Function. *Genetics* **208**, 491–511.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R.A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**, 49–55.
- Allshire, R.C., and Madhani, H.D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 229–244.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169.
- Andersen, E.C., and Horvitz, H.R. (2007). Two *C. elegans* histone methyltransferases repress *lin-3* EGF transcription to inhibit vulval development. *Development* **134**, 2991–2999.
- Andrews, S. (2010). FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data.
- Ang, Y.-S., Gaspar-Maia, A., Lemischka, I.R., and Bernstein, E. (2011). Stem cells and reprogramming: breaking the epigenetic barrier? *Trends Pharmacol. Sci.* **32**, 394–401.
- Angeles-Albores, D., N. Lee, R.Y., Chan, J., and Sternberg, P.W. (2016). Tissue enrichment analysis for *C. elegans* genomics. *BMC Bioinformatics* **17**, 366.
- Angeles-Albores, D., Lee, R.Y.N., Chan, J., and Sternberg, P.W. (2018). Two new functions in the WormBase Enrichment Suite. *MicroPublication Biol.*
- Arico, J.K., Katz, D.J., Vlag, J. van der, and Kelly, W.G. (2011). Epigenetic Patterns Maintained in Early *Caenorhabditis elegans* Embryos Can Be Established by Gene Activity in the Parental Germ Cells. *PLOS Genet.* **7**, e1001391.
- Ashe, A., Sapetschnig, A., Weick, E.-M., Mitchell, J., Bagijn, M.P., Cording, A.C., Doebley, A.-L., Goldstein, L.D., Lehrbach, N.J., Le Pen, J., et al. (2012). piRNAs Can Trigger a Multigenerational Epigenetic Memory in the Germline of *C. elegans*. *Cell* **150**, 88–99.

Bibliographie

- Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C.K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J.S., Daburon, V., Miller, K.M., Jackson, S.P., et al. (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 366–374.
- Ayrappetov, M.K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y., and Price, B.D. (2014). DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9169–9174.
- Bacher, C.P., Guggiari, M., Brors, B., Augui, S., Clerc, P., Avner, P., Eils, R., and Heard, E. (2006). Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat. Cell Biol.* **8**, 293–299.
- Bagijn, M.P., Goldstein, L.D., Sapetschnig, A., Weick, E.-M., Bouasker, S., Lehrbach, N.J., Simard, M.J., and Miska, E.A. (2012). Function, targets and evolution of *Caenorhabditis elegans* piRNAs. *Science* **337**, 574–578.
- Baldi, S. (2019). Nucleosome positioning and spacing: from genome-wide maps to single arrays. *Essays Biochem.* **63**, 5–14.
- Ball, A.R., Schmiesing, J.A., Zhou, C., Gregson, H.C., Okada, Y., Doi, T., and Yokomori, K. (2002). Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5769–5781.
- Banks, C.A.S., Thornton, J.L., Eubanks, C.G., Adams, M.K., Miah, S., Boanca, G., Liu, X., Katt, M.L., Parmely, T.J., Florens, L., et al. (2018). A Structured Workflow for Mapping Human Sin3 Histone Deacetylase Complex Interactions Using Halo-MudPIT Affinity-Purification Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **17**, 1432–1447.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395.
- Barnes, T.M., Kohara, Y., Coulson, A., and Hekimi, S. (1995). Meiotic recombination, noncoding DNA and genomic organization in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **141**, 159–179.
- Batista, P.J., Ruby, G., Claycomb, J.M., Chiang, R., Fahlgren, N., Kasschau, K.D., Chaves, D.A., Gu, W., Vasale, J.J., Duan, S., et al. (2008). PRG-1 and 21U-RNAs interact to form the piRNA complex required for fertility in *C. elegans*. *Mol. Cell* **31**, 67–78.
- Bauer, D.L.V., Marie, R., Rasmussen, K.H., Kristensen, A., and Mir, K.U. (2012). DNA catenation maintains structure of human metaphase chromosomes. *Nucleic Acids Res.* **40**, 11428–11434.
- Bäurle, I. (2018). Can't remember to forget you: Chromatin-based priming of somatic stress responses. *Semin. Cell Dev. Biol.* **83**, 133–139.
- Bean, C.J., Schaner, C.E., and Kelly, W.G. (2004). Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* **36**, 100–105.
- Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Mol. Cell* **33**, 1–13.
- Beilharz, T.H., Harrison, P.F., Miles, D.M., See, M.M., Le, U.M.M., Kalanon, M., Curtis, M.J., Hasan, Q., Saksook, J., Margaritis, T., et al. (2017). Coordination of Cell Cycle Progression and Mitotic Spindle Assembly Involves Histone H3 Lysine 4 Methylation by Set1/COMPASS. *Genetics* **205**, 185–199.
- Bellush, J.M., and Whitehouse, I. (2017). DNA replication through a chromatin environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **372**.

Bibliographie

- Beltran, T., Barroso, C., Birkle, T.Y., Stevens, L., Schwartz, H.T., Sternberg, P.W., Fradin, H., Gunsalus, K., Piano, F., Sharma, G., et al. (2019). Comparative Epigenomics Reveals that RNA Polymerase II Pausing and Chromatin Domain Organization Control Nematode piRNA Biogenesis. *Dev. Cell* 48, 793-810.e6.
- Bembenek, J.N., White, J.G., and Zheng, Y. (2010). A Role for Separase in the Regulation of RAB-11-Positive Vesicles at the Cleavage Furrow and Midbody. *Curr. Biol.* 20, 259–264.
- Bembenek, J.N., Verbrugghe, K.J.C., Khanikar, J., Csankovszki, G., and Chan, R.C. (2013). Condensin and the spindle midzone prevent cytokinesis failure induced by chromatin bridges in *C. elegans* embryos. *Curr. Biol. CB* 23, 937–946.
- Bender, L.B., Cao, R., Zhang, Y., and Strome, S. (2004). The MES-2/MES-3/MES-6 complex and regulation of histone H3 methylation in *C. elegans*. *Curr. Biol. CB* 14, 1639–1643.
- Bender, L.B., Suh, J., Carroll, C.R., Fong, Y., Fingerman, I.M., Briggs, S.D., Cao, R., Zhang, Y., Reinke, V., and Strome, S. (2006). MES-4: an autosome-associated histone methyltransferase that participates in silencing the X chromosomes in the *C. elegans* germ line. *Development* 133, 3907–3917.
- Berkseth, M., Ikegami, K., Arur, S., Lieb, J.D., and Zarkower, D. (2013). TRA-1 ChIP-seq reveals regulators of sexual differentiation and multilevel feedback in nematode sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 16033–16038.
- Bernardi, G., Olofsson, B., Filipski, J., Zerial, M., Salinas, J., Cuny, G., Meunier-Rotival, M., and Rodier, F. (1985). The mosaic genome of warm-blooded vertebrates. *Science* 228, 953–958.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., Gingeras, T.R., et al. (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120, 169–181.
- Bessler, J.B., Andersen, E.C., and Villeneuve, A.M. (2010a). Differential Localization and Independent Acquisition of the H3K9me2 and H3K9me3 Chromatin Modifications in the *Caenorhabditis elegans* Adult Germ Line. *PLOS Genet.* 6, e1000830.
- Bessler, J.B., Andersen, E.C., and Villeneuve, A.M. (2010b). Differential Localization and Independent Acquisition of the H3K9me2 and H3K9me3 Chromatin Modifications in the *Caenorhabditis elegans* Adult Germ Line. *PLoS Genet.* 6.
- Beurton, F., Stempor, P., Caron, M., Appert, A., Dong, Y., Chen, R., Cluet, D., Coute, Y., Herbette, M., Huang, N., et al. (2018). Physical and functional interaction between SET1/COMPASS complex component CFP-1 and a Sin3 HDAC complex. *BioRxiv* 436147.
- Bhalla, N., and Dernburg, A.F. (2005). A Conserved Checkpoint Monitors Meiotic Chromosome Synapsis in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 310, 1683–1686.
- Boerckel, J., Walker, D., and Ahmed, S. (2007). The *Caenorhabditis elegans* Rad17 Homolog HPR-17 Is Required for Telomere Replication. *Genetics* 176, 703–709.
- Bohr, T., Nelson, C.R., Klee, E., and Bhalla, N. (2015). Spindle assembly checkpoint proteins regulate and monitor meiotic synapsis in *C. elegans*. *J Cell Biol* 211, 233–242.
- Bohr, T., Ashley, G., Eggleston, E., Firestone, K., and Bhalla, N. (2016). Synaptonemal Complex Components Are Required for Meiotic Checkpoint Function in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 204, 987–997.
- Bonev, B., and Cavalli, G. (2016). Organization and function of the 3D genome. *Nat. Rev. Genet.* 17, 661–678.

Bibliographie

- Boulton, S.J., Martin, J.S., Polanowska, J., Hill, D.E., Gartner, A., and Vidal, M. (2004). BRCA1/BARD1 Orthologs Required for DNA Repair in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 14, 33–39.
- Brejci, K., Bian, Q., Uzawa, S., Wheeler, B.S., Anderson, E.C., King, D.S., Kranzusch, P.J., Preston, C.G., and Meyer, B.J. (2017). Dynamic Control of X-Chromosome Conformation and Repression by a Histone H4K20 Demethylase. *Cell* 171, 85–102.e23.
- Brenner, S. (1974). The Genetics of CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* 77, 71–94.
- Broad Institute (2018). Picard Tools.
- Brown, D.A., Di Cerbo, V., Feldmann, A., Ahn, J., Ito, S., Blackledge, N.P., Nakayama, M., McClellan, M., Dimitrova, E., Turberfield, A.H., et al. (2017). The SET1 Complex Selects Actively Transcribed Target Genes via Multivalent Interaction with CpG Island Chromatin. *Cell Rep.* 20, 2313–2327.
- Buchwitz, B.J., Ahmad, K., Moore, L.L., Roth, M.B., and Henikoff, S. (1999). Cell division: A histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature* 401, 547–548.
- Buckley, B.A., Burkhardt, K.B., Gu, S.G., Spracklin, G., Kershner, A., Fritz, H., Kimble, J., Fire, A., and Kennedy, S. (2012). A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality. *Nature* 489, 447–451.
- Bulger, M., and Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 144, 327–339.
- Burgess, R.C., Burman, B., Kruhlak, M., and Misteli, T. (2014). Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell Rep.* 9, 1703–1717.
- Burkhardt, K.B., Guang, S., Buckley, B.A., Wong, L., Bochner, A.F., and Kennedy, S. (2011). A Pre-mRNA–Associating Factor Links Endogenous siRNAs to Chromatin Regulation. *PLOS Genet.* 7, e1002249.
- C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012–2018.
- Cai, Y., Jin, J., Swanson, S.K., Cole, M.D., Choi, S.H., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (2010). Subunit composition and substrate specificity of a MOF-containing histone acetyltransferase distinct from the male-specific lethal (MSL) complex. *J. Biol. Chem.* 285, 4268–4272.
- Campbell, S., Ismail, I.H., Young, L.C., Poirier, G.G., and Hendzel, M.J. (2013). Polycomb repressive complex 2 contributes to DNA double-strand break repair. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 2675–2683.
- Capowski, E.E., Martin, P., Garvin, C., and Strome, S. (1991a). Identification of grandchildless loci whose products are required for normal germ-line development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129, 1061–1072.
- Capowski, E.E., Martin, P., Garvin, C., and Strome, S. (1991b). Identification of grandchildless loci whose products are required for normal germ-line development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129, 1061–1072.
- Carlone, D.L., and Skalknik, D.G. (2001). CpG binding protein is crucial for early embryonic development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7601–7606.
- Carlone, D.L., Hart, S.R.L., Ladd, P.D., and Skalknik, D.G. (2002). Cloning and characterization of the gene encoding the mouse homologue of CpG binding protein. *Gene* 295, 71–77.

