

Université de Montréal

Mémoire intitulé

Études des mutations germinales sur l'histone H3.3 et l'enzyme ZMYND11 dans les troubles
neuro-développementaux

Par

Gayathri Yogarajah

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de
Montréal

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Biochimie

31 décembre 2022

© Yogarajah Gayathri, 2022

Université de Montréal
Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de
Montréal

Ce mémoire est intitulé

**Études des mutations germinales sur l'histone H3.3 et l'enzyme ZMYND11 dans les
troubles neuro-développementaux**

Présenté par

Gayathri Yogarajah

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Jacques Drouin, Président rapporteur

Dr. Serge McGraw, Directeur de recherche

Dr. Nada Jabado, Co-directrice

Dr Jacques Côté, Membre du Jury

Résumé

Les mutations somatiques sur le variant d'histone H3.3 et les régulateurs épigénétiques associés à H3.3 ont été identifiés dans 30 % des glioblastomes pédiatriques. Ces mutations sont caractérisées par des substitutions d'acides aminés à des positions spécifiques dans la région N-terminale de l'histone H3.3 telles que la glycine 34 en valine/arginine (G34V/R), l'alanine 29 en proline (A29P), ou une haplo-insuffisance de la protéine Zinc Finger MYND-Type Containing 11 (ZMYND11). ZMYND11 est un co-répresseur de la transcription qui se lie spécifiquement à H3.3K36me3 pour moduler l'activité de l'ARN polymérase II. De plus, il est intéressant de mentionner que l'interaction entre ZMYND11 et H3.3K36me3 est altérée lorsque le résidu G34 est muté en G34V. Récemment, les mutations germinales H3.3G34V, H3.3A29P et ZMYND11 ont été identifiées chez des patients présentant une déficience neurologique. Nous émettons l'hypothèse que les mutants H3.3G34V et H3.3A29P empêchent ZMYND11 de se lier à H3.3K36me3 et pourrait converger mécaniquement avec la perte de fonction de ZMYND11, ce qui perturberait la neurogenèse. À l'aide de la technologie CRISPR Cas9, nous avons généré des modèles mutants isogéniques à partir de cellules souches pluripotentes (iPSC) pour H3F3B-A29P, H3F3B-G34V et ZMYND11-knock-out (KO). Par la suite, nous avons stimulé la différenciation de ces modèles vers des lignées neuronales afin d'identifier si ces mutations affectent la neurogenèse. Enfin, en utilisant des méthodes de séquençage à haut-débit nous avons analysé le profil épigénomique et transcriptomique pour déterminer comment l'interaction entre ZMYND11 et H3K36me3 est perturbée et à quels degrés ces mutations impactent sur les modifications post-traductionnelles des histones. Ce projet permettra de mieux comprendre les fonctions de ZMYND11 sur le remodelage de la chromatine et sa fonction biologique au cours du développement cérébral.

Mots-clés : ZMYND11, Déficience intellectuelle, Épigénétique, Modifications des histones, Expression génique, Cellule souches pluripotentes, Neurogenèse, Organoïdes cérébraux.

Abstract

Somatic mutations on the histone 3 variant H3.3 and H3.3-associated chromatin modifiers have been identified in 30% of pediatric high-grade gliomas (pHGG). The mutations are characterized by amino acid substitutions at specific positions within the histone H3.3 tail such as glycine 34 to valine/arginine (G34V/R), alanine 29 to proline (A29P), or haploinsufficiency of the chromatin reader Zinc Finger MYND-Type Containing 11 (ZMYND11). ZMYND11 is a transcriptional co-repressor that specifically reads H3.3K36me3 to modulate RNA polymerase II activity. Notably, binding of ZMYND11 to H3.3K36me3 is altered when G34 residue is mutated to G34V. Recently, germline mutations of H3.3G34V, H3.3A29P, and ZMYND11 have been identified in patients with Intellectual disability. We hypothesize that H3.3 G34V and H3.3A29P mutants impede the binding of ZMYND11 to H3.3K36me3 and may mechanistically converge with ZMYND11 loss-of-function mutation to perturb neurogenesis. Using CRISPR Cas9-mediated gene editing, we will generate isogenic human induced pluripotent stem cell (iPSC) models for H3F3B-A29P, H3F3B-G34V and ZMYND11-KO, and perform *in vitro* neural differentiation to identify whether specific neural lineages are affected. Next, using epigenomic and transcriptomic profiling we will study whether binding between ZMYND11 and H3K36me3 is disrupted, and the downstream impact on Post-Translational Modifications of histones (PTMs) and transcription. This project will lead to a better understanding of the crucial role of the chromatin reader ZMYND11 on chromatin remodeling and the biological function during neural development.

Keywords : ZMYND11, Intellectual disability, Histone modifications, Gene expression, Pluripotent stem cell, Neurogenesis, Brain organoids.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Liste des sigles et abréviations	9
Remerciements.....	13
Chapitre 1 – Introduction	15
1. Préambule	15
2. L'Épigénétique	15
2.1. La structure de la chromatine et les protéines associées aux histones	15
2.2. Caractéristiques du variant H3.3	18
2.3. Les modifications post-traductionnelles (PTMs) sur l'histone H3.3.....	18
3. Élongation transcriptionnelle durant le développement du cerveau.....	20
3.1 Rôle de H3K36 lors de l'élongation de la transcription	20
3.2 ZMYND11 : un régulateur épigénétique spécifique à H3.3K36me3.....	21
3.3 ZMYND11 un régulateur transcriptionnel.....	21
4 Des modifications sur l'histone H3.3 affectent l'interaction de ZMYND11 sur H3.3K36me3	23
4.1 L'importance de la sérine 31 sur la liaison de ZMYND11 à H3.3K36me3	23
4.2 H3G34V ; un perturbateur sur certains régulateurs épigénétiques.....	24
5. Dérégulations épigénétiques au cours du développement cérébral	26
5.1 Mutations somatiques sur les histones H3.3 et ZMYND11 responsables de tumeurs cérébrales.....	26
5.2 Mutation germinale sur ZMYND11 : à l'origine d'un trouble neuro-développemental	28
5.3 Mutation germinale sur l'histone H3.3 responsables des troubles du développement.....	31
6. Modélisation des troubles neuro-développementaux	32
6.1 Utilisation des cellules iPS humaines pour étudier les malformations cérébrales .	32

