



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **05 juillet 2021**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame DUJARDIN Audrey**

Titre de la thèse : *Identification de CDYL2 (Chromodomain on Y Like 2) en tant que protéine indispensable pour une mitose fidèle*

Résumé



Le nucléosome, la sous-unité de la chromatine, est constitué d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule l'ADN. Les histones sont sujets à de nombreuses modifications post-transcriptionnelles, ce qui a pour effet de modifier l'expression des gènes voisins. Les modifications d'histones sont également importantes pour la structure de la chromatine et la stabilité génomique de la cellule. C'est par exemple le cas de la triméthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me3), une modification enrichie au niveau de l'hétérochromatine constitutive qui comprend notamment les régions péricentromériques (Saksouk et al., 2015). Une suppression de cette modification est liée à l'instabilité génomique et à un manque de cohésion des chromosomes en métaphase (Peters et al., 2001).

La cohésion correcte des chromosomes est principalement réalisée par le complexe cohésine. Cohésine est recrutée sur le chromosome humain en phase G1 du cycle cellulaire et y est libérée en deux phases (Morales and Losada, 2018). Au début de la mitose, la cohésine située sur les bras des chromosomes est relâchée par la voie de la prophase, alors qu'au niveau des péricentromères, cohésine reste jusqu'au début de l'anaphase afin d'éviter une séparation prématurée des chromatides sœurs. L'interaction des kinétochores avec les microtubules lors de la mitose est également importante pour le déroulement d'une mitose fidèle. CHAMP1 (Chromosome Alignment Maintaining Phosphoprotein 1) est une protéine nécessaire à l'assemblage correct des kinétochores et à la stabilité des microtubules (Itoh et al., 2011). Une diminution de CHAMP1 provoque un défaut d'alignement des chromosomes.

Lors de ma thèse, j'ai étudié la fonction de CDYL2 (Chromodomain on Y Like 2), une protéine lectrice de H3K9me3. CDYL2 fait partie d'une famille de six protéines dont deux sont issues de gènes autosomaux. Les protéines de la famille CDYL ont deux domaines conservés : un chromodomaine qui leur permet d'interagir avec H3K9me3 (Fischle et al., 2008) et un domaine d'hydratase enoyl-CoA dont l'activité enzymatique permet à CDYL1 de catalyser la réaction de crotonyl-CoA en β -hydroxybutyryl-CoA (S. Liu et al., 2017). CDYL1 a également été révélé comme un répresseur de la transcription, notamment en recrutant des méthyltransférases d'histones (Abu-Zhayia et al., 2018; Mulligan et al., 2008). Enfin, il a été montré que CDYL1 est impliqué dans de nombreuses maladies comme la dépression, l'épilepsie ou encore certains cancers (Liu et al., 2019; Y. Liu et al., 2017a; Mulligan et al., 2008; Qi et al., 2014). **En revanche, CDYL2 reste une protéine très peu caractérisée et ce travail cherche à étudier sa fonction cellulaire.**

Avant mon arrivée dans l'équipe, certaines expériences ont révélé que CDYL2 était potentiellement impliqué dans la mitose puisqu'une diminution de son expression induit des défauts mitotiques, incluant un défaut d'alignement des chromosomes sur le plan équatorial pendant la métaphase et un manque de cohésion des chromosomes. Avec des marquages d'immunofluorescence, j'ai montré que CDYL2 est une protéine nucléaire située notamment au niveau des péricentromères grâce à H3K9me3. D'autres analyses ont permis de mettre en évidence la localisation des CDYL2 au niveau des centrosomes. Enfin, pour compléter la caractérisation de CDYL2, une coimmunoprécipitation suivie d'une analyse de spectrométrie de masse a permis de révéler une liste d'interacteurs de CDYL2. Parmi cette liste, j'ai retrouvé des protéines épigénétiques impliquées dans la répression de la transcription génique, des protéines membre du complexe cohésine, ainsi que CHAMP1.

Suite à ces premiers résultats, trois hypothèses ont été formulées quant aux mécanismes impliquant CDYL2 dans la mitose et la stabilité génomique :

CDYL2 est impliqué dans la répression de l'expression des répétitions satellites aux péricentromères. En interagissant avec EHMT2 ou SETDB1, trouvées dans la spectrométrie de masse et nécessaires pour la répression de l'expression des séquences satellites, CDYL2 pourrait recruter ces protéines sur la chromatine, au niveau des péricentromères, et ainsi participer à la répression des séquences satellites. L'instabilité génomique provoquée par une diminution de CDYL2 serait alors expliquée par une augmentation aberrante de l'expression des répétitions satellites.

CDYL2 participe à la régulation de la cohésion des chromosomes. En interagissant avec les protéines impliquées dans le complexe cohésine, CDYL2 pourrait par exemple participer au recrutement ou à la protection du complexe, notamment au niveau des régions péricentromériques. Une diminution de CDYL2 provoquerait une fragilité sur la cohésion des chromosomes et induirait ainsi des mitoses infidèles.