Bibliographie

- Carlton, J.G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M., and Martin-Serrano, J. (2012). ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Science* 336, 220–225.
- Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.-J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., et al. (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123, 581–592.
- Carvalho, S., Vitor, A.C., Sridhara, S.C., Martins, F.B., Raposo, A.C., Desterro, J.M., Ferreira, J., and de Almeida, S.F. (2014). SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint. *ELife* 3, e02482.
- Cecere, G., Hoersch, S., O'Keeffe, S., Sachidanandam, R., and Grishok, A. (2014). Global effects of the CSR-1 RNA interference pathway on transcriptional landscape. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 358–365.
- Champoux, J.J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369–413.
- Chan, R.C., Severson, A.F., and Meyer, B.J. (2004). Condensin restructures chromosomes in preparation for meiotic divisions. *J. Cell Biol.* 167, 613–625.
- Chao, L.F.-I., Singh, M., Thompson, J., Iii, J.R.Y., and Hagstrom, K.A. (2017). An SMC-like protein binds and regulates *Caenorhabditis elegans* condensins. *PLOS Genet.* 13, e1006614.
- Chen, Q.Y., Costa, M., and Sun, H. (2015). Structure and function of histone acetyltransferase MOF. *AIMS Biophys.* 2, 555–569.
- Chen, R.A.-J., Stempor, P., Down, T.A., Zeiser, E., Feuer, S.K., and Ahringer, J. (2014). Extreme HOT regions are CpG-dense promoters in *C. elegans* and humans. *Genome Res.* 24, 1138–1146.
- Cheung, I., Schertzer, M., Rose, A., and Lansdorp, P.M. (2002). Disruption of *dog-1* in *Caenorhabditis elegans* triggers deletions upstream of guanine-rich DNA. *Nat. Genet.* 31, 405–409.
- Chiang, Y.-C., Park, I.-Y., Terzo, E.A., Tripathi, D.N., Mason, F.M., Fahey, C.C., Karki, M., Shuster, C.B., Sohn, B.-H., Chowdhury, P., et al. (2018). SETD2 Haploinsufficiency for Microtubule Methylation Is an Early Driver of Genomic Instability in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 78, 3135–3146.
- Chin, G.M., and Villeneuve, A.M. (2001). *C. elegans* mre-11 is required for meiotic recombination and DNA repair but is dispensable for the meiotic G2 DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* 15, 522–534.
- Cho, H.-S., Shimazu, T., Toyokawa, G., Daigo, Y., Maehara, Y., Hayami, S., Ito, A., Masuda, K., Ikawa, N., Field, H.I., et al. (2012). Enhanced HSP70 lysine methylation promotes proliferation of cancer cells through activation of Aurora kinase B. *Nat. Commun.* 3, 1072.
- Choy, S.W., Wong, Y.M., Ho, S.H., and Chow, K.L. (2007). *C. elegans* SIN-3 and its associated HDAC corepressor complex act as mediators of male sensory ray development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 802–807.
- Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A.C., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K.H., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). RBP2 Belongs to a Family of Demethylases, Specific for Tri- and Dimethylated Lysine 4 on Histone 3. *Cell* 128, 1063–1076.
- Cieniewicz, A.M., Moreland, L., Ringel, A.E., Mackintosh, S.G., Raman, A., Gilbert, T.M., Wolberger, C., Tackett, A.J., and Taverna, S.D. (2014). The bromodomain of Gcn5 regulates site specificity of lysine acetylation on histone H3. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 13, 2896–2910.

Bibliographie

- Claycomb, J.M. (2012). *Caenorhabditis elegans* small RNA pathways make their mark on chromatin. *DNA Cell Biol.* 31 Suppl 1, S17-33.
- Claycomb, J.M., Batista, P.J., Pang, K.M., Gu, W., Vasale, J.J., Wolfswinkel, J.C. van, Chaves, D.A., Shirayama, M., Mitani, S., Ketting, R.F., et al. (2009). The Argonaute CSR-1 and Its 22G-RNA Cofactors Are Required for Holocentric Chromosome Segregation. *Cell* 139, 123–134.
- Cleary, J.G., Braithwaite, R., Gaastra, K., Hilbush, B.S., Inglis, S., Irvine, S.A., Jackson, A., Littin, R., Nohzadeh-Malakshah, S., Rathod, M., et al. (2014). Joint Variant and De Novo Mutation Identification on Pedigrees from High-Throughput Sequencing Data. *J. Comput. Biol.* 21, 405–419.
- Clouaire, T., Webb, S., Skene, P., Illingworth, R., Kerr, A., Andrews, R., Lee, J.-H., Skalnik, D., and Bird, A. (2012). Cfp1 integrates both CpG content and gene activity for accurate H3K4me3 deposition in embryonic stem cells. *Genes Dev.* 26, 1714–1728.
- Clouaire, T., Webb, S., and Bird, A. (2014). Cfp1 is required for gene expression-dependent H3K4 trimethylation and H3K9 acetylation in embryonic stem cells. *Genome Biol.* 15.
- Colaiácovo, M.P., MacQueen, A.J., Martinez-Perez, E., McDonald, K., Adamo, A., La Volpe, A., and Villeneuve, A.M. (2003). Synaptonemal Complex Assembly in *C. elegans* Is Dispensable for Loading Strand-Exchange Proteins but Critical for Proper Completion of Recombination. *Dev. Cell* 5, 463–474.
- Collette, K.S., Petty, E.L., Golenberg, N., Bembenek, J.N., and Csankovszki, G. (2011). Different roles for Aurora B in condensin targeting during mitosis and meiosis. *J Cell Sci* 124, 3684–3694.
- Crane, E., Bian, Q., McCord, R.P., Lajoie, B.R., Wheeler, B.S., Ralston, E.J., Uzawa, S., Dekker, J., and Meyer, B.J. (2015). Condensin-Driven Remodeling of X-Chromosome Topology during Dosage Compensation. *Nature* 523, 240–244.
- Cremer, T., and Cremer, M. (2010). Chromosome Territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003889.
- Crittenden, S.L., Troemel, E.R., Evans, T.C., and Kimble, J. (1994). GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germ line. *Development* 120, 2901–2911.
- Crittenden, S.L., Eckmann, C.R., Wang, L., Bernstein, D.S., Wickens, M., and Kimble, J. (2003). Regulation of the mitosis/meiosis decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 358, 1359–1362.
- Crump, N.T., Hazzalin, C.A., Bowers, E.M., Alani, R.M., Cole, P.A., and Mahadevan, L.C. (2011). Dynamic acetylation of all lysine-4 trimethylated histone H3 is evolutionarily conserved and mediated by p300/CBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7814.
- Csankovszki, G., Collette, K., Spahl, K., Carey, J., Snyder, M., Petty, E., Patel, U., Tabuchi, T., Liu, H., McLeod, I., et al. (2009). Three Distinct Condensin Complexes Control *C. elegans* Chromosome Dynamics. *Curr. Biol.* 19, 9–19.
- Czech, B., and Hannon, G.J. (2016). One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends Biochem. Sci.* 41, 324–337.
- D'Ambrosio, C., Schmidt, C.K., Katou, Y., Kelly, G., Itoh, T., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2008). Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. *Genes Dev.* 22, 2215–2227.
- Daniel, J.A., and Nussenzweig, A. (2012). Roles for histone H3K4 methyltransferase activities during immunoglobulin class switch recombination. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 733–738.

Bibliographie

- Das, P.P., Bagijn, M.P., Goldstein, L.D., Woolford, J.R., Lehrbach, N.J., Sapetschnig, A., Buhecha, H.R., Gilchrist, M.J., Howe, K.L., Stark, R., et al. (2008). Piwi and piRNAs Act Upstream of an Endogenous siRNA Pathway to suppress Tc3 Transposon Mobility in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Mol. Cell* 31, 79–90.
- Degtyareva, N.P., Greenwell, P., Hofmann, E.R., Hengartner, M.O., Zhang, L., Culotti, J.G., and Petes, T.D. (2002). *Caenorhabditis elegans* DNA mismatch repair gene msh-2 is required for microsatellite stability and maintenance of genome integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2158–2163.
- Delaney, K., Mailler, J., Wenda, J.M., Gabus, C., and Steiner, F.A. (2018). Differential Expression of Histone H3.3 Genes and Their Role in Modulating Temperature Stress Response in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 209, 551–565.
- DeLange, R.J., Hooper, J.A., and Smith, E.L. (1973). Histone 3. 3. Sequence studies on the cyanogen bromide peptides; complete amino acid sequence of calf thymus histone 3. *J. Biol. Chem.* 248, 3261–3274.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997). Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science* 278, 680–686.
- Dernburg, A.F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., and Villeneuve, A.M. (1998a). Meiotic Recombination in *C. elegans* Initiates by a Conserved Mechanism and Is Dispensable for Homologous Chromosome Synapsis. *Cell* 94, 387–398.
- Dernburg, A.F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., and Villeneuve, A.M. (1998b). Meiotic Recombination in *C. elegans* Initiates by a Conserved Mechanism and Is Dispensable for Homologous Chromosome Synapsis. *Cell* 94, 387–398.
- Derry, W.B., Putzke, A.P., and Rothman, J.H. (2001). *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* 294, 591–595.
- Dickinson, D.J., and Goldstein, B. (2016). CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering. *Genetics* 202, 885–901.
- Ding, Y., Avramova, Z., and Fromm, M. (2011). Two distinct roles of ARABIDOPSIS HOMOLOG OF TRITHORAX1 (ATX1) at promoters and within transcribed regions of ATX1-regulated genes. *Plant Cell* 23, 350–363.
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376–380.
- Dixon, J.R., Gorkin, D.U., and Ren, B. (2016). Chromatin Domains: the Unit of Chromosome Organization. *Mol. Cell* 62, 668–680.
- Dobin, A., and Gingeras, T.R. (2015). Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Curr. Protoc. Bioinforma.* Ed. Board Andreas Baxeavanis A1 51, 11.14.1–11.14.19.
- Doitsidou, M., Jarriault, S., and Poole, R.J. (2016). Next-Generation Sequencing-Based Approaches for Mutation Mapping and Identification in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 204, 451–474.
- Dong, P., Tu, X., Chu, P.-Y., Lü, P., Zhu, N., Grierson, D., Du, B., Li, P., and Zhong, S. (2017). 3D Chromatin Architecture of Large Plant Genomes Determined by Local A/B Compartments. *Mol. Plant* 10, 1497–1509.

Bibliographie

- Dowen, J.M., Bilodeau, S., Orlando, D.A., Hübner, M.R., Abraham, B.J., Spector, D.L., and Young, R.A. (2013). Multiple structural maintenance of chromosome complexes at transcriptional regulatory elements. *Stem Cell Rep.* 1, 371–378.
- Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A.-J., Côté, V., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., Yang, X.-J., and Côté, J. (2006). ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol. Cell* 21, 51–64.
- Dujon, B., Alexandraki, D., André, B., Ansorge, W., Baladron, V., Ballesta, J.P., Banrevi, A., Bolle, P.A., Bolotin-Fukuhara, M., Bossier, P., et al. (1994). Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature* 369, 371–378.
- D'Urso, A., and Brickner, J.H. (2017). Epigenetic Transcriptional Memory. *Curr. Genet.* 63, 435–439.
- D'Urso, A., Takahashi, Y., Xiong, B., Marone, J., Coukos, R., Randise-Hinchliff, C., Wang, J.-P., Shilatifard, A., and Brickner, J.H. (2016). Set1/COMPASS and Mediator are repurposed to promote epigenetic transcriptional memory. *ELife* 5, e16691.
- Eberharter, A., and Becker, P.B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep.* 3, 224–229.
- Eckmann, C.R., Crittenden, S.L., Suh, N., and Kimble, J. (2004). GLD-3 and control of the mitosis/meiosis decision in the germline of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 168, 147–160.
- Ernst, J., and Kellis, M. (2010). Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat. Biotechnol.* 28, 817–825.
- Evans, K.J., Huang, N., Stempor, P., Chesney, M.A., Down, T.A., and Ahringer, J. (2016). Stable *Caenorhabditis elegans* chromatin domains separate broadly expressed and developmentally regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E7020–E7029.
- Fabrizio, P., Garvis, S., and Palladino, F. (2019). Histone Methylation and Memory of Environmental Stress. *Cells* 8, 339.
- Faucher, D., and Wellinger, R.J. (2010). Methylated H3K4, a transcription-associated histone modification, is involved in the DNA damage response pathway. *PLoS Genet.* 6.
- Felsenfeld, G. (2014). A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Fisher, K., Southall, S.M., Wilson, J.R., and Poulin, G.B. (2010). Methylation and demethylation activities of a *C. elegans* MLL-like complex attenuate RAS signalling. *Dev. Biol.* 341, 142–153.
- Flemming, W. (1965). CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF THE CELL AND ITS VITAL PROCESSES. *J. Cell Biol.* 25, 3–69.
- Fong, Y., Bender, L., Wang, W., and Strome, S. (2002). Regulation of the Different Chromatin States of Autosomes and X Chromosomes in the Germ Line of *C. elegans*. *Science* 296, 2235–2238.
- Frézal, L., Demoinet, E., Braendle, C., Miska, E., and Félix, M.-A. (2018). Natural Genetic Variation in a Multigenerational Phenotype in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 28, 2588-2596.e8.