Problématique :	36
Hypothèse :	37
Objectif du projet de recherche :	37
Chapitre 2 – Matériel et Méthodes	38
1. Culture des hiPSCs	38
2. Génération de lignées cellulaires iPS isogéniques :	38
3. Différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules neuronales	40
4. Génération des organoïdes de cerveaux à partir des cellules hiPS	41
5. Immunofluorescence	43
6. Western Blot	45
7. Analyse du transcriptome par RNA-seq	46
8. Protocole de CHIP-seq	46
9. Analyse des marques d’histones par CHIP-seq	47
Chapitre 3 – Résultats	48
Objectif 1 - Modélisation des troubles neuro-développementaux dans les hiPSC	48
1. Génération des mutants isogéniques par CRISPR-Cas9	48
2. Validation des mutations générées par CRISPR-Cas9	49
Objectif 2 : Études des mutations épigénétiques sur un modèle de culture 3D	54
Objectif 3 : Impact des mutations germinales sur H3F3B et ZMYND11 au niveau épigénomique et transcriptomique	60
1. Perte de liaison de ZMYND11 à H3K36me3 dans les modèles mutants	60
2. Analyse du transcriptome des mutants ZMYND11-KO, H3.3G34V et H3.3A29P dans les cellules iPS	64
3. Analyse du transcriptome des mutants ZMYND11-KO au stade de cellules NPC	67
Chapitre 4 – Discussion	71
Chapitre 5 – Conclusion	79
Chapitre 6 – Perspectives	81
Annexes	86
Differentiation media from hiPS cells to neurons	86
Differentiation media from hiPS cells to cerebral organoids	89
Références bibliographiques	92

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Liste des oligos pour ZMYND11 (5' vers 3').....	48
Tableau 2. –	Liste des oligos pour les mutants H3.3A29P et H3.3G34V (5' vers 3')	51
Tableau 3. –	Liste des Anticorps primaires et secondaires.....	85

Liste des figures

Figure 1. – Représentation de la chromatine et ses modifications épigénétiques qui la gouverne- Extrait de <i>The New England journal of medicine</i> , (2020) [12].....	17
Figure 2. – Déficience intellectuelle liée à ZMYND11-Tirée de <i>Human mutation</i> , (2020)[56] .	29
Figure 3. – Les organoïdes cérébraux, un modèle pertinent pour étudier la neurogenèse humaine-Extrait de <i>Nature Reviews Neurology</i> , (2022)[69].	33
Figure 4. – Illustration de l’impact des mutations sur l’histone H3.3 et la perte de fonction de ZMYND11 sur la transcription.....	35
Figure 5. – Validation des mutants ZMYND11-KO générés par CRISPR-Cas9	50
Figure 6. – Validation des mutants KI-H3F3B-G34V et KI-H3F3B-A29P générés par CRISPR-Cas9	52
Figure 7. – Illustration d’un organoïde cortical.....	55
Figure 8. – Modélisation des organoïdes cérébraux à partir des modèles iPSC mutants.....	56
Figure 9. – Expression de Sox2 dans les organoïdes cérébraux H3F3B-G34V à 30 jours	59
Figure 10. – Enrichissement de ZMYND11 sur le génome.....	61
Figure 11. – Profile des marques d’histones sur le génome dans les mutants iPS isogéniques.	62
Figure 12. – Impact de la mutation H3.3G34V sur ZMYND11 et la tri-méthylation de H3K36...	63
Figure 13. – Résultats de RNA-seq pour les mutants ZMYND11-KO et H3F3B au stade iPSC	65
Figure 14. – Résultats de RNA-seq pour les mutants ZMYND11 au stade NPC.....	68
Figure 15. – Impacte de la perte de fonction de ZMYND11 et les mutations sur l’histone H3.3 au cours de la neurogenèse	80
Figure 16. – Protocole de différenciation des cellules iPS vers la lignée neuronale	87
Figure 17. – Caractérisation des organoïdes cérébraux	90

Liste des sigles et abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ARN pol II: ARN polymérase II

ARNm: ARN messenger

ATRX: Alpha-Thalassemia/mental Retardation syndrome, X-linked

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor,

BHLHE40: Basic Helix-Loop-Helix Family Member E40

BST2: Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2

Cas 9: CRISPR associated protein 9

CBP/p300: CREB binding protein/p300

CCDC141: Coiled-Coil Domain Containing 141

CHAC1: ChaC Glutathione Specific Gamma-Glutamylcyclotransferase 1

ChIP: Chromatin immunoprecipitation

CNTNAP5: Contactin Associated Protein Family Member 5

COL2A1: Type II collagen

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DAPI: 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole

DAXX: Death domain associated protein 6

DEG: Differentially expressed genes

DMBX1: Diencephalon/Mesencephalon Homeobox 1

DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium

EFTUD2: Elongation Factor Tu GTP Binding Domain Containing 2

EZH2: Enhancer of zeste homolog 2

FGF21: Fibroblast Growth Factor 21

FGF2: Fibroblast growth factor 2

GABA: Gamma-aminobutyric acid

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis

Gsx2: GS Homeobox 2

gRNA Guide RNA

HAT: Histone Acetyltransferase

HDR: Homology directed repair

hESC: Human Embryonic stem cells

hiPSC Human Induced Pluripotent stem cells

HIRA: Histone cell cycle regulator A

HMT: Histones méthyltransférases

H2A : Histone H2A

H2B: Histone H2B

H4: Histone 4

H3 : Histone 3

H3K27ac : acétylation de la lysine 27 de l'histone 3

H3K27me3 : tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone 3

H3K36me3 : tri-méthylation de la lysine 36 de l'histone 3

Hes5: Hes Family BHLH Transcription Factor 5

KI: Knock-in

KO: Knock-out

KSR: Knockout Serum

LMO3 : LIM Domain Only 3

LoF: Loss of fonction (mutations causant la perte de fonction d'une protéine)

MAP2: Microtubule Associated Protein 2

MEF2C: Myocyte Enhancer Factor 2C

mESC: Mouse Embryonic stem cells

MFDM : Mandibulofacial dysostosis with microcephaly

MyoD1: Myogenic Differentiation 1

NeuN: Neuronal nuclei

NeuroD4: Neuronal Differentiation 4

NPC: Neural progenitor cells

NPTX1: Neuronal Pentraxin 1

NSD1 Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1

NSD2: Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2

Pax3: Paired box gene 3

Pax6: Paired box gene 6

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

PBS: Phosphate buffered saline

PBST: Phosphate Buffered Saline Tween

PcG: Polycomb group

PCR: Polymerase chain reaction

PDGFRA: Platelet-derived growth factor receptor alpha

pHGG: Pediatric high-grade glioma

PHD: Plant homeodomain

PRC1: Polycomb repressive complex 1

PRC2: Polycomb repressive complex 2

PRPF8: Pre-mRNA Processing Factor 8)

PTMs: Modification post-traductionnelle

PWWP: Domaine faisant référence a la région '**Pro-Trp-Trp-Pro**'.

RNA ribonucleic acid

RNA-Seq RiboNucleic Acid Sequencing

RPKM: reads per kilobase of exon per million reads mapped

RT-PCR: Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SETD2: SET Domain Containing 2

shRNA: small hairpin RiboNucleic Acid

snRNP: Small nuclear ribonucleoproteins

SOCS: Suppressor of cytokine signaling

Sox8: SRY-Box Transcription Factor 8

Sox2: SRY-Box Transcription Factor 2
ssODN: single-stranded donor oligonucleotide
SPTSSB: Serine Palmitoyltransferase Small Subunit B
SRRM2: Serine/Arginine Repetitive Matrix 2
SVZ subventricular zone
S100A6: S100 Calcium Binding Protein A6
Tbx3: T-Box Transcription Factor 3
TLR4: Toll-like receptor 4
TP53: Tumor protein P53
Tuj1: Tubuline β III - Clone TUJ1
TSS: Transcription starting site
ULBP1: UL16 Binding Protein 1
WT: Wild Type
ZMYND11: Zinc Finger MYND-Type Containing 11

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Serge McGraw, qui a été d'un grand soutien non seulement dans mon parcours académique, mais aussi dans les tempêtes de neige. Merci Serge pour tes encouragements, tes conseils et d'avoir été à mon écoute, j'ai eu l'occasion d'explorer et approfondir mes connaissances dans l'épigénétique et le développement cérébral. Cet apprentissage m'aura permis de devenir une meilleure chercheuse. Je remercie évidemment la Dream-team pour l'environnement de travail si chaleureux.