CDYL2 interagit avec CHAMP1 et lui est nécessaire pour la régulation des connections kinétochores-microtubules. Une diminution de CDYL2 inhiberait la fonction de CHAMP1 et phénotyperait une mutation de CHAMP1 : un mauvais alignement des chromosomes pendant la métaphase provoquée par un mauvais assemblage des kinétochores.

Pour la première hypothèse, j'ai pu confirmer l'interaction de CDYL2 avec EZH2 et SETDB1 par coimmunoprécipitation suivie de Western Blot. Cependant, un changement de l'expression de séquences répétitives péricentromériques n'a pas pu être observé avec une réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR). Une coimmunoprécipitation de chromatine (ChIP) suivie de qPCR n'a pas pu non plus révéler un changement de degré de méthylation de H3K9 au niveau des péricentromères après diminution de CDYL2. CDYL2 semble donc être dispensable pour la répression des séquences répétitives et satellites au niveau des péricentromères.

En parallèle, j'ai pu confirmer l'interaction de CDYL2 avec le complexe cohésine par coimmunoprécipitation et test de lien entre protéines (PLA). La localisation de cohésine au niveau des péricentromères pendant la mitose a pu être observé à l'aide d'un microscope confocal après immunomarquage. Cependant, malgré un manque de cohésion des chromosomes observé précédemment, une diminution de CDYL2 n'a pas semblé influencer la localisation de cohésine au niveau des péricentromères, suggérant que CDYL2, bien est dispensable au recrutement de cohésine au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique.

Enfin, j'ai pu également confirmer l'interaction de CDYL2 avec CHAMP1 par coimmunoprécipitation. Une perte de fonction de CHAMP1 induit une instabilité des microtubules mitotiques ainsi qu'un défaut de leur connexion aux kinétochores, ce qui provoque ensuite un défaut d'alignement des chromosomes sur le plan équatorial pendant la mitose. Bien que ce défaut d'alignement ait pu être observé après diminution de CDYL2, la stabilité des microtubules mitotiques et leur connexion aux kinétochores semblent préservés, indiquant que CDYL2 n'est pas nécessaire à la fonction de CHAMP1.

Pendant ma thèse, j'ai collaboré à l'étude de la fonction de CDYL2 dans le cancer du sein. J'ai montré par coimmunoprécipitation que CDYL2 interagit avec EHMT1 et EHMT2. En utilisant des inhibiteurs des activités enzymatiques de EHMT2 et EZH2, j'ai pu également révéler que l'activité enzymatique de EHMT2 est

nécessaire à la répression de l'expression de miR124 par méthylation de H3K9. Au final, l'étude a permis de conclure que CDYL2 recrute EHMT2 sur la région promotrice de miR124 et réprime son expression.

Dans l'ensemble, ma thèse a participé à l'élucidation de la fonction cellulaire de CDYL2. J'ai montré que CDYL2 est principalement nucléaire et se localise sur la chromatine au niveau des régions péri-centromériques grâce à la modification H3K9me3. Cette observation est dans la lignée des études *in vitro* précédemment menée sur la protéine qui montrait son affinité avec H3K9me3 (Fischle et al., 2008). Plus surprenante mais non moins intéressante est la localisation de CDYL2 au niveau des centrosomes pendant tout le cycle cellulaire. Reste à déterminer si cette localisation est dépendante d'une modification post-transcriptionnelle structurellement similaire à H3K9me3.

D'un point de vue fonctionnel, j'ai pu montrer que CDYL2 est une protéine indispensable au bon déroulé de la mitose. En étudiant les interacteurs de CDYL2, j'ai trouvé plusieurs candidats pouvant expliquer les phénotypes de mitoses infidèles observés après diminution de CDYL2. Ces candidats, comprenant EHMT2, SETDB1, le complexe cohésine ainsi que CHAMP1 ont tous pu être confirmé par une deuxième méthode, renforçant les premières observations. Cependant, malgré la fiabilité des techniques utilisées, un mécanisme reliant ses interactions avec la fonction de CDYL2 dans un contexte mitotique n'a pas pu être dévoilé. Des futures pistes de développement sont proposées dans ce travail afin d'explorer plus en avant la fonction cellulaire de CDYL2.

Dans le contexte de la cancérologie, provoquer une instabilité génomique est une stratégie qui est utilisée dans les traitements. Étant donné qu'une surexpression de CDYL2 profite aux tumeurs du sein en augmentant leur plasticité et leur agressivité (Siouda et al., 2020), une inhibition de CDYL2 dans ces tumeurs pourrait avoir un double intérêt thérapeutique : réduire l'agressivité et augmenter l'instabilité génomique des cellules cancéreuses, provoquant potentiellement leur mort.