Bibliographie

- Frøkjær-Jensen, C., Wayne Davis, M., Hopkins, C.E., Newman, B.J., Thummel, J.M., Olesen, S.-P., Grunnet, M., and Jorgensen, E.M. (2008). Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* **40**, 1375–1383.
- Fujita, M., Takasaki, T., Nakajima, N., Kawano, T., Shimura, Y., and Sakamoto, H. (2002). MRG-1, a mortality factor-related chromodomain protein, is required maternally for primordial germ cells to initiate mitotic proliferation in *C. elegans*. *Mech. Dev.* **114**, 61–69.
- Furuhashi, H., Takasaki, T., Rechtsteiner, A., Li, T., Kimura, H., Checchi, P.M., Strome, S., and Kelly, W.G. (2010). Trans-generational epigenetic regulation of *C. elegans* primordial germ cells. *Epigenetics Chromatin* **3**, 15.
- Fussner, E., Ching, R.W., and Bazett-Jones, D.P. (2011). Living without 30nm chromatin fibers. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 1–6.
- Gabdanak, I., Ramakrishnan, S., Villeneuve, A.M., and Fire, A.Z. (2016). A streamlined tethered chromosome conformation capture protocol. *BMC Genomics* **17**.
- Gajan, A., Barnes, V.L., Liu, M., Saha, N., and Pile, L.A. (2016). The histone demethylase dKDM5/LID interacts with the SIN3 histone deacetylase complex and shares functional similarities with SIN3. *Epigenetics Chromatin* **9**, 4.
- Ganji, M., Shaltiel, I.A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C.H., and Dekker, C. (2018). Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin. *Science* **360**, 102–105.
- Gao, J., Kim, H.-M., Elia, A.E., Elledge, S.J., and Colaiácovo, M.P. (2015). NatB Domain-Containing CRA-1 Antagonizes Hydrolase ACER-1 Linking Acetyl-CoA Metabolism to the Initiation of Recombination during *C. elegans* Meiosis. *PLoS Genet.* **11**.
- Garrigues, J.M., Sidoli, S., Garcia, B.A., and Strome, S. (2015). Defining heterochromatin in *C. elegans* through genome-wide analysis of the heterochromatin protein 1 homolog HPL-2. *Genome Res.* **25**, 76–88.
- Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., and Hengartner, M.O. (2000). A Conserved Checkpoint Pathway Mediates DNA Damage–Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *C. elegans*. *Mol. Cell* **5**, 435–443.
- Garvin, C., Holdeman, R., and Strome, S. (1998). The Phenotype of *mes-2*, *mes-3*, *mes-4* and *mes-6*, Maternal-Effect Genes Required for Survival of the Germline in *Caenorhabditis elegans*, Is Sensitive to Chromosome Dosage. *Genetics* **148**, 167–185.
- Gary, J.D., and Clarke, S. (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **61**, 65–131.
- Gaydos, L., Rechtsteiner, A., Egelhofer, T., Carroll, C., and Strome, S. (2012). Antagonism between MES-4 and Polycomb Repressive Complex 2 Promotes Appropriate Gene Expression in *C. elegans* Germ Cells. *Cell Rep.* **2**, 1169–1177.
- Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, J.-M., and Ellenberg, J. (2006). Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in live cells. *Curr. Biol. CB* **16**, 333–344.
- Gibcus, J.H., and Dekker, J. (2013). The Hierarchy of the 3D Genome. *Mol. Cell* **49**, 773–782.
- Gibcus, J.H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M.T., Xie, L., Paulson, J.R., Earnshaw, W.C., et al. (2018). A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* **359**, eaao6135.

Bibliographie

- González-Aguilera, C., Ikegami, K., Ayuso, C., de Luis, A., Íñiguez, M., Cabello, J., Lieb, J.D., and Askjaer, P. (2014). Genome-wide analysis links emerlin to neuromuscular junction activity in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* 15, R21.
- Grbić, M., Van Leeuwen, T., Clark, R.M., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbić, V., Osborne, E.J., Dermauw, W., Ngoc, P.C.T., Ortego, F., et al. (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* 479, 487–492.
- Green, L.C., Kalitsis, P., Chang, T.M., Cipetic, M., Kim, J.H., Marshall, O., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., Vagnarelli, P., Samejima, K., et al. (2012). Contrasting roles of condensin I and condensin II in mitotic chromosome formation. *J. Cell Sci.* 125, 1591–1604.
- Greer, E.L., Beese-Sims, S.E., Brookes, E., Spadafora, R., Zhu, Y., Rothbart, S.B., Aristizábal-Corrales, D., Chen, S., Badeaux, A.I., Jin, Q., et al. (2014). A Histone Methylation Network Regulates Transgenerational Epigenetic Memory in *C. elegans*. *Cell Rep.* 7, 113–126.
- Greer, E.L., Blanco, M.A., Gu, L., Sendinc, E., Liu, J., Aristizábal-Corrales, D., Hsu, C.-H., Aravind, L., He, C., and Shi, Y. (2015). DNA Methylation on N6-Adenine in *C. elegans*. *Cell* 161, 868–878.
- Grigoryev, S.A., and Woodcock, C.L. (2012). Chromatin organization - the 30 nm fiber. *Exp. Cell Res.* 318, 1448–1455.
- Gu, S.G., and Fire, A. (2010). Partitioning the *C. elegans* genome by nucleosome modification, occupancy, and positioning. *Chromosoma* 119, 73–87.
- Gu, W., Shirayama, M., Conte, D., Jr, Vasale, J., Batista, P.J., Claycomb, J.M., Moresco, J.J., Youngman, E., Keys, J., et al. (2009). Distinct Argonaute-mediated 22G-RNA pathways direct genome surveillance in the *C. elegans* germline. *Mol. Cell* 36, 231.
- Guang, S., Bochner, A.F., Burkhart, K.B., Burton, N., Pavelec, D.M., and Kennedy, S. (2010). Small regulatory RNAs inhibit RNA polymerase II during the elongation phase of transcription. *Nature* 465, 1097–1101.
- Guccione, E., Bassi, C., Casadio, F., Martinato, F., Cesaroni, M., Schuchlautz, H., Lüscher, B., and Amati, B. (2007). Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* 449, 933–937.
- Guillemette, B., Drogaris, P., Lin, H.-H.S., Armstrong, H., Hiragami-Hamada, K., Imhof, A., Bonneil, É., Thibault, P., Verreault, A., and Festenstein, R.J. (2011). H3 Lysine 4 Is Acetylated at Active Gene Promoters and Is Regulated by H3 Lysine 4 Methylation. *PLOS Genet.* 7, e1001354.
- Gul, I.S., Hulpiau, P., Saeys, Y., and van Roy, F. (2017). Metazoan evolution of the armadillo repeat superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 525–541.
- Gumienny, T.L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H.R., and Hengartner, M.O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 126, 1011–1022.
- Gushchanskaia, E., Esse, R., Ma, Q., Lau, N., and Grishok, A. (2018). The interplay between small RNA pathways shapes chromatin landscape in *C. elegans*. *BioRxiv* 320713.
- Hacker, K.E., Fahey, C.C., Shinsky, S.A., Chiang, Y.-C.J., DiFiore, J.V., Jha, D.K., Vo, A.H., Shavit, J.A., Davis, I.J., Strahl, B.D., et al. (2016). Structure/Function Analysis of Recurrent Mutations in SETD2 Protein Reveals a Critical and Conserved Role for a SET Domain Residue in Maintaining Protein Stability and Histone H3 Lys-36 Trimethylation. *J. Biol. Chem.* 291, 21283–21295.

Bibliographie

- Hagstrom, K.A. (2002). *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev.* 16, 729–742.
- Hagstrom, K.A., Holmes, V.F., Cozzarelli, N.R., and Meyer, B.J. (2002). *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev.* 16, 729–742.
- Hajduskova, M., Baytek, G., Kolundzic, E., Gosdschan, A., Kazmierczak, M., Ofenbauer, A., Rosal, M.L.B. del, Herzog, S., Fatima, N. ul, Mertins, P., et al. (2019). MRG-1/MRG15 Is a Barrier for Germ Cell to Neuron Reprogramming in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 211, 121–139.
- Hancks, D.C., and Kazazian, H.H. (2016). Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob. DNA* 7.
- Hansen, D., Wilson-Berry, L., Dang, T., and Schedl, T. (2004a). Control of the proliferation versus meiotic development decision in the *C. elegans* germline through regulation of GLD-1 protein accumulation. *Dev. Camb. Engl.* 131, 93–104.
- Hansen, D., Albert Hubbard, E.J., and Schedl, T. (2004b). Multi-pathway control of the proliferation versus meiotic development decision in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Dev. Biol.* 268, 342–357.
- Harikumar, A., and Meshorer, E. (2015). Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. *EMBO Rep.* 16, 1609–1619.
- Hauer, M.H., and Gasser, S.M. (2017). Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes Dev.* 31, 2204–2221.
- Hazelbaker, D.Z., Marquardt, S., Wlotzka, W., and Buratowski, S. (2013). Kinetic Competition between RNA Polymerase II and Sen1-dependent Transcription Termination. *Mol. Cell* 49, 55–66.
- Heestand, B., Simon, M., Frenk, S., Titov, D., and Ahmed, S. (2018). Transgenerational Sterility of Piwi Mutants Represents a Dynamic Form of Adult Reproductive Diapause. *Cell Rep.* 23, 156–171.
- Heger, P., Marin, B., and Schierenberg, E. (2009). Loss of the insulator protein CTCF during nematode evolution. *BMC Mol. Biol.* 10, 84.
- Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A., et al. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 311–318.
- Henderson, S.T., Gao, D., Lambie, E.J., and Kimble, J. (1994). lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Dev. Camb. Engl.* 120, 2913–2924.
- Herbette, M., Mercier, M.G., Michal, F., Cluet, D., Burny, C., Yvert, G., Robert, V.J., and Palladino, F. (2017). The *C. elegans* SET-2/SET1 histone H3 Lys4 (H3K4) methyltransferase preserves genome stability in the germline. *DNA Repair* 57, 139–150.
- Herold, M., Bartkuhn, M., and Renkawitz, R. (2012). CTCF: insights into insulator function during development. *Development* 139, 1045–1057.
- Hillers, K.J., and Villeneuve, A.M. (2003). Chromosome-Wide Control of Meiotic Crossing over in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 13, 1641–1647.
- Hirano, T. (2016). Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. *Cell* 164, 847–857.