Un grand merci à Karine et Elizabeth pour votre accueil chaleureux au sein du labo, vos conseils et votre temps lors de nos échanges scientifiques. Anthony et Alva !! Merci pour votre contribution dans ce projet et surtout pour votre temps et les efforts dans les analyses Bio-info, c'est un réel plaisir de travailler avec vous les copains ! Gil thank you for being always present for beer hour!!

Je tiens également à remercier les membres externes du Jury, le Dr. Nada Jabado et le Dr Jacques Côté, ainsi que le Dr. Jacques Drouin, le Président du Jury pour avoir accepté de prendre le temps de lire et d'évaluer mon travail de maîtrise.

Je souhaite tout particulièrement remercier le Dr. Nada Jabado qui m'a accueillie à bras ouverts dans son laboratoire lorsque je suis arrivée à Montréal en 2019. Nada, tu m'as fortement encouragée à reprendre mes études et tu as été un excellent mentor, c'est pourquoi je te suis extrêmement reconnaissante car sans toi cette histoire n'aurait pas vu le jour, alors merci d'avoir cru en moi. Je remercie également toute l'équipe du Dr. Nada Jabado et tout particulièrement le Dr. Carol Chen avec qui ça a été un honneur de collaborer. Merci Carol pour la qualité de nos débats scientifiques et de m'avoir transmis tes connaissances, je repars plus enrichi qu'à mon arrivée. Enfin, j'espère que cette collaboration fera l'objet d'une future publication commune entre les deux laboratoires.

Je tiens à remercier mes amis Carol, Shriya, Augusto, et Pariya qui font partie des plus belles rencontres que j'ai eu l'occasion de faire au cours de cette aventure. Merci à Carol et Shriya pour les sorties improvisées, les séances de tennis et les découvertes culinaires ! Augusto et Pariya, mes BFFs !! Un grand merci les amigos pour les fous rires, les potins et surtout les pauses café !!

Un grand merci à toi mon poto Djihad, Il aura suffi d'un verre pour me faire quitter ma belle France !! Merci d'avoir cru en moi et pour m'avoir redonné goût à la science ! Ma grande sœur de cœur Lata pour ton optimisme infaillible et ta sagesse surtout dans mes pires journées. A Geoffroy et Amel, pour votre bonne humeur et surtout la positivité que vous m'avez transmis pendant cette période de rédaction.

J'aimerais maintenant remercier tout mon entourage de m'avoir soutenue, de près et de loin. Mes amies d'enfance, Marieke et Floriane, mes sœurs de cœur qui me supportent maintenant depuis seize ans !! Un grand merci à vous mes copines d'amour d'être toujours là quand il le faut et d'être venues me voir au Canada ! Malgré la distance, rien n'a changé entre nous, je vous aime tellement ! Dorine, la femme de ma vie, mon binôme particulier !

Ma famille d'accueil du Canada ; Floriane, Luana et Benoît, merci pour votre bonne humeur et le partage de notre passion commune pour les escapes games ! Merci au reste de la gang qui se reconnaîtront pour tous les supers moments partagés ensemble !

Le meilleur pour la fin, je remercie ma famille. Merci maman et papa pour votre amour, vous êtes ma force, mon inspiration et un exemple à suivre pour moi, je suis devenue la personne que je suis grâce à vous. Mon frère Mathavan, ma belle-sœur Maeva et mon neveu d'amour Tiago pour leur soutien incontestable ! Enfin, ma grand-mère qui m'a toujours aspirée à devenir une femme libre et indépendante.

Chapitre 1 – Introduction

1. Préambule

Mon projet de maîtrise a été réalisé sur la thématique de la déficience intellectuelle sous la direction du Dr Serge McGraw et la co-direction du Dr Nada Jabado. Le travail et les résultats présentés portent d'une part sur l'utilisation de la technique du CRISPR-Cas9 sur des cellules souches humaines pluripotentes, afin de générer un modèle cellulaire représentant les mutations d'intérêt impliquées dans les troubles intellectuels. D'autre part, le séquençage à haut débit, va nous permettre de mettre en évidence l'impact de ces mutations sur le remodelage du génome. Enfin, grâce au potentiel de différenciation des cellules souches, il a été possible de caractériser l'impact de ces diverses mutations sur l'organisation structurale des organoïdes de cerveaux.

2. L'Épigénétique

L'épigénétique est l'étude des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN. Au cours du développement normal, la structure du génome subit des changements qui sont générés par des modifications sur des protéines nucléaires (histones), de l'ADN et de l'ARN [1, 2]. La perturbation de ces modifications épigénétiques peut contribuer à des altérations génomiques et provoquer une activation ou une inactivation anormale des gènes, conduisant ainsi à des cancers ou à des syndromes développementaux [3-5].

2.1. La structure de la chromatine et les protéines associées aux histones

Le matériel génétique est organisé sous forme d'un complexe de 146 paires de bases d'ADN double brin enroulé autour d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3 et H4), appelé nucléosome. La structure de la chromatine peut être soit condensée (hétérochromatine), et être associée à une répression de la transcription, soit ouverte et appelée l'euchromatine, qui est la forme transcriptionnellement active de la chromatine [6].

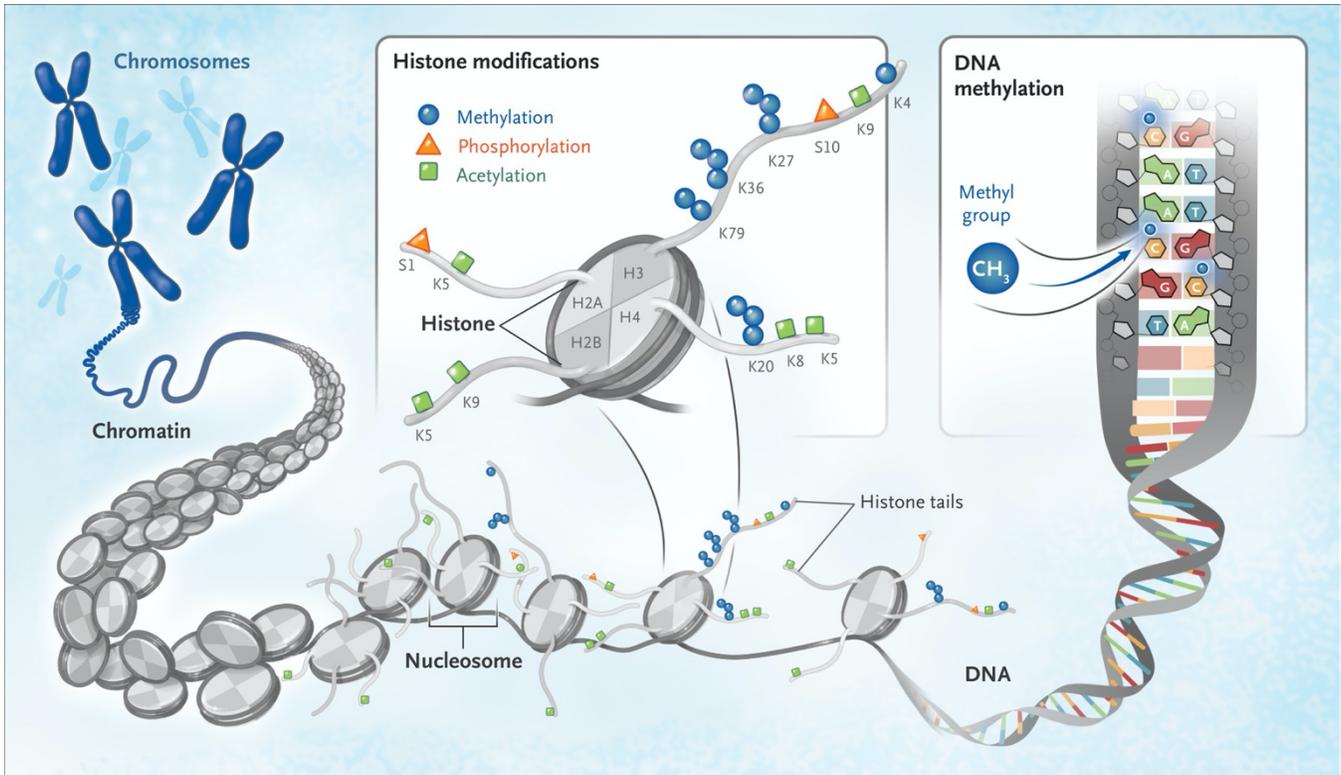
Au cours du développement le remodelage de la structure de la chromatine, et plus précisément l'accessibilité à la transcription, est régulé par des modifications se produisant à des moments et à des endroits précis du génome. La régulation du niveau de compaction de la chromatine stimule le recrutement de protéines spécifiques aux histones qui, à leur tour, vont moduler la machinerie de signalisation sur des sites génomiques spécifiques pour réguler l'expression des gènes [7, 8].

Le mécanisme responsable du remodelage de la chromatine implique des modifications sur les régions accessibles N-terminales des histones. Ces régions N-terminales des histones subissent des modifications appelées modifications post-traductionnelles (PTMs), qui consistent à apporter une modification chimique sur des acides aminés clés, par des enzymes [9].

Les principales modifications post-traductionnelles des histones connues sont : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitylation. Ces PTMs vont établir un code épigénétique qui va se mettre en place soit de manière provisoire ou de façon stable sur des régions du génome (Fig. 1).

Les marques d'histones, déposées par des complexes enzymatiques spécifiques, sont ensuite reconnues par des protéines régulatrices de la chromatine [10], qui vont réguler l'expression des gènes et jouer un rôle majeur dans la détermination du destin cellulaire.

Les variantes d'histone sont associées à la régulation transcriptionnelle, à la réparation de l'ADN et à la différenciation cellulaire. Parmi eux, le variant d'histone H3.3 fait partie de ces régulateurs épigénétiques importants dans la régulation de la transcription [11].



**Figure 1. – Représentation de la chromatine et ses modifications épigénétiques qui la gouverne-
Extrait de *The New England journal of medicine*, (2020) [12].**

Figure 1: Les modifications épigénétiques représentent des groupements tels que l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation, qui viennent se déposer sur certaines régions du génome pour bloquer ou initier l'expression d'un gène donné, sans modifier la séquence de l'ADN. Ces modifications épigénétiques ont lieu sur l'ADN ou sur des protéines associées à l'ADN, et elles sont ajoutées au niveau du génome par des enzymes appelées « writers » et « erasers ». D'autres protéines, appelées « readers », reconnaissent la modification épigénétique et régulent l'expression de certains gènes.

2.2. Caractéristiques du variant H3.3

L'histone H3 a plusieurs variantes, les histones canoniques H3.1 et H3.2 qui sont synthétisés et intégrés au génome uniquement au cours de la phase S du cycle cellulaire, tandis que la protéine H3.3 non canonique, est une variante synthétisée tout au long du cycle cellulaire, de manière indépendante à la réplication de l'ADN [13]. L'histone H3.3 est codée par seulement deux gènes contrairement aux histones H3.1 et H3.2, qui sont codés par plusieurs copies géniques.

Au cours du développement, H3.1 et H3.2 sont remplacés par le variant H3.3 sur des sites spécifiques du chromosome, afin de faciliter l'accessibilité à la chromatine et permettre la transcription des gènes actifs. En effet, le variant H3.3 est déposé par le complexe régulateur d'histone A (HIRA) sur les régions peu denses de la chromatine ; l'euchromatine. Tandis que la protéine death-domain associated protein (DAXX) et le complexe alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked (ATRX), vont favoriser l'accumulation de H3.3 dans l'hétérochromatine au niveau des centromères et des télomères [14].

La séquence d'acides aminés de l'histone non canonique H3.3 diffère de quatre acides aminés avec H3.2 (aux positions 31, 87, 89 et 90) et de cinq acides aminés avec H3.1 (les mêmes résidus que H3.2 avec une différence supplémentaire à l'acide aminé 96) [13].

2.3. Les modifications post-traductionnelles (PTMs) sur l'histone H3.3

L'histone H3.3 est codée par deux gènes : le gène *H3F3A* sur le chromosome 1 et le gène *H3F3B* sur le chromosome 17. Les résidus de l'histone H3.3 sont sujets à des modifications post-traductionnelles (PTM), telles que la méthylation, qui se produisent souvent au niveau des résidus de la lysine et sont catalysées par les histones méthyltransférases (HMT). Ces résidus peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés (me1, me2 ou me3) et l'effet de la méthylation sur l'expression des gènes dépend du résidu qui est modifié [15].

Les protéines du groupe Polycomb (PcG) sont des facteurs épigénétiques importants dans le maintien répressif de la transcription. Parmi eux, PRC2 (Polycomb repressive complex 2) est une histone méthyltransférase (HMT) retrouvée au niveau de régions régulatrices connues sous le nom de promoteurs riche en îlots CpGs [16]

PRC2 est l'histone méthyltransférase qui catalyse l'ajout de groupement mono-, di et tri-méthyle sur la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me_{1/2/3}), le long de la chromatine via sa sous-unité catalytique EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2), pour ainsi réprimer la transcription de certains gènes [17, 18].

PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1), un autre complexe du groupe des Polycomb, qui reconnaît la marque épigénétique H3K27me₃, vient renforcer le recrutement de PRC2 sur la chromatine pour contribuer au compactage de la chromatine et réprimer la transcription [19].