Bibliographie

- Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J. Cell Sci.* *117*, 6435–6445.
- Ho, J.W.K., Jung, Y.L., Liu, T., Alver, B.H., Lee, S., Ikegami, K., Sohn, K.-A., Minoda, A., Tolstorukov, M.Y., Appert, A., et al. (2014). Comparative analysis of metazoan chromatin organization. *Nature* *512*, 449–452.
- Hodawadekar, S.C., and Marmorstein, R. (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* *26*, 5528–5540.
- Hofmann, E.R., Milstein, S., Boulton, S.J., Ye, M., Hofmann, J.J., Stergiou, L., Gartner, A., Vidal, M., and Hengartner, M.O. (2002). *Caenorhabditis elegans* HUS-1 is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and EGL-1-mediated apoptosis. *Curr. Biol. CB* *12*, 1908–1918.
- Hong, Y., Sonnevile, R., Agostinho, A., Meier, B., Wang, B., Blow, J.J., and Gartner, A. (2016). The SMC-5/6 Complex and the HIM-6 (BLM) Helicase Synergistically Promote Meiotic Recombination Intermediate Processing and Chromosome Maturation during *Caenorhabditis elegans* Meiosis. *PLoS Genet.* *12*, e1005872.
- Hontelez, S., van Kruijsbergen, I., Georgiou, G., van Heeringen, S.J., Bogdanovic, O., Lister, R., and Veenstra, G.J.C. (2015). Embryonic transcription is controlled by maternally defined chromatin state. *Nat. Commun.* *6*, 10148.
- Howe, F.S., Fischl, H., Murray, S.C., and Mellor, J. (2017). Is H3K4me3 instructive for transcription activation? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *39*, 1–12.
- Hu, C.-W., Chen, J.-L., Hsu, Y.-W., Yen, C.-C., and Chao, M.-R. (2015). Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC–MS/MS: first evidence of DNA methylation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* *465*, 39–47.
- Huang, J., Marco, E., Pinello, L., and Yuan, G.-C. (2015). Predicting chromatin organization using histone marks. *Genome Biol.* *16*, 162.
- Hymes, J., Fleischhauer, K., and Wolf, B. (1995). Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem. Mol. Med.* *56*, 76–83.
- Iberg-Badeaux, A., Collombet, S., Laurent, B., Oevelen, C. van, Chin, K.-K., Thieffry, D., Graf, T., and Shi, Y. (2017). A Transcription Factor Pulse Can Prime Chromatin for Heritable Transcriptional Memory. *Mol. Cell. Biol.* *37*, e00372-16.
- Izumi, N., and Tomari, Y. (2014). Diversity of the piRNA pathway for nonself silencing: worm-specific piRNA biogenesis factors. *Genes Dev.* *28*, 665–671.
- Janevska, S., Baumann, L., Sieber, C.M.K., Münsterkötter, M., Ulrich, J., Kämper, J., Güldener, U., and Tudzynski, B. (2018). Elucidation of the Two H3K36me3 Histone Methyltransferases Set2 and Ash1 in *Fusarium fujikuroi* Unravels Their Different Chromosomal Targets and a Major Impact of Ash1 on Genome Stability. *Genetics* *208*, 153–171.
- Janisiw, E., Stritto, M.R.D., Jantsch, V., and Silva, N. (2018). BRCA1-BARD1 associate with the synaptonemal complex and pro-crossover factors and influence RAD-51 dynamics during *Caenorhabditis elegans* meiosis. *PLOS Genet.* *14*, e1007653.
- Jaramillo-Lambert, A., Fabritius, A.S., Hansen, T.J., Smith, H.E., and Golden, A. (2016). The Identification of a Novel Mutant Allele of topoisomerase II in *Caenorhabditis elegans* Reveals a Unique Role in Chromosome Segregation During Spermatogenesis. *Genetics* *204*, 1407–1422.

Bibliographie

- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jha, D.K., and Strahl, B.D. (2014). An RNA polymerase II-coupled function for histone H3K36 methylation in checkpoint activation and DSB repair. *Nat. Commun.* 5, 3965.
- Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., Kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., and Maeshima, K. (2012). Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. *Nucleus* 3, 404–410.
- Kadamb, R., Mittal, S., Bansal, N., Batra, H., and Saluja, D. (2013). Sin3: insight into its transcription regulatory functions. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 237–246.
- Kadyk, L.C., and Kimble, J. (1998). Genetic regulation of entry into meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Camb. Engl.* 125, 1803–1813.
- Kalinava, N., Ni, J.Z., Gajic, Z., Kim, M., Ushakov, H., and Gu, S.G. (2018). *C. elegans* Heterochromatin Factor SET-32 Plays an Essential Role in Transgenerational Establishment of Nuclear RNAi-Mediated Epigenetic Silencing. *Cell Rep.* 25, 2273–2284.e3.
- Kanu, N., Grönroos, E., Martinez, P., Burrell, R.A., Yi Goh, X., Bartkova, J., Maya-Mendoza, A., Mistrík, M., Rowan, A.J., Patel, H., et al. (2015). SETD2 loss-of-function promotes renal cancer branched evolution through replication stress and impaired DNA repair. *Oncogene* 34, 5699–5708.
- Kasper, D.M., Gardner, K.E., and Reinke, V. (2014). Homeland security in the *C. elegans* germ line. *Epigenetics* 9, 62–74.
- Katz, D.J., Edwards, T.M., Reinke, V., and Kelly, W.G. (2009). A *C. elegans* LSD1 Demethylase Contributes to Germline Immortality by Reprogramming Epigenetic Memory. *Cell* 137, 308–320.
- Kawamura, R., Pope, L.H., Christensen, M.O., Sun, M., Terekhova, K., Boege, F., Mielke, C., Andersen, A.H., and Marko, J.F. (2010). Mitotic chromosomes are constrained by topoisomerase II-sensitive DNA entanglements. *J. Cell Biol.* 188, 653–663.
- Kawasaki, I., Shim, Y.-H., Kirchner, J., Kaminker, J., Wood, W.B., and Strome, S. (1998). PGL-1, a Predicted RNA-Binding Component of Germ Granules, Is Essential for Fertility in *C. elegans*. *Cell* 94, 635–645.
- Kelly, W.G., Schaner, C.E., Dernburg, A.F., Lee, M.-H., Kim, S.K., Villeneuve, A.M., and Reinke, V. (2002). X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*. *Dev. Camb. Engl.* 129, 479–492.
- Keogh, M.-C., Kurdistani, S.K., Morris, S.A., Ahn, S.H., Podolny, V., Collins, S.R., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N.J., et al. (2005). Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* 123, 593–605.
- Ketel, C.S., Andersen, E.F., Vargas, M.L., Suh, J., Strome, S., and Simon, J.A. (2005). Subunit Contributions to Histone Methyltransferase Activities of Fly and Worm Polycomb Group Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6857–6868.
- Kim, J., Guermah, M., McGinty, R.K., Lee, J.-S., Tang, Z., Milne, T.A., Shilatifard, A., Muir, T.W., and Roeder, R.G. (2009). RAD6-Mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell* 137, 459–471.
- Kim, J.H., Zhang, T., Wong, N.C., Davidson, N., Maksimovic, J., Oshlack, A., Earnshaw, W.C., Kalitsis, P., and Hudson, D.F. (2013). Condensin I associates with structural and gene regulatory regions in vertebrate chromosomes. *Nat. Commun.* 4, 2537.

Bibliographie

- Kimble, J., and Simpson, P. (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 333–361.
- Kimble, J.E., and White, J.G. (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **81**, 208–219.
- Kinoshita, K., Kobayashi, T.J., and Hirano, T. (2015). Balancing Acts of Two HEAT Subunits of Condensin I Support Dynamic Assembly of Chromosome Axes. *Dev. Cell* **33**, 94–106.
- Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C.J., Singer, M.A., Vermeulen, M., Mann, M., Bähler, J., Green, R.D., and Kouzarides, T. (2007). Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature* **449**, 928–932.
- Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 89–97.
- Kohlmaier, A., Savarese, F., Lachner, M., Martens, J., Jenuwein, T., and Wutz, A. (2004). A Chromosomal Memory Triggered by Xist Regulates Histone Methylation in X Inactivation. *PLOS Biol.* **2**, e171.
- Koole, W., van Schendel, R., Karambelas, A.E., van Heteren, J.T., Okihara, K.L., and Tijsterman, M. (2014). A Polymerase Theta-dependent repair pathway suppresses extensive genomic instability at endogenous G4 DNA sites. *Nat. Commun.* **5**, 3216.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science* **184**, 868–871.
- Korta, D.Z., Tuck, S., and Hubbard, E.J.A. (2012). S6K links cell fate, cell cycle and nutrient response in *C. elegans* germline stem/progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* **139**, 859–870.
- Kranz, A.-L., Jiao, C.-Y., Winterkorn, L.H., Albritton, S.E., Kramer, M., and Ercan, S. (2013). Genome-wide analysis of condensin binding in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* **14**, R112.
- Kreher, J., Takasaki, T., Cockrum, C., Sidoli, S., Garcia, B.A., Jensen, O.N., and Strome, S. (2018). Distinct Roles of Two Histone Methyltransferases in Transmitting H3K36me3-Based Epigenetic Memory Across Generations in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **210**, 969–982.
- Krogan, N.J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Ryan, O.W., Golshani, A., Johnston, M., et al. (2003). The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol. Cell* **11**, 721–729.
- Kruisselbrink, E., Guryev, V., Brouwer, K., Pontier, D.B., Cuppen, E., and Tijsterman, M. (2008). Mutagenic Capacity of Endogenous G4 DNA Underlies Genome Instability in FANCD1-Defective *C. elegans*. *Curr. Biol.* **18**, 900–905.
- Kruijthof, M., Chien, F.-T., Routh, A., Logie, C., Rhodes, D., and van Noort, J. (2009). Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 534–540.
- Kschonsak, M., and Haering, C.H. (2015). Shaping mitotic chromosomes: From classical concepts to molecular mechanisms. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **37**, 755–766.
- Kschonsak, M., Merkel, F., Bisht, S., Metz, J., Rybin, V., Hassler, M., and Haering, C.H. (2017). Structural Basis for a Safety-Belt Mechanism That Anchors Condensin to Chromosomes. *Cell* **171**, 588–600.e24.
- Kuo, L.J., and Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *Vivo Athens Greece* **22**, 305–309.

Bibliographie

- Kuznicki, K.A., Smith, P.A., Leung-Chiu, W.M., Estevez, A.O., Scott, H.C., and Bennett, K.L. (2000). Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. *Development* 127, 2907–2916.
- Ladouceur, A.-M., Ranjan, R., Smith, L., Fadero, T., Heppert, J., Goldstein, B., Maddox, A.S., and Maddox, P.S. (2017). CENP-A and topoisomerase-II antagonistically affect chromosome length. *J Cell Biol* 216, 2645–2655.
- Laherty, C.D., Yang, W.M., Sun, J.M., Davie, J.R., Seto, E., and Eisenman, R.N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349–356.
- Lamelza, P., and Bhalla, N. (2012). Histone Methyltransferases MES-4 and MET-1 Promote Meiotic Checkpoint Activation in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genet.* 8, e1003089.
- Lau, A.C., Zhu, K.P., Brouhard, E.A., Davis, M.B., and Csankovszki, G. (2016). An H4K16 histone acetyltransferase mediates decondensation of the X chromosome in *C. elegans* males. *Epigenetics Chromatin* 9, 44.
- Lee, J.-H., and Skalnik, D.G. (2008). Wdr82 is a C-terminal domain-binding protein that recruits the Setd1A Histone H3-Lys4 methyltransferase complex to transcription start sites of transcribed human genes. *Mol. Cell. Biol.* 28, 609–618.
- Lee, B.B., Choi, A., Kim, J.H., Jun, Y., Woo, H., Ha, S.D., Yoon, C.Y., Hwang, J.-T., Steinmetz, L., Buratowski, S., et al. (2018). Rpd3L HDAC links H3K4me3 to transcriptional repression memory. *Nucleic Acids Res.* 46, 8261–8274.
- Lee, C.-Y.S., Lu, T., and Seydoux, G. (2017). Nanos promotes epigenetic reprogramming of the germline by down-regulation of the THAP transcription factor LIN-15B. *ELife* 6, e30201.
- Lee, H.-C., Gu, W., Shirayama, M., Youngman, E., Conte, D., and Mello, C.C. (2012). *C. elegans* piRNAs mediate the genome-wide surveillance of germline transcripts. *Cell* 150, 78–87.
- Lee, J.H., Voo, K.S., and Skalnik, D.G. (2001). Identification and characterization of the DNA binding domain of CpG-binding protein. *J. Biol. Chem.* 276, 44669–44676.
- Lenstra, T.L., Benschop, J.J., Kim, T., Schulze, J.M., Brabers, N.A.C.H., Margaritis, T., van de Pasch, L.A.L., van Heesch, S.A.A.C., Brok, M.O., Koerkamp, M.J.A.G., et al. (2011). The specificity and topology of chromatin interaction pathways in yeast. *Mol. Cell* 42, 536–549.
- Lerner, J., Bagattin, A., Verdeguer, F., Makinistoglu, M.P., Garbay, S., Felix, T., Heidet, L., and Pontoglio, M. (2016). Human mutations affect the epigenetic/bookmarking function of HNF1B. *Nucleic Acids Res.* 44, 8097–8111.
- Lev, I., Gingold, H., and Rechavi, O. (2019). H3K9me3 is required for inheritance of small RNAs that target a unique subset of newly evolved genes. *ELife* 8, e40448.
- Li, H. (2011a). Tabix: fast retrieval of sequence features from generic TAB-delimited files. *Bioinformatics* 27, 718–719.
- Li, H. (2011b). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27, 2987–2993.
- Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *ArXiv13033997 Q-Bio*.

Bibliographie

- Li, T., and Kelly, W.G. (2011a). A Role for Set1/MLL-Related Components in Epigenetic Regulation of the *Caenorhabditis elegans* Germ Line. *PLOS Genet.* 7, e1001349.
- Li, T., and Kelly, W.G. (2011b). A Role for Set1/MLL-Related Components in Epigenetic Regulation of the *Caenorhabditis elegans* Germ Line. *PLOS Genet.* 7, e1001349.
- Li, T., and Kelly, W.G. (2014). A role for WDR5 in TRA-1/Gli mediated transcriptional control of the sperm/oocyte switch in *C. elegans*. *Nucleic Acids Res.* 42, 5567–5581.
- Li, F., Mao, G., Tong, D., Huang, J., Gu, L., Yang, W., and Li, G.-M. (2013). The Histone Mark H3K36me3 Regulates Human DNA Mismatch Repair through its Interaction with MutS α . *Cell* 153, 590–600.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
- Li, J., Xing, X., Zhang, X., Liang, B., He, Z., Gao, C., Wang, S., Wang, F., Zhang, H., Zeng, S., et al. (2018). Enhanced H3K4me3 modifications are involved in the transactivation of DNA damage responsive genes in workers exposed to low-level benzene. *Environ. Pollut.* 234, 127–135.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289–293.
- Liebich, H.M., Gesele, E., Wirth, C., Wöll, J., Jobst, K., and Lakatos, A. (1993). Non-enzymatic glycation of histones. *Biol. Mass Spectrom.* 22, 121–123.
- Liu, C., Wang, C., Wang, G., Becker, C., Zaidem, M., and Weigel, D. (2016). Genome-wide analysis of chromatin packing in *Arabidopsis thaliana* at single-gene resolution. *Genome Res.* 26, 1057–1068.
- Liu, T., Rechtsteiner, A., Egelhofer, T.A., Vielle, A., Latorre, I., Cheung, M.-S., Ercan, S., Ikegami, K., Jensen, M., Kolasinska-Zwierz, P., et al. (2011). Broad chromosomal domains of histone modification patterns in *C. elegans*. *Genome Res.* 21, 227–236.
- Liu, W., Tanasa, B., Tyurina, O.V., Zhou, T.Y., Gassmann, R., Liu, W.T., Ohgi, K.A., Benner, C., Garcia-Bassets, I., Aggarwal, A.K., et al. (2010). PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature* 466, 508–512.
- Llères, D., Bailly, A.P., Perrin, A., Norman, D.G., Xirodimas, D.P., and Feil, R. (2017). Quantitative FLIM-FRET Microscopy to Monitor Nanoscale Chromatin Compaction In Vivo Reveals Structural Roles of Condensin Complexes. *Cell Rep.* 18, 1791–1803.
- Locklear, L., Ridsdale, J.A., Bazett-Jones, D.P., and Davie, J.R. (1990). Ultrastructure of transcriptionally competent chromatin. *Nucleic Acids Res.* 18, 7015–7024.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15.
- Lu, R., and Wang, G.G. (2013). Tudor: a versatile family of histone methylation ‘readers.’ *Trends Biochem. Sci.* 38.
- Luitjens, C., Gallegos, M., Kraemer, B., Kimble, J., and Wickens, M. (2000). CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes Dev.* 14, 2596–2609.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* 13, 1161–1169.

Bibliographie

- Ma, C., Niu, R., Huang, T., Shao, L.-W., Peng, Y., Ding, W., Wang, Y., Jia, G., He, C., Li, C.-Y., et al. (2019). N6-methyldeoxyadenine is a transgenerational epigenetic signal for mitochondrial stress adaptation. *Nat. Cell Biol.* **21**, 319.
- Maciejowski, J., Ahn, J.H., Cipriani, P.G., Killian, D.J., Chaudhary, A.L., Lee, J.I., Voutev, R., Johnsen, R.C., Baillie, D.L., Gunsalus, K.C., et al. (2005). Autosomal Genes of Autosomal/X-Linked Duplicated Gene Pairs and Germ-Line Proliferation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **169**, 1997–2011.
- Maciejowski, J., Ugel, N., Mishra, B., Isopi, M., and Hubbard, E.J.A. (2006). Quantitative analysis of germline mitosis in adult *C. elegans*. *Dev. Biol.* **292**, 142–151.
- MacQueen, A.J., Phillips, C.M., Bhalla, N., Weiser, P., Villeneuve, A.M., and Dernburg, A.F. (2005). Chromosome Sites Play Dual Roles to Establish Homologous Synapsis during Meiosis in *C. elegans*. *Cell* **123**, 1037–1050.
- Maeshima, K., and Laemmli, U.K. (2003). A Two-Step Scaffolding Model for Mitotic Chromosome Assembly. *Dev. Cell* **4**, 467–480.
- Maeshima, K., Ide, S., and Babokhov, M. (2019). Dynamic chromatin organization without the 30-nm fiber. *Curr. Opin. Cell Biol.* **58**, 95–104.
- Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **10**, 882.
- Manuelidis, L. (1985). Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum. Genet.* **71**, 288–293.
- Marcello, M.R., Singaravelu, G., and Singson, A. (2013). Fertilization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **757**, 321–350.
- Margaritis, T., Oreal, V., Brabers, N., Maestroni, L., Vitaliano-Prunier, A., Benschop, J.J., van Hooff, S., van Leenen, D., Dargemont, C., Géli, V., et al. (2012). Two distinct repressive mechanisms for histone 3 lysine 4 methylation through promoting 3'-end antisense transcription. *PLoS Genet.* **8**, e1002952.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal* **17**, 10–12.
- de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A.R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol. Cell* **12**, 525–532.
- McDonel, P., Jans, J., Peterson, B.K., and Meyer, B.J. (2006). Clustered DNA motifs mark X chromosomes for repression by a dosage compensation complex. *Nature* **444**, 614–618.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., et al. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303.
- McKim, K.S., Howell, A.M., and Rose, A.M. (1988). The Effects of Translocations on Recombination Frequency in *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* **120**, 987–1001.
- McManus, C.E., and Reinke, V. (2018). The Germline-Specific Factor OEF-1 Facilitates Coordinated Progression Through Germ Cell Development in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **208**, 549–563.
- Meier, B., Clejan, I., Liu, Y., Lowden, M., Gartner, A., Hodgkin, J., and Ahmed, S. (2006a). trt-1 Is the *Caenorhabditis elegans* Catalytic Subunit of Telomerase. *PLOS Genet.* **2**, e18.

Bibliographie

- Meier, B., Clejan, I., Liu, Y., Lowden, M., Gartner, A., Hodgkin, J., and Ahmed, S. (2006b). *trt-1* Is the *Caenorhabditis elegans* Catalytic Subunit of Telomerase. *PLOS Genet.* 2, e18.
- Meier, B., Barber, L.J., Liu, Y., Shtessel, L., Boulton, S.J., Gartner, A., and Ahmed, S. (2009). The MRT-1 nuclease is required for DNA crosslink repair and telomerase activity in vivo in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 28, 3549–3563.
- Meier, B., Cooke, S.L., Weiss, J., Bailly, A.P., Alexandrov, L.B., Marshall, J., Raine, K., Maddison, M., Anderson, E., Stratton, M.R., et al. (2014). *C. elegans* whole-genome sequencing reveals mutational signatures related to carcinogens and DNA repair deficiency. *Genome Res.* 24, 1624–1636.
- Meller, V.H., and Kuroda, M.I. (2002). Sex and the single chromosome. *Adv. Genet.* 46, 1–24.
- Merritt, C., Rasoloson, D., Ko, D., and Seydoux, G. (2008). 3' UTRs are the primary regulators of gene expression in the *C. elegans* germline. *Curr. Biol. CB* 18, 1476–1482.
- Mets, D.G., and Meyer, B.J. (2009). Condensins Regulate Meiotic DNA Break Distribution, thus Crossover Frequency, by Controlling Chromosome Structure. *Cell* 139, 73–86.
- Meyer, B.J. (2010). Targeting X Chromosomes for Repression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 179–189.
- Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* 91, 35–45.
- Miller, T., Krogan, N.J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Greenblatt, J.F., and Shilatifard, A. (2001). COMPASS: A complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12902–12907.
- Milne, T.A., Dou, Y., Martin, M.E., Brock, H.W., Roeder, R.G., and Hess, J.L. (2005). MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14765–14770.
- Molaro, A., and Malik, H.S. (2016). Hide and seek: how chromatin-based pathways silence retroelements in the mammalian germline. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 37, 51–58.
- Montgomery, T.A., Rim, Y.-S., Zhang, C., Downen, R.H., Phillips, C.M., Fischer, S.E.J., and Ruvkun, G. (2012). PIWI Associated siRNAs and piRNAs Specifically Require the *Caenorhabditis elegans* HEN1 Ortholog henn-1. *PLOS Genet.* 8, e1002616.
- Mora-Bermúdez, F., Matsuzaki, F., and Huttner, W.B. (2014). Specific polar subpopulations of astral microtubules control spindle orientation and symmetric neural stem cell division. *ELife* 3.
- Moraru, M., and Schalch, T. (2019). Chromatin fiber structural motifs as regulatory hubs of genome function? *Essays Biochem.* EBC20180065.
- Mozzetta, C., Boyarchuk, E., Pontis, J., and Ait-Si-Ali, S. (2015). Sound of silence: the properties and functions of repressive Lys methyltransferases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 499–513.
- Muramoto, T., Müller, I., Thomas, G., Melvin, A., and Chubb, J.R. (2010). Methylation of H3K4 Is Required for Inheritance of Active Transcriptional States. *Curr. Biol.* 20, 397–406.
- Nabeshima, K., Mlynarczyk-Evans, S., and Villeneuve, A.M. (2011). Chromosome Painting Reveals Asynaptic Full Alignment of Homologs and HIM-8–Dependent Remodeling of X Chromosome Territories during *Caenorhabditis elegans* Meiosis. *PLOS Genet.* 7, e1002231.