Pour empêcher que la marque répressive de méthylation H3K27 se propage librement, d'autres empreintes sur la chromatine vont venir antagoniser la fonction de PRC2 [20]. Les marques de di et tri-méthylation de H3K36 (H3K36me_{2/3}) et la marque épigénétique H3K27ac, associées à une transcription active, ont été identifiées comme des modifications de la chromatine qui limitent la progression de la méthylation sur H3K27 par PRC2 [21].

NSD1 et NSD2 (Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1 and 2) sont les méthyltransférases responsables de la mono- et la di-méthylation de H3K36 (H3K36me_{1/2}). Il a été démontré que H3K36me₂ a une large distribution dans les régions intergéniques et intragéniques du génome, tandis que H3K36me₃ médiée par l'histone méthyltransférase SETD2 (SET domain containing 2), est enrichie dans les régions codantes du génome et est fortement associée à une transcription active [22, 23].

Les histones acétyltransférases p300 et son homologue CBP (CREB binding protein) forment ensemble un complexe qui vient déposer la marque d'acétylation principalement sur les résidus de lysine pour promouvoir une transcription active. L'acétylation sur la Lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac) se retrouve sur les régions promotrices et amplificatrices du génome [24, 25]. Il s'agit d'une marque intéressante dans le cadre de ce projet du fait que de récentes études ont montré que l'activité de p300/CBP était stimulée lorsque l'histone H3.3S31 est phosphorylé, permettant la déposition de la marque H3K27ac au niveau des « enhancers » pour promouvoir la différenciation cellulaire [26].

Ainsi, lorsque les marques d'histone associées à une transcription active sont déposées sur le génome, l'activité de PRC2 est diminuée, ce qui contribue à l'augmentation de H3K27ac et H3K36me_{2/3} et rend ces marques de méthylation mutuellement exclusives [27-29].

3. Élongation transcriptionnelle durant le développement du cerveau

3.1 Rôle de H3K36 lors de l'élongation de la transcription

La méthylation de l'histone H3K36 est impliquée dans de nombreux processus, notamment la régulation transcriptionnelle, l'épissage alternatif, la méthylation de l'ADN et la réparation de l'ADN. Le dépôt de la marque de méthylation sur H3K36 permet d'augmenter l'accès à la chromatine et le recrutement de protéines qui vont reconnaître ces marques actives dans le but de réguler la transcription [30].

Chez la levure, Set2, la seule méthyltransférase de H3K36, catalyse les trois états de méthylation sur H3K36. Set2 interagit avec Rpb1, la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (ARN Pol II), qui contient un domaine C-terminal (CTD) phosphorylée en Ser2-P, pour initier la méthylation de la chromatine et promouvoir l'élongation transcriptionnelle [31, 32].

Plus récemment, il a été démontré dans plusieurs études, que SETD2 est couplé à l'élongation transcriptionnelle via son interaction avec le domaine C-terminal de l'ARN Pol II. En effet, lors de l'élongation de la transcription, le domaine CTD de l'ARN polymérase II, subit une phosphorylation au niveau de la sérine-2, ce qui favorise le recrutement de nombreux facteurs y compris l'histone méthyltransférase SETD2 sur les sites de transcription. Grâce à cette association, SETD2 va déposer la marque H3K36me₃ le long des régions codantes et promouvoir la transcription [33-35].

3.2 ZMYND11 : un régulateur épigénétique spécifique à H3.3K36me3

De récentes études ont montré que ZMYND11, un facteur épigénétique spécifique de H3.3K36me3, reconnaît spécifiquement l'histone H3.3 via la sérine 31 et co-localise avec H3.3K36me3 sur les régions codantes du génome. ZMYND11 contient plusieurs domaines, dont un homéo-domaine PHD, un domaine Bromo, un domaine PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) et un domaine MYND. L'interaction entre ZMYND11 et H3K36me3 a été décrite grâce à des études de cristallographie de ces différents domaines [36].

La marque de tri-méthylation sur H3.3K36 vient s'intégrer dans la cage aromatique du domaine PWWP de ZMYND11. La sérine 31 de l'histone H3.3 a également son importance puisqu'elle se lie au domaine Bromo de ZMYND11. Le nombre élevé de liaisons hydrogène entre l'histone H3.3K36me3 et les domaines PWWP-Bromo jouent un rôle majeur dans la spécificité de ZMYND11 pour l'histone H3.3K36me3 [36].

3.3 ZMYND11 un régulateur transcriptionnel

La protéine ZMYND11 a également été décrite comme un régulateur de l'épissage de l'ARN pré messager pendant l'étape de l'élongation, en tant que co-répresseur transcriptionnel, via la modulation de l'activité de l'ARN Pol II. Étant donné que ZMYND11 et H3K36me3 co-localisent ensemble sur les régions actives du génome, il a été suggéré que ZMYND11 pourrait être impliquée dans la régulation de l'expression de certains gènes en ralentissant l'activité de la transcription. En effet, la présence de l'ARN Pol II est corrélée avec celle de ZMYND11 au niveau des régions codantes [37].

L'inactivation de ZMYND11 dans les cellules d'ostéosarcome U2OS entraîne une augmentation de l'activité de l'ARN Pol II, ce qui suggère bien que ZMYND11 réduit l'activité de celle-ci au niveau des régions codantes. Pour renforcer cette théorie, en 2014, Guo et al., ont extrait de l'ARNm à partir de cellules HeLa préalablement traitées avec un shRNA dirigé contre ZMYND11. Ils ont effectué une RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) avec des amorces spécifiques qui reconnaissent les régions sujets à l'épissage alternatif, afin de mesurer le niveau d'ARNm et montré que ZMYND11 est impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif en se liant à des facteurs d'épissage tels que ETFUD2. Ainsi, ils ont identifié 61 évènements de rétention d'introns [37].

L'épissage alternatif est un processus finement régulé dans le but de générer une grande variété de transcrits codants. Parmi les différents modes d'épissage alternatif, la rétention d'introns reste un processus à étudier. La rétention d'introns se produit lorsqu'un intron est inclus dans un ARN pré-messager, et reste dans l'ARNm final. Elle est associée à la différenciation cellulaire et le cycle cellulaire et entraîne une faible production de protéines [38, 39]

Si ZMYND11 est impliquée dans la répression de l'activité de l'ARN Pol II, et plus spécifiquement dans la rétention d'introns, l'ARNm contiendra des codons stop prématurés (PTC pour premature termination codon) entraînant des séquences d'ARNm incomplètes, ce qui aura un impact sur l'expression des gènes précisément régulés par ZMYND11. La rétention d'introns est un moyen de contrôler la production de transcrits et ainsi réguler l'expression de certains gènes [40, 41].

Le taux d'ARN polymérase II au cours de l'élongation est déterminant dans la régulation de l'épissage alternatif. En utilisant des cellules souches embryonnaires de souris (mESC), il a été démontré dans les neurones qu'une réduction du taux d'élongation de la transcription altère l'expression des gènes impliqués dans la voie synaptique. Les dysfonctionnements synaptiques sont associés à divers troubles neurologiques, comprenant à la fois des troubles neuro-développementaux et des maladies neurodégénératives [42].