Bibliographie

- Naftelberg, S., Schor, I.E., Ast, G., and Kornblihtt, A.R. (2015). Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 165–198.
- Nakanishi, S., Sanderson, B.W., Delventhal, K.M., Bradford, W.D., Staehling-Hampton, K., and Shilatifard, A. (2008). A comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 881–888.
- Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 35, 673–745.
- Nelson, C.R., Hwang, T., Chen, P.-H., and Bhalla, N. (2015). TRIP13PCH-2 promotes Mad2 localization to unattached kinetochores in the spindle checkpoint response. *J Cell Biol* 211, 503–516.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., and Struhl, K. (2003). Targeted Recruitment of Set1 Histone Methylase by Elongating Pol II Provides a Localized Mark and Memory of Recent Transcriptional Activity. *Mol. Cell* 11, 709–719.
- Nguyen, A.T., and Zhang, Y. (2011). The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes Dev.* 25, 1345–1358.
- Nojima, T., Gomes, T., Grosso, A.R.F., Kimura, H., Dye, M.J., Dhir, S., Carmo-Fonseca, M., and Proudfoot, N.J. (2015). Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell* 161, 526–540.
- de Nooijer, S., Wellink, J., Mulder, B., and Bisseling, T. (2009). Non-specific interactions are sufficient to explain the position of heterochromatic chromocenters and nucleoli in interphase nuclei. *Nucleic Acids Res.* 37, 3558–3568.
- Norden, C., Mendoza, M., Dobbelaere, J., Kotwaliwale, C.V., Biggins, S., and Barral, Y. (2006). The NoCut Pathway Links Completion of Cytokinesis to Spindle Midzone Function to Prevent Chromosome Breakage. *Cell* 125, 85–98.
- van Oevelen, C., Bowman, C., Pellegrino, J., Asp, P., Cheng, J., Parisi, F., Micsinai, M., Kluger, Y., Chu, A., Blais, A., et al. (2010). The mammalian Sin3 proteins are required for muscle development and sarcomere specification. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5686–5697.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell* 115, 109–121.
- Ono, T., Fang, Y., Spector, D.L., and Hirano, T. (2004). Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 3296–3308.
- Ooi, S.L., Priess, J.R., and Henikoff, S. (2006). Histone H3.3 Variant Dynamics in the Germline of *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genet.* 2, e97.
- Padeken, J., Zeller, P., and Gasser, S.M. (2015). Repeat DNA in genome organization and stability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 31, 12–19.
- Pai, C.-C., Deegan, R.S., Subramanian, L., Gal, C., Sarkar, S., Blaikley, E.J., Walker, C., Hulme, L., Bernhard, E., Codlin, S., et al. (2014). A histone H3K36 chromatin switch coordinates DNA double-strand break repair pathway choice. *Nat. Commun.* 5, 4091.
- Pan, X., Lei, B., Zhou, N., Feng, B., Yao, W., Zhao, X., Yu, Y., and Lu, H. (2012). Identification of novel genes involved in DNA damage response by screening a genome-wide *Schizosaccharomyces pombe* deletion library. *BMC Genomics* 13, 662.

Bibliographie

- Papazyan, R., Voronina, E., Chapman, J.R., Luperchio, T.R., Gilbert, T.M., Meier, E., Mackintosh, S.G., Shabanowitz, J., Tackett, A.J., Reddy, K.L., et al. (2014). Methylation of histone H3K23 blocks DNA damage in pericentric heterochromatin during meiosis. *ELife* 3.
- Pasierbek, P., Jantsch, M., Melcher, M., Schleiffer, A., Schweizer, D., and Loidl, J. (2001). A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev.* 15, 1349–1360.
- Passarge, E. (1979). Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *Am. J. Hum. Genet.* 31, 106–115.
- Paulsen, J.E., Capowski, E.E., and Strome, S. (1995). Phenotypic and molecular analysis of *mes-3*, a maternal-effect gene required for proliferation and viability of the germ line in *C. elegans*. *Genetics* 141, 1383–1398.
- Peña, P.V., Hom, R.A., Hung, T., Lin, H., Kuo, A.J., Wong, R.P.C., Subach, O.M., Champagne, K.S., Zhao, R., Verkhusha, V.V., et al. (2008). Histone H3K4me3 Binding Is Required for the DNA Repair and Apoptotic Activities of ING1 Tumor Suppressor. *J. Mol. Biol.* 380, 303–312.
- Pfister, S.X., Ahrabi, S., Zalmas, L.-P., Sarkar, S., Aymard, F., Bachrati, C.Z., Helleday, T., Legube, G., La Thangue, N.B., Porter, A.C.G., et al. (2014a). SETD2-Dependent Histone H3K36 Trimethylation Is Required for Homologous Recombination Repair and Genome Stability. *Cell Rep.* 7, 2006–2018.
- Pfister, S.X., Ahrabi, S., Zalmas, L.-P., Sarkar, S., Aymard, F., Bachrati, C.Z., Helleday, T., Legube, G., La Thangue, N.B., Porter, A.C.G., et al. (2014b). SETD2-Dependent Histone H3K36 Trimethylation Is Required for Homologous Recombination Repair and Genome Stability. *Cell Rep.* 7, 2006–2018.
- Piazza, I., Haering, C.H., and Rutkowska, A. (2013). Condensin: crafting the chromosome landscape. *Chromosoma* 122, 175–190.
- Piazza, I., Rutkowska, A., Ori, A., Walczak, M., Metz, J., Pelechano, V., Beck, M., and Haering, C.H. (2014). Association of condensin with chromosomes depends on DNA binding by its HEAT-repeat subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 560–568.
- Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D.A., and Panning, B. (2002). Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* 36, 233–278.
- Praitis, V., Casey, E., Collar, D., and Austin, J. (2001). Creation of Low-Copy Integrated Transgenic Lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157, 1217–1226.
- Prakash, K., and Fournier, D. (2017). Histone Code and Higher-Order Chromatin Folding: A Hypothesis. *Genomics Comput. Biol.* 3, 41.
- Prakash, K., Fournier, D., Redl, S., Best, G., Borsos, M., Tiwari, V.K., Tachibana-Konwalski, K., Ketting, R.F., Parekh, S.H., Cremer, C., et al. (2015). Superresolution imaging reveals structurally distinct periodic patterns of chromatin along pachytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 14635–14640.
- Price, B.D., and D'Andrea, A.D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* 152, 1344–1354.
- Pu, M., Ni, Z., Wang, M., Wang, X., Wood, J.G., Helfand, S.L., Yu, H., and Lee, S.S. (2015). Trimethylation of Lys36 on H3 restricts gene expression change during aging and impacts life span. *Genes Dev.* 29, 718–731.
- R Development Core Team (2009). R: A Language and Environment for Statistical Computing (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing).

Bibliographie

- Ramakrishnan, S., Pokhrel, S., Palani, S., Pflueger, C., Parnell, T.J., Cairns, B.R., Bhaskara, S., and Chandrasekharan, M.B. (2016). Counteracting H3K4 methylation modulators Set1 and Jhd2 co-regulate chromatin dynamics and gene transcription. *Nat. Commun.* 7, 11949.
- Rando, O.J. (2012). Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 148–155.
- Rao, S.S.P., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A.L., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S., et al. (2014). A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping. *Cell* 159, 1665–1680.
- Razin, S.V., and Gavrilov, A.A. (2014). Chromatin without the 30-nm fiber. *Epigenetics* 9, 653–657.
- Rechavi, O., and Lev, I. (2017). Principles of Transgenerational Small RNA Inheritance in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 27, R720–R730.
- Rechtsteiner, A., Ercan, S., Takasaki, T., Phippen, T.M., Egelhofer, T.A., Wang, W., Kimura, H., Lieb, J.D., and Strome, S. (2010). The Histone H3K36 Methyltransferase MES-4 Acts Epigenetically to Transmit the Memory of Germline Gene Expression to Progeny. *PLOS Genet.* 6, e1001091.
- Reinke, V., Smith, H.E., Nance, J., Wang, J., Van Doren, C., Begley, R., Jones, S.J.M., Davis, E.B., Scherer, S., Ward, S., et al. (2000). A Global Profile of Germline Gene Expression in *C. elegans*. *Mol. Cell* 6, 605–616.
- Reinke, V., Gil, I.S., Ward, S., and Kazmer, K. (2004). Genome-wide germline-enriched and sex-biased expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 131, 311–323.
- Reuben, M., and Lin, R. (2002). Germline X Chromosomes Exhibit Contrasting Patterns of Histone H3 Methylation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 245, 71–82.
- Riggs, A.D., and Porter, T.N. (1996). Overview of Epigenetic Mechanisms. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* 32, 29–45–45.
- Riggs, A.D., Martienssen, R.A., and Russo, V.E.A. (1996). Introduction. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* 32, 1–4–4.
- Robellet, X., Fauque, L., Legros, P., Mollereau, E., Janczarski, S., Parrinello, H., Desvignes, J.-P., Thevenin, M., and Bernard, P. (2014). A genetic screen for functional partners of condensin in fission yeast. *G3 Bethesda Md* 4, 373–381.
- Robellet, X., Vanoosthuyse, V., and Bernard, P. (2017). The loading of condensin in the context of chromatin. *Curr. Genet.* 63, 577–589.
- Robert, V.J., Mercier, M.G., Bedet, C., Janczarski, S., Merlet, J., Garvis, S., Ciosk, R., and Palladino, F. (2014a). The SET-2/SET1 histone H3K4 methyltransferase maintains pluripotency in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Cell Rep.* 9, 443–450.
- Robert, V.J., Mercier, M.G., Bedet, C., Janczarski, S., Merlet, J., Garvis, S., Ciosk, R., and Palladino, F. (2014b). The SET-2/SET1 Histone H3K4 Methyltransferase Maintains Pluripotency in the *Caenorhabditis elegans* Germline. *Cell Rep.* 9, 443–450.
- Robert, V.J.P., Sijen, T., van Wolfswinkel, J., and Plasterk, R.H.A. (2005). Chromatin and RNAi factors protect the *C. elegans* germline against repetitive sequences. *Genes Dev.* 19, 782–787.

Bibliographie

- Robinson, P.J.J., Fairall, L., Huynh, V.A.T., and Rhodes, D. (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*, 6506–6511.
- Roerink, S.F., van Schendel, R., and Tijsterman, M. (2014a). Polymerase theta-mediated end joining of replication-associated DNA breaks in *C. elegans*. *Genome Res.* *24*, 954–962.
- Roerink, S.F., van Schendel, R., and Tijsterman, M. (2014b). Polymerase theta-mediated end joining of replication-associated DNA breaks in *C. elegans*. *Genome Res.* *24*, 954–962.
- Rosa, S., and Shaw, P. (2013). Insights into Chromatin Structure and Dynamics in Plants. *Biology* *2*, 1378–1410.
- Ruby, J.G., Jan, C., Player, C., Axtell, M.J., Lee, W., Nusbaum, C., Ge, H., and Bartel, D.P. (2006). Large-Scale Sequencing Reveals 21U-RNAs and Additional MicroRNAs and Endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell* *127*, 1193–1207.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Wysocka, J. (2007). Methylation of Lysine 4 on Histone H3: Intricacy of Writing and Reading a Single Epigenetic Mark. *Mol. Cell* *25*, 15–30.
- Ruthenburg, A.J., Li, H., Milne, T.A., Dewell, S., McGinty, R.K., Yuen, M., Ueberheide, B., Dou, Y., Muir, T.W., Patel, D.J., et al. (2011). Recognition of a mononucleosomal histone modification pattern by BPTF via multivalent interactions. *Cell* *145*, 692–706.
- Sadasivam, S., and DeCaprio, J.A. (2013). The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 585–595.
- Saha, N., Liu, M., Gajan, A., and Pile, L.A. (2016). Genome-wide studies reveal novel and distinct biological pathways regulated by SIN3 isoforms. *BMC Genomics* *17*, 111.
- Sahu, S.C., Swanson, K.A., Kang, R.S., Huang, K., Brubaker, K., Ratcliff, K., and Radhakrishnan, I. (2008). Conserved themes in target recognition by the PAH1 and PAH2 domains of the Sin3 transcriptional corepressor. *J. Mol. Biol.* *375*, 1444–1456.
- Sakaguchi, A., Sarkies, P., Simon, M., Doebley, A.-L., Goldstein, L.D., Hedges, A., Ikegami, K., Alvares, S.M., Yang, L., LaRocque, J.R., et al. (2014). *Caenorhabditis elegans* RSD-2 and RSD-6 promote germ cell immortality by maintaining small interfering RNA populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E4323–E4331.
- Samejima, K., Samejima, I., Vagnarelli, P., Ogawa, H., Vargiu, G., Kelly, D.A., de Lima Alves, F., Kerr, A., Green, L.C., Hudson, D.F., et al. (2012). Mitotic chromosomes are compacted laterally by KIF4 and condensin and axially by topoisomerase II α . *J. Cell Biol.* *199*, 755–770.
- Samson, M., Jow, M.M., Wong, C.C.L., Fitzpatrick, C., Aslanian, A., Saucedo, I., Estrada, R., Ito, T., Park, S.R., Iii, J.R.Y., et al. (2014). The Specification and Global Reprogramming of Histone Epigenetic Marks during Gamete Formation and Early Embryo Development in *C. elegans*. *PLOS Genet.* *10*, e1004588.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* *419*, 407.
- Saunders, A., Huang, X., Fidalgo, M., Reimer, M.H., Faiola, F., Ding, J., Sánchez-Priego, C., Guallar, D., Sáenz, C., Li, D., et al. (2017). The SIN3A/HDAC Corepressor Complex Functionally Cooperates with NANOG to Promote Pluripotency. *Cell Rep.* *18*, 1713–1726.

Bibliographie

- Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* 436, 138.
- Scheffer, M.P., Eltsov, M., and Frangakis, A.S. (2011). Evidence for short-range helical order in the 30-nm chromatin fibers of erythrocyte nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16992–16997.
- van Schendel, R., Roerink, S.F., Portegijs, V., van den Heuvel, S., and Tijsterman, M. (2015). Polymerase Θ is a key driver of genome evolution and of CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis. *Nat. Commun.* 6.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S., and Gartner, A. (2001). The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr. Biol. CB* 11, 1722–1727.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D.M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265–275.
- Segovia, R., Tam, A.S., and Stirling, P.C. (2015). Dissecting genetic and environmental mutation signatures with model organisms. *Trends Genet.* 31, 465–474.
- Seiler, D.M., Rouquette, J., Schmid, V.J., Strickfaden, H., Ottmann, C., Drexler, G.A., Mazurek, B., Greubel, C., Hable, V., Dollinger, G., et al. (2011). Double-strand break-induced transcriptional silencing is associated with loss of tri-methylation at H3K4. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 19, 883–899.
- Seto, E., and Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a018713.
- Severson, A.F., and Meyer, B.J. (2014). Divergent kleisin subunits of cohesin specify mechanisms to tether and release meiotic chromosomes. *ELife* 3.
- Severson, A.F., Ling, L., van Zuylen, V., and Meyer, B.J. (2009). The axial element protein HTP-3 promotes cohesin loading and meiotic axis assembly in *C. elegans* to implement the meiotic program of chromosome segregation. *Genes Dev.* 23, 1763–1778.
- Seydoux, G. (2018). The P Granules of *C. elegans*: A Genetic Model for the Study of RNA–Protein Condensates. *J. Mol. Biol.* 430, 4702–4710.
- Sherwood, R., Takahashi, T.S., and Jallepalli, P.V. (2010). Sister acts: coordinating DNA replication and cohesion establishment. *Genes Dev.* 24, 2723–2731.
- Shi, L., and Oberdoerffer, P. (2012). Chromatin dynamics in DNA double-strand break repair. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 811–819.
- Shi, Q., and King, R.W. (2005). Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature* 437, 1038.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Peña, P., Lan, F., Kaadige, M.R., et al. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96–99.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941–953.

Bibliographie

- Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 243–269.
- Shintomi, K., Takahashi, T.S., and Hirano, T. (2015). Reconstitution of mitotic chromatids with a minimum set of purified factors. *Nat. Cell Biol.* 17, 1014–1023.
- Shirayama, M., Seth, M., Lee, H.-C., Gu, W., Ishidate, T., Conte, D., and Mello, C.C. (2012). piRNAs initiate an epigenetic memory of non-self RNA in the *C. elegans* germline. *Cell* 150, 65–77.
- Sijen, T., and Plasterk, R.H.A. (2003). Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 426, 310–314.
- Simon, M., Sarkies, P., Ikegami, K., Doebley, A.-L., Goldstein, L.D., Mitchell, J., Sakaguchi, A., Miska, E.A., and Ahmed, S. (2014). Reduced Insulin/IGF-1 Signaling Restores Germ Cell Immortality to *Caenorhabditis elegans* Piwi Mutants. *Cell Rep.* 7, 762–773.
- Simonet, T., Dulerio, R., Schott, S., and Palladino, F. (2007). Antagonistic functions of SET-2/SET1 and HPL/HP1 proteins in *C. elegans* development. *Dev. Biol.* 312, 367–383.
- Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B., and de Laat, W. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture–on-chip (4C). *Nat. Genet.* 38, 1348–1354.
- Smelick, C., and Ahmed, S. (2005). Achieving immortality in the *C. elegans* germline. *Ageing Res. Rev.* 4, 67–82.
- Smith, E.R., Cayrou, C., Huang, R., Lane, W.S., Côté, J., and Lucchesi, J.C. (2005). A human protein complex homologous to the *Drosophila* MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9175–9188.
- Smith, S.T., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E., and Mazo, A. (2004). Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 162–167.
- Smolikov, S., Schild-Prüfert, K., and Colaiácovo, M.P. (2009). A Yeast Two-Hybrid Screen for SYP-3 Interactors Identifies SYP-4, a Component Required for Synaptonemal Complex Assembly and Chiasma Formation in *Caenorhabditis elegans* Meiosis. *PLOS Genet.* 5, e1000669.
- Solovei, I., Grandi, N., Knoth, R., Volk, B., and Cremer, T. (2004). Positional changes of pericentromeric heterochromatin and nucleoli in postmitotic Purkinje cells during murine cerebellum development. *Cytogenet. Genome Res.* 105, 302–310.
- Solovei, I., Thanisch, K., and Feodorova, Y. (2016). How to rule the nucleus: divide et impera. *Curr. Opin. Cell Biol.* 40, 47–59.
- Song, F., Chen, P., Sun, D., Wang, M., Dong, L., Liang, D., Xu, R.-M., Zhu, P., and Li, G. (2014). Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. *Science* 344, 376–380.
- Spracklin, G., Fields, B., Wan, G., Becker, D., Wallig, A., Shukla, A., and Kennedy, S. (2017). The RNAi Inheritance Machinery of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 206, 1403–1416.
- Staff, S.R.A.S. (2011). Using the SRA Toolkit to convert .sra files into other formats (National Center for Biotechnology Information (US)).

Bibliographie

- Stanvitch, G., and Moore, L.L. (2008). *cin-4*, a Gene With Homology to Topoisomerase II, Is Required for Centromere Resolution by Cohesin Removal From Sister Kinetochores During Mitosis. *Genetics* 178, 83–97.
- Stear, J.H., and Roth, M.B. (2002). Characterization of HCP-6, a *C. elegans* protein required to prevent chromosome twisting and merotelic attachment. *Genes Dev.* 16, 1498–1508.
- Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H.A., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization. *Cell* 136, 473–484.
- Steiniger, M., Adams, C.D., Marko, J.F., and Reznikoff, W.S. (2006). Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 34, 2820–2832.
- Stevens, D., Oegema, K., and Desai, A. (2013). Meiotic Double-Strand Breaks Uncover and Protect against Mitotic Errors in the *C. elegans* Germline. *Curr. Biol.* 23, 2400–2406.
- Stinchcomb, D.T., Shaw, J.E., Carr, S.H., and Hirsh, D. (1985). Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3484–3496.
- Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G., and Allis, C.D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14967–14972.
- Strome, S., Kelly, W.G., Ercan, S., and Lieb, J.D. (2014). Regulation of the X Chromosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a018366.
- Sullivan, K.F. (2001). A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 182–188.
- Sulston, J.E., and Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56, 110–156.
- Sulston, J.E., Albertson, D.G., and Thomson, J.N. (1980). The *Caenorhabditis elegans* male: Postembryonic development of nongonadal structures. *Dev. Biol.* 78, 542–576.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., and Thomson, J.N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100, 64–119.
- Sun, F.L., Cuaycong, M.H., and Elgin, S.C. (2001). Long-range nucleosome ordering is associated with gene silencing in *Drosophila melanogaster* pericentric heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2867–2879.
- Supek, F., and Lehner, B. (2017). Clustered Mutation Signatures Reveal that Error-Prone DNA Repair Targets Mutations to Active Genes. *Cell* 170, 534–547.e23.
- Szalaj, P., and Plewczynski, D. (2018). Three-dimensional organization and dynamics of the genome. *Cell Biol. Toxicol.* 34, 381–404.
- Tabuchi, T.M., Deplancke, B., Osato, N., Zhu, L.J., Barrasa, M.I., Harrison, M.M., Horvitz, H.R., Walhout, A.J.M., and Hagstrom, K.A. (2011). Chromosome-Biased Binding and Gene Regulation by the *Caenorhabditis elegans* DRM Complex. *PLoS Genet.* 7.
- Tabuchi, T.M., Rechtsteiner, A., Strome, S., and Hagstrom, K.A. (2014). Opposing Activities of DRM and MES-4 Tune Gene Expression and X-Chromosome Repression in *Caenorhabditis elegans* Germ Cells. *G3 Genes Genomes Genet.* 4, 143–153.

Bibliographie

- Tabuchi, T.M., Rechtsteiner, A., Jeffers, T.E., Egelhofer, T.A., Murphy, C.T., and Strome, S. (2018). *Caenorhabditis elegans* sperm carry a histone-based epigenetic memory of both spermatogenesis and oogenesis. *Nat. Commun.* 9, 4310.
- Tada, K., Susumu, H., Sakuno, T., and Watanabe, Y. (2011). Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature* 474, 477–483.
- Takasaki, T., Liu, Z., Habara, Y., Nishiwaki, K., Nakayama, J., Inoue, K., Sakamoto, H., and Strome, S. (2007a). MRG-1, an autosome-associated protein, silences X-linked genes and protects germline immortality in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 134, 757–767.
- Takasaki, T., Liu, Z., Habara, Y., Nishiwaki, K., Nakayama, J., Inoue, K., Sakamoto, H., and Strome, S. (2007b). MRG-1, an autosome-associated protein, silences X-linked genes and protects germline immortality in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 134, 757–767.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., et al. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016–1028.
- Tanabe, K., Ikegami, Y., Ishida, R., and Andoh, T. (1991). Inhibition of Topoisomerase II by Antitumor Agents Bis(2,6-dioxopiperazine) Derivatives. *Cancer Res.* 51, 4903–4908.
- Terzi, N., Churchman, L.S., Vasiljeva, L., Weissman, J., and Buratowski, S. (2011). H3K4 trimethylation by Set1 promotes efficient termination by the Nrd1-Nab3-Sen1 pathway. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3569–3583.
- Thomson, J.P., Skene, P.J., Selfridge, J., Clouaire, T., Guy, J., Webb, S., Kerr, A.R.W., Deaton, A., Andrews, R., James, K.D., et al. (2010). CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* 464, 1082–1086.
- Tijsterman, M., Pothof, J., and Plasterk, R.H.A. (2002). Frequent germline mutations and somatic repeat instability in DNA mismatch-repair-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 161, 651–660.
- Toselli-Mollereau, E., Robellet, X., Fauque, L., Lemaire, S., Schiklenk, C., Klein, C., Hocquet, C., Legros, P., N'Guyen, L., Mouillard, L., et al. (2016). Nucleosome eviction in mitosis assists condensin loading and chromosome condensation. *EMBO J.* 35, 1565–1581.
- Toselli-Mollereau, E., Robellet, X., Fauque, L., Lemaire, S., Schiklenk, C., Klein, C., Hocquet, C., Legros, P., N'Guyen, L., Mouillard, L., et al. (2016). Nucleosome eviction in mitosis assists condensin loading and chromosome condensation. *EMBO J.* 35, 1565–1581.
- Towbin, B.D., González-Aguilera, C., Sack, R., Gaidatzis, D., Kalck, V., Meister, P., Askjaer, P., and Gasser, S.M. (2012). Step-Wise Methylation of Histone H3K9 Positions Heterochromatin at the Nuclear Periphery. *Cell* 150, 934–947.
- Trojer, P., and Reinberg, D. (2007). Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Mol. Cell* 28, 1–13.
- Trojer, P., Li, G., Sims, R.J., Vaquero, A., Kalakonda, N., Boccuni, P., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nimer, S.D., et al. (2007). L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* 129, 915–928.
- Tsai, C.J., Mets, D.G., Albrecht, M.R., Nix, P., Chan, A., and Meyer, B.J. (2008). Meiotic crossover number and distribution are regulated by a dosage compensation protein that resembles a condensin subunit. *Genes Dev.* 22, 194–211.