ZMYND11 se lie spécifiquement à H3.3K36me3, localisée sur les régions codantes, et réprime l'activité d'élongation de l'ARN Pol II sur les gènes activement transcrits. Par conséquent, une mutation sur ZMYND11 ou une altération de sa liaison sur H3.3K36me3 pourrait avoir un impact sur l'activité de l'ARN Pol II et, par conséquent, augmenter la transcription des gènes neuronaux.

4 Des modifications sur l'histone H3.3 affectent l'interaction de ZMYND11 sur H3.3K36me3

Comme décrit précédemment, la sérine 31 et la tri-méthylation de H3.3K36 jouent un rôle important dans la reconnaissance de l'histone H3.3K36me3 par ZMYND11. En revanche, la phosphorylation au niveau de la sérine 31 sur l'histone H3.3 et la substitution d'acide aminé sur la glycine 34 préviennent la liaison de ZMYND11 sur H3.3K36me3 [36, 43].

4.1 L'importance de la sérine 31 sur la liaison de ZMYND11 à H3.3K36me3

Une des différences majeures entre les peptides H3.3 avec H3.2 et H3.1 est l'acide aminé en position 31. Alors que l'histone H3.3 arbore une sérine en position 31 (H3.3S31), H3.2 et H3.1 possèdent une alanine. Il a été démontré que la spécificité de ZMYND11 à se lier sur l'histone H3.3 par rapport à H3.1 repose sur les liaisons hydrogènes. En effet, l'histone H3.1A31 entraîne une perte de liaisons d'hydrogène et une mauvaise encapsulation de H3.3K36me3 avec ZMYND11 par rapport à H3.3S31 [36, 43].

Par ailleurs, la phosphorylation (ph) de l'histone H3.3 au niveau de la sérine 31 a été décrite comme étant impliquée dans des modifications épigénétiques telles que l'amplification de la tri-méthylation de K36. Il a été démontré que H3.3S31ph joue un rôle dans la régulation des gènes inflammatoires en conformité avec H3K36me3, une marque épigénétique impliquée dans la transcription active. En effet, la stimulation de macrophages murins entraîne une augmentation de la phosphorylation de H3.3S31 au niveau des régions codantes où se co-localise H3K36me3. Lorsque H3.3S31 est phosphorylé, il y a un recrutement plus important de SETD2 qui vient déposer la marque de tri-méthylation sur la lysine 36 et favoriser « l'éjection » du co-répresseur ZMYND11 afin d'augmenter l'activité de la machinerie transcriptionnelle sur les gènes impliqués dans la réponse immunitaire [43].

L'alanine 29 sur l'histone H3.3 est un résidu proche de la sérine 31. Très peu d'informations concernant ce résidu sont disponibles, notamment au sujet de son importance dans l'interaction de ZMYND11 avec H3K36me3. Néanmoins, il est connu que l'alanine 29 sur H3.3 est impliquée dans la liaison hydrogène entre l'histone H3.3 et le domaine Bromo-PWWP de ZMYND11 [36]. Une autre étude a montré que la substitution de l'alanine en proline impacte peu sur l'activité de SETD2 et diminue légèrement la tri-méthylation de H3K36 [44].

Cependant, l'impact d'une mutation sur un résidu proche de la sérine 31, tel que l'alanine 29, sur l'interaction de ZMYND11 avec H3K36me3 est à ce jour inexploré.

4.2 H3G34V ; un perturbateur sur certains régulateurs épigénétiques

Les premières études menées sur les mutations H3G34R/V ont montré que l'expression de mutants ectopiques H3.3G34V et H3.3G34R dans les cellules HEK293 inhibe la tri-méthylation de H3K36 en cis [45]. La capacité de ZMYND11 à reconnaître H3K36me3 est également perturbée lorsque la glycine 34 sur l'histone H3.3 est substituée en arginine ou en valine (H3.3G34R/V). Il s'avère que cette interaction est bien plus perturbée lorsque G34 est mutée en V34 comparée à H3.3G34R [36].

Une analyse du génome entier sur la lignée de glioblastome hémisphérique KNS42, dérivée d'un adolescent de 16 ans porteur de la mutation H3F3A-G34V, a montré que la marque H3K36me3 avait une déposition différentielle significative dans environ 156 gènes. Étant donné que K36me3 est impliquée dans l'activité transcriptionnelle, les analyses de ChIP-Seq de l'ARN polymérase II ont montré des corrélations entre H3K36me3 et la liaison de l'ARN polymérase II au niveau de ces 156 gènes. En effet, un enrichissement de la marque H3K36me3 sur les régions spécifiques au développement du cortex cérébral et la différenciation neuronale est associé à l'augmentation de l'expression de ces gènes, identifiés comme étant des régulateurs transcriptionnels impliqués dans la différenciation neuronale et la régulation de la prolifération cellulaire dans le développement du cerveau, en plus de l'expression de l'oncogène MYCN qui confère cette signature tumorale [46].

En 2020, Chen et al., ont mis en évidence que les mutations H3G34R/V sont enrichies dans les interneurons corticaux empêchant ainsi la différenciation neuronale via la surexpression de PDGFRA au niveau des régions régulatrices de facteur de transcription tel que Gsx2 codant pour les cellules progénitrices du cerveau [47].

Une étude portant sur les régions variables d'immunoglobuline dans les lymphocytes B a montré que la délétion de HIRA, responsable du recrutement de l'histone H3.3 dans le génome, entraîne une diminution du taux d'histone H3.3 sur les gènes codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines, et plus spécifiquement sur les régions variables des chaînes lourdes (VH) d'immunoglobuline [48].

Comme décrit préalablement, ZMYND11 se lie spécifiquement à H3.3K36me3. L'absence de HIRA entraîne également une réduction de H3.3K36me3, ce qui diminue le niveau de ZMYND11 sur les régions VH [48]. Dans cette même étude, la mutation H3.3G34V a été introduite dans les cellules immunitaires dépourvues du complexe HIRA, pour observer son effet sur la tri-méthylation de H3K36. Conformément au HIRA-KO, le mutant H3.3G34V diminue à la fois le niveau de H3K36me3 et l'abondance de ZMYND11, ce qui affecte la machinerie transcriptionnelle sur certaines régions [48].

Ainsi, la substitution d'acide aminé sur H3.3G34 affecte l'activité enzymatique de SETD2 abaissant en conséquence le niveau de H3K36me3 en cis, mais également l'interaction de ZMYND11 sur H3.3K36me3, ceci étant due à sa proximité avec le résidu H3.3K36. La mutation H3.3G34V semble relocaliser la tri-méthylation H3K36 sur les gènes neuronaux. Enfin, la diminution H3K36me3 va favoriser la déposition de la marque de méthylation sur H3K27 par PRC2 et entraîner une répression transcriptionnelle [49].

Ces informations suggèrent que la mutation H3.3G34V semble avoir un mécanisme convergent sur l'inhibition de l'activité de SETD2 pour tri-méthyliser H3.3K36, et l'activité de ZMYND11 dans la régulation de certains gènes impliqués dans le développement cérébral.

5. Dérégulations épigénétiques au cours du développement cérébral

Les anomalies cérébrales congénitales qui surviennent au cours du développement du fœtus entraînent généralement des déficits neurologiques qui peuvent aller d'une forme bénigne à sévère. Très souvent on observe une malformation et un dysfonctionnement du système nerveux central. Ces déficits peuvent se caractériser par une altération des fonctions cognitives, une déficience intellectuelle, des malformations cérébrales (macrocéphalie/microcéphalie) et des caractéristiques dysmorphiques crânio-faciales.

Les modifications post-transcriptionnelles sur l'histone H3.3 font partie de ces changements épigénétiques mis en place, qui sont importants au cours de la neurogenèse [50]. Diverses mutations sur l'histone H3.3 ont été décrites dans les glioblastomes pédiatriques ainsi que les troubles neuro-développementaux [51, 52].

5.1 Mutations somatiques sur les histones H3.3 et ZMYND11 responsables de tumeurs cérébrales

En 2012, à l'aide du séquençage du génome sur des tumeurs cérébrales pédiatriques, des mutations sur le gène *H3F3A* codant pour l'histone H3.3 ont été mises en évidence. Ces mutations sont ponctuelles et se produisent au niveau de l'extrémité N-terminale de l'histone H3.3 [51]. Il s'agit de mutations somatiques qui se caractérisent par un changement d'acides aminés au niveau de résidus clés qui sont porteurs de marques épigénétiques, telles que la méthylation et l'acétylation, ou à proximité de résidus clés qui subissent des PTMs responsables de la régulation de la transcription. Par exemple, la substitution de la glycine 34 en arginine ou en valine (H3F3A-G34R/V) se retrouvent dans 15 % des gliomes de haut grade (pHGG). Ces mutations somatiques sont très souvent associées à la perte de fonction de TP53 et ATRX et sont localisées dans la région hémisphérique du cerveau, chez les jeunes adolescents [53].

La glycine 34 de l'histone H3.3 (H3.3G34) n'est pas sujette à ces PTMs mais se trouve à proximité de résidus clés qui sont modifiés tels que la lysine 36. Il est bien connu qu'en raison de la proximité étroite entre la lysine 36 et la glycine 34 sur l'histone H3.3, une mutation sur G34 impacte le profil de tri-méthylation sur H3K36 en bloquant l'activité catalytique de l'histone méthyltransférase (HMT) SETD2, entraînant ainsi une perte de la marque K36me3 en cis [53].

En examinant la structure cristalline du domaine catalytique de SETD2 en complexe avec le peptide H3, il a été montré que les résidus G33 et G34 de l'histone H3 s'insèrent dans un canal étroit du domaine catalytique de SETD2. La substitution de l'acide aminé G34 en une arginine ou une valine entraîne un changement de sa conformation structurale, empêchant l'emboîtement de H3K36 avec le domaine catalytique de SETD2 en raison de son encombrement stérique. Les analyses structurales permettent d'expliquer la raison moléculaire pour laquelle la mutation sur la glycine 34 inhibe la tri-méthylation de H3K36 à la fois *in vivo* et *in vitro* [45].

En plus des mutations somatiques retrouvées sur les gènes *H3F3A* et *H3F3B*, une mutation de type frameshift, entraînant un décalage du cadre de lecture, sur le gène *ZMYND11* a été rapportée chez un patient atteint d'une tumeur cérébrale. Fait intéressant, cette mutation somatique sur *ZMYND11* partage des caractéristiques similaires retrouvées dans les pHGG qui arborent les mutations H3.3G34R/V, tels que sa localisation dans la région hémisphérique et la perte de fonction de TP53 et ATRX [54].

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que les mutations sur l'histone H3.3 responsables de la formation de tumeur (oncohistones), tel que H3G34R/V, perturbent le profil de méthylation de H3K36 et dérèglent ainsi la machinerie transcriptionnelle. De plus, la mutation somatique sur le régulateur épigénétique *ZMYND11* partage des caractéristiques similaires avec les mutations retrouvées sur G34 dans les pHGG, notamment par rapport à la localisation spécifique de la tumeur dans la région corticale et la perte de fonction de TP53 et ATRX.

Cela suggère que les mutations somatiques sur *ZMYND11* et H3.3G34 associées à la perte de fonction de TP53 et ATRX pourraient avoir un impact sur l'activité de l'ARN Pol II sur des régions du génome spécifiquement impliquées dans la neurogenèse, et ainsi contribuer à la tumorigenèse cérébrale [55].

Ces explications sur les tumeurs cérébrales, et plus particulièrement les mutations épigénétiques, nous amènent à aborder le sujet des mutations germinales sur le variant d'histone H3.3 et la protéine ZMYND11 qui ont été récemment décrites chez des patients atteints de syndromes neuro-développementaux[56-58].

5.2 Mutation germinale sur ZMYND11 : à l'origine d'un trouble neuro-développemental

Une variété de mutations de novo sur le gène codant pour ZMYND11 ont été décrites dans plusieurs cohortes de patients. Elles sont localisées sur le chromosome 10p15.3 (Chr10p15.3) et sont de plusieurs types : mutation ponctuelle ou délétion partielle (Fig. 2A), pouvant induire un décalage du cadre de lecture (frameshift). Ces mutations entraînent soit une perte de fonction de la protéine ZMYND11, soit une forme tronquée de la protéine. Les symptômes associés sont caractérisés par une déficience intellectuelle légère à modérée, un retard du développement, des troubles du comportement (comprenant une forme d'autisme, d'agressivité et d'hyperactivité), une dysmorphie crânio-faciale et des anomalies cérébrales (Fig. 2B) [56].