Bibliographie

- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811–816.
- Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K., and Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* 50, 917–925.
- Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr. Biol. CB* 8, 1095–1101.
- Updike, D.L., and Mango, S.E. (2006). Temporal Regulation of Foregut Development by HTZ-1/H2A.Z and PHA-4/FoxA. *PLOS Genet.* 2, e161.
- Vandamme, J., Lettier, G., Sidoli, S., Schiavi, E.D., Jensen, O.N., and Salcini, A.E. (2012). The *C. elegans* H3K27 Demethylase UTX-1 Is Essential for Normal Development, Independent of Its Enzymatic Activity. *PLOS Genet.* 8, e1002647.
- Vanfleteren, J.R., Van Bun, S.M., Delcambe, L.L., and Van Beeumen, J.J. (1986). Multiple forms of histone H2B from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 235, 769–773.
- Vanfleteren, J.R., Van Bun, S.M., and Van Beeumen, J.J. (1987a). The primary structure of histone H2A from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 243, 297–300.
- Vanfleteren, J.R., Van Bun, S.M., and Van Beeumen, J.J. (1987b). The primary structure of histone H3 from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 211, 59–63.
- Vanfleteren, J.R., Van Bun, S.M., and Van Beeumen, J.J. (1987c). The primary structure of histone H4 from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 87, 847–849.
- Vastenhouw, N.L., Fischer, S.E.J., Robert, V.J.P., Thijssen, K.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., and Plasterk, R.H.A. (2003). A Genome-Wide Screen Identifies 27 Genes Involved in Transposon Silencing in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 13, 1311–1316.
- Venkatasubrahmanyam, S., Hwang, W.W., Meneghini, M.D., Tong, A.H.Y., and Madhani, H.D. (2007). Genome-wide, as opposed to local, antisilencing is mediated redundantly by the euchromatic factors Set1 and H2A.Z. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 16609–16614.
- Vermezovic, J., Stergiou, L., Hengartner, M.O., and d'Adda di Fagagna, F. (2012). Differential regulation of DNA damage response activation between somatic and germline cells in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ.* 19, 1847–1855.
- Vielle, A., Lang, J., Dong, Y., Ercan, S., Kotwaliwale, C., Rechtsteiner, A., Appert, A., Chen, Q.B., Dose, A., Egelhofer, T., et al. (2012). H4K20me1 Contributes to Downregulation of X-Linked Genes for *C. elegans* Dosage Compensation. *PLOS Genet.* 8, e1002933.
- Villeneuve, A.M. (1994). A Cis-Acting Locus That Promotes Crossing over between X Chromosomes in *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* 136, 887–902.
- Voigt, P., Tee, W.-W., and Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.* 27, 1318–1338.
- Voo, K.S., Carlone, D.L., Jacobsen, B.M., Flodin, A., and Skalnik, D.G. (2000). Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2108–2121.
- Waddington, C.H. (1953). Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution* 7, 118–126.

Bibliographie

- Walter, D., Matter, A., and Fahrenkrog, B. (2014). Loss of Histone H3 Methylation at Lysine 4 Triggers Apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genet.* 10, e1004095.
- Walther, N., Hossain, M.J., Politi, A.Z., Koch, B., Kueblbeck, M., Ødegård-Fougner, Ø., Lampe, M., and Ellenberg, J. (2018). A quantitative map of human Condensins provides new insights into mitotic chromosome architecture. *J Cell Biol* 217, 2309–2328.
- Wang, J.C. (1998). Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q. Rev. Biophys.* 31, 107–144.
- Wang, G., and Reinke, V. (2008). A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Curr. Biol. CB* 18, 861–867.
- Wang, C., Liu, C., Roqueiro, D., Grimm, D., Schwab, R., Becker, C., Lanz, C., and Weigel, D. (2015a). Genome-wide analysis of local chromatin packing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 25, 246–256.
- Wang, S., Fisher, K., and Poulin, G.B. (2011). Lineage specific trimethylation of H3 on lysine 4 during *C. elegans* early embryogenesis. *Dev. Biol.* 355, 227–238.
- Wang, S., Zickler, D., Kleckner, N., and Zhang, L. (2015b). Meiotic crossover patterns: Obligatory crossover, interference and homeostasis in a single process. *Cell Cycle* 14, 305–314.
- Wang, W., Chaturvedi, A., Wang, M., An, S., Santhi Velayudhan, S., and Lee, S.S. (2018). SET-9 and SET-26 are H3K4me3 readers and play critical roles in germline development and longevity. *ELife* 7.
- Wang, X., Zhao, Y., Wong, K., Ehlers, P., Kohara, Y., Jones, S.J., Marra, M.A., Holt, R.A., Moerman, D.G., and Hansen, D. (2009). Identification of genes expressed in the hermaphrodite germ line of *C. elegans* using SAGE. *BMC Genomics* 10, 213.
- Wedeles, C.J., Wu, M.Z., and Claycomb, J.M. (2013). A multitasking Argonaute: exploring the many facets of *C. elegans* CSR-1. *Chromosome Res.* 21, 573–586.
- Weiner, A., Chen, H.V., Liu, C.L., Rahat, A., Klien, A., Soares, L., Gudipati, M., Pfeffner, J., Regev, A., Buratowski, S., et al. (2012). Systematic Dissection of Roles for Chromatin Regulators in a Yeast Stress Response. *PLOS Biol.* 10, e1001369.
- Weiser, N.E., Yang, D.X., Feng, S., Kalinava, N., Brown, K.C., Khanikar, J., Freeberg, M.A., Snyder, M.J., Csankovszki, G., Chan, R.C., et al. (2017). MORC-1 Integrates Nuclear RNAi and Transgenerational Chromatin Architecture to Promote Germline Immortality. *Dev. Cell* 41, 408–423.e7.
- Whetstone, J.R., Ceron, J., Ladd, B., Dufourcq, P., Reinke, V., and Shi, Y. (2005). Regulation of Tissue-Specific and Extracellular Matrix-Related Genes by a Class I Histone Deacetylase. *Mol. Cell* 18, 483–490.
- Wondrak, G.T., Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E.L., and Jacobson, M.K. (2000). Histone carbonylation in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 351 Pt 3, 769–777.
- Woodhouse, R.M., Buchmann, G., Hoe, M., Harney, D.J., Low, J.K.K., Larance, M., Boag, P.R., and Ashe, A. (2018). Chromatin Modifiers SET-25 and SET-32 Are Required for Establishment but Not Long-Term Maintenance of Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Cell Rep.* 25, 2259–2272.e5.
- Xiao, Y., Bedet, C., Robert, V.J.P., Simonet, T., Dunkelbarger, S., Rakotomalala, C., Soete, G., Korswagen, H.C., Strome, S., and Palladino, F. (2011). *Caenorhabditis elegans* chromatin-associated proteins SET-2 and ASH-2 are differentially required for histone H3 Lys 4 methylation in embryos and adult germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 8305–8310.

Bibliographie

- Xu, L., and Strome, S. (2001). Depletion of a Novel SET-Domain Protein Enhances the Sterility of *mes-3* and *mes-4* Mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **159**, 1019–1029.
- Xu, J., Sun, X., Jing, Y., Wang, M., Liu, K., Jian, Y., Yang, M., Cheng, Z., and Yang, C. (2012). MRG-1 is required for genomic integrity in *Caenorhabditis elegans* germ cells. *Cell Res.* **22**, 886–902.
- Xu, L., Fong, Y., and Strome, S. (2001). The *Caenorhabditis elegans* maternal-effect sterile proteins, MES-2, MES-3, and MES-6, are associated in a complex in embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 5061–5066.
- Xu, X., Nakazawa, N., and Yanagida, M. (2015). Condensin HEAT Subunits Required for DNA Repair, Kinetochore/Centromere Function and Ploidy Maintenance in Fission Yeast. *PLoS ONE* **10**.
- Yang, X.-J., and Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 206–218.
- Yang, H., McNally, K., and McNally, F.J. (2003). MEI-1/katanin is required for translocation of the meiosis I spindle to the oocyte cortex in *C. elegans*☆. *Dev. Biol.* **260**, 245–259.
- Yanowitz, J.L. (2008). Genome Integrity Is Regulated by the *Caenorhabditis elegans* Rad51D Homolog *rfs-1*. *Genetics* **179**, 249–262.
- Yoshida, M., Kudo, N., Kosono, S., and Ito, A. (2017). Chemical and structural biology of protein lysine deacetylases. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **93**, 297–321.
- Youds, J.L., O’Neil, N.J., and Rose, A.M. (2006). Homologous Recombination Is Required for Genome Stability in the Absence of DOG-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **173**, 697–708.
- Yuen, K.C., Slaughter, B.D., and Gerton, J.L. (2017). Condensin II is anchored by TFIIIC and H3K4me3 in the mammalian genome and supports the expression of active dense gene clusters. *Sci. Adv.* **3**.
- Yung, P.Y.K., and Elsässer, S.J. (2017). Evolution of epigenetic chromatin states. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **41**, 36–42.
- Zanetti, S., and Puoti, A. (2013). Sex Determination in the *Caenorhabditis elegans* Germline. In *Germ Cell Development in C. Elegans*, T. Schedl, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 41–69.
- Zarkower, D. (2006). Somatic sex determination. *WormBook Online Rev. C Elegans Biol.* 1–12.
- Zeller, P., Padeken, J., van Schendel, R., Kalck, V., Tijsterman, M., and Gasser, S.M. (2016). Histone H3K9 methylation is dispensable for *Caenorhabditis elegans* development but suppresses RNA:DNA hybrid-associated repeat instability. *Nat. Genet.* **48**, 1385–1395.
- Zhang, J., Jing, L., Li, M., He, L., and Guo, Z. (2019). Regulation of histone arginine methylation/demethylation by methylase and demethylase (Review). *Mol. Med. Rep.* **19**, 3963–3971.
- Zhang, L., Ward, J.D., Cheng, Z., and Dernburg, A.F. (2015). The auxin-inducible degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans*. *Development* **142**, 4374–4384.
- Zhao, X., Su, J., Wang, F., Liu, D., Ding, J., Yang, Y., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Cao, L., Wu, D., et al. (2013). Crosstalk between NSL Histone Acetyltransferase and MLL/SET Complexes: NSL Complex Functions in Promoting Histone H3K4 Di-Methylation Activity by MLL/SET Complexes. *PLOS Genet.* **9**, e1003940.
- Zhou, Z., Hartwig, E., and Horvitz, H.R. (2001). CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* **104**, 43–56.

Résumé

Étude de la fonction de l'histone méthyltransférase SET-2 et de ses interacteurs dans le maintien de la lignée germinale de *Caenorhabditis elegans*

Les modifications post-traductionnelles des histones contribuent à l'expression génique et à la stabilité du génome. La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me), une marque associée aux promoteurs de gènes transcrits, est déposée par les méthyltransférases hautement conservées de la famille SET1, dans le contexte du complexe COMPASS. SET-2, l'homologue de SET1 chez *Caenorhabditis elegans*, est responsable de la déposition de H3K4me dans la lignée germinale, et son inactivation provoque une perte progressive de la fertilité. Le but de mon travail de thèse a été d'étudier comment SET-2 et la méthylation de H3K4 contribuent au maintien de la lignée germinale. J'ai montré que l'absence de SET-2 provoque une sensibilité accrue aux dommages à l'ADN. Cependant, les voies de signalisation et de réparation de ces dommages sont fonctionnelles dans le mutant *set-2*. Par séquençage de l'ADN, j'ai par ailleurs montré que la stérilité progressive observée en l'absence de *set-2* n'est pas due à une capacité de réparation réduite. L'ensemble de mes résultats suggère que H3K4me pourrait agir en aval de la signalisation de dommages à l'ADN, en influençant l'organisation de la chromatine aux sites des cassures double brin. J'ai d'autre part mis en évidence une nouvelle fonction pour la méthylation de H3K4 dans l'organisation de la chromatine en montrant que *set-2* interagit génétiquement avec le complexe Condensine II et la Topoisomérase II, facteurs clefs de l'organisation mitotique des chromosomes. Des expériences de microscopie par FLIM-FRET ont d'ailleurs validé une fonction de H3K4 méthylée dans l'organisation de la chromatine dans la lignée germinale. Enfin, j'ai montré par analyses transcriptomiques que la protéine CFP-1 du complexe COMPASS est impliquée dans la régulation du programme transcriptionnel de la lignée germinale et que cette fonction est indépendante de SET-2. L'ensemble de mes résultats montre comment la régulation chromatinienne impacte le maintien d'une lignée germinale fonctionnelle à plusieurs niveaux.