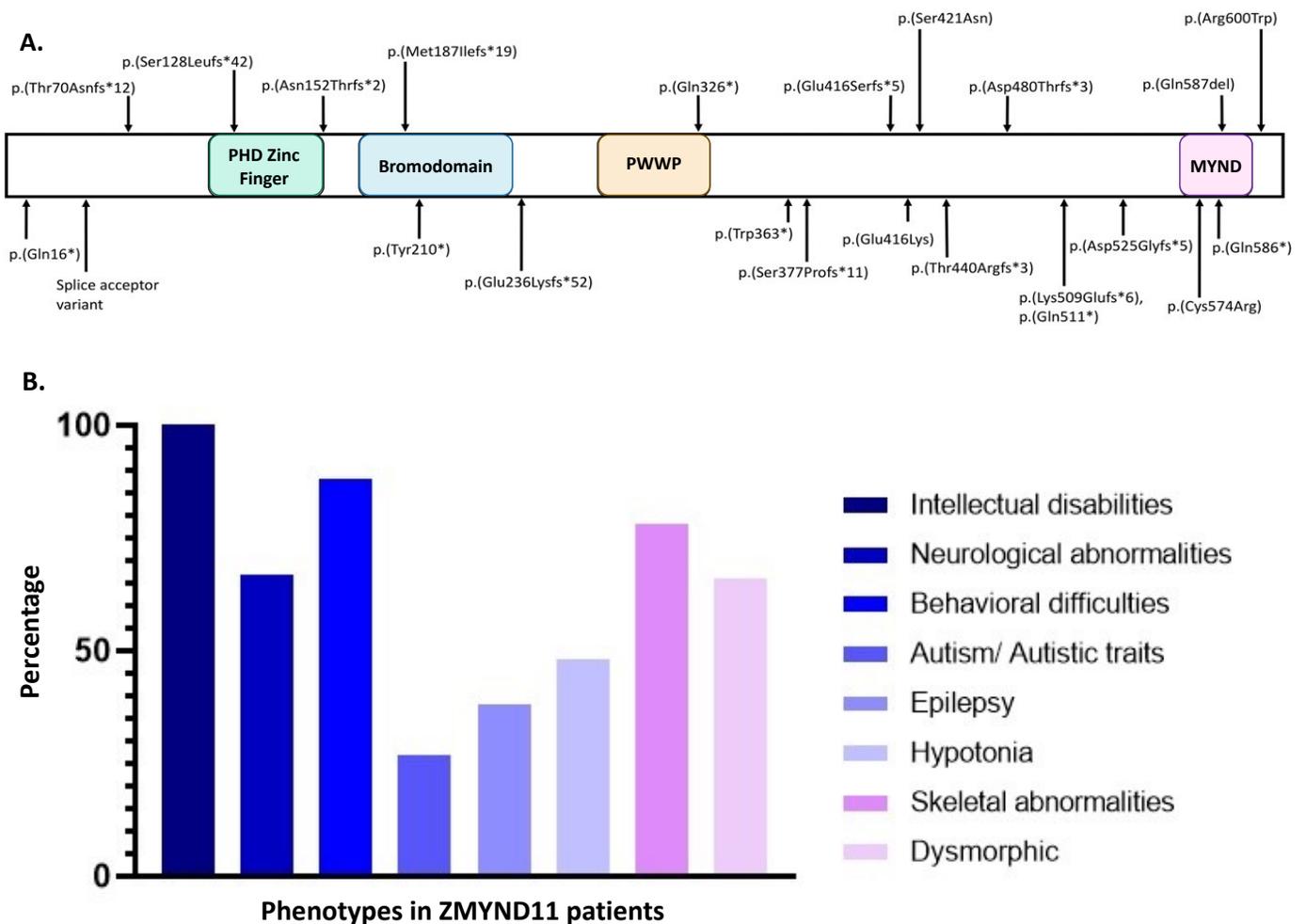


Figure 2. – Déficience intellectuelle liée à ZMYND11-Tirée de *Human mutation*, (2020)[56]

Figure 2 : A. Représentation linéaire de la protéine ZMYND11 montrant les différentes mutations documentées, avec les domaines fonctionnels qui sont marqués en fonction de leur emplacement sur la protéine. Les domaines PWWP-Bromo étant importants dans la reconnaissance de la tri-méthylation H3.3K36. B. Représentation graphique des données cliniques recueillies chez les individus mutés pour ZMYND11 et leur fréquence d'apparition en pourcentage (n=25 individus).

Un modèle de souris avec une délétion intragénique sur ZMYND11 a été développé, exprimant des phénotypes similaires retrouvés chez les patients, soit des troubles neuro-développementaux et un comportement anxieux [59].

Dans une étude réalisée sur des cellule HeLa, il a été démontré que ZMYND11 s'associe à des protéines appartenant au complexe de la petite ribonucléoprotéine nucléaire U5 (small nuclear ribonucleoprotein : snRNP), telles que EFTUD2, PRPF8 et SRRM2 ; des facteurs d'épissage impliqués dans la maturation de l'ARN messenger [37].

Fait intéressant, EFTUD2, l'un des facteurs d'épissage qui interagit avec ZMYND11, a été décrit dans la dysostose mandibulofaciale-microcéphalie (MFDM) qui se caractérise par une hypoplasie malaire et mandibulaire, une microcéphalie dans 90% des cas, un retard du développement et une déficience intellectuelle [60].

Ces observations cliniques soutiennent l'implication de ZMYND11 dans le développement du cerveau et une éventuelle implication dans l'épissage alternatif de l'ARN messenger. Cependant son rôle dans les événements d'épissage doit être davantage éclairci.

La marque de tri-méthylation sur H3K36 ajoutée par la méthyltransférase SETD2 va permettre le recrutement de la protéine ZMYND11 sur les régions actives qui va jouer un rôle de co-répression sur l'activité de l'ARN Pol II. Par conséquent, en plus de l'enrichissement de H3K36me3 sur le génome, ZMYND11 pourrait également réguler la vitesse d'élongation et moduler la transcription au cours du développement cérébral.

Outre les altérations sur les facteurs épigénétiques responsables de la marque d'histone H3K36, de récentes études ont rapporté des mutations germinales sur le gène *H3F3A* et *H3F3B* [58].

5.3 Mutation germinale sur l'histone H3.3 responsables des troubles du développement

L'importance des gènes *H3F3A* et *H3F3B* au cours du développement du cerveau humain n'est pas entièrement élucidée. On sait que la perte de H3.3 chez la souris entraîne un retard de développement et une létalité embryonnaire précoce [61, 62], ce qui suggère l'importance de l'histone H3.3 au cours du développement embryonnaire. H3.3 a été décrit pour réguler la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices neuronales au cours de la différenciation corticale via son accumulation pour réguler les marques épigénétiques [50, 63].

Une étude menée par Bryant et al., a démontré la présence de mutations ponctuelles germinales hétérozygotes *de novo* sur les gènes *H3F3A* et *H3F3B* [58]. A ce jour, une cinquantaine de patients ont été identifiés avec des mutations ponctuelles sur l'histone H3.3, causant des troubles neuro-développementaux allant jusqu'à des anomalies cérébrales (microcéphalie, atrophie corticale), un retard global de développement, une déficience intellectuelle et des caractéristiques dysmorphiques sans signe de malignité [58].

Ces mutations pourraient altérer les sites de liaison des protéines responsables du remaniement de la structure de la chromatine, ce qui renforce l'importance de l'histone H3.3 dans le développement neuronal.

Ainsi, les mutations somatiques retrouvées sur l'histone H3.3 associées au cancer et les mutations germinales du variant d'histone H3.3 semblent converger vers un impact sur l'expression des gènes impliqués dans la neurogenèse, qui à ce jour n'est pas complètement élucidé.

6. Modélisation des troubles neuro-développementaux

6.1 Utilisation des cellules iPS humaines pour étudier les malformations cérébrales

Les malformations du cortex cérébral au cours du développement deviennent des sujets de plus en plus étudiés en neuroscience, notamment grâce à l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPSC). En effet, en 2007, Yamanaka et son équipe de recherche révèlent comment reprogrammer des cellules de fibroblastes humains en cellules souches pluripotentes dites 'induites' [64]. Cette découverte a révolutionné la biologie cellulaire, et offre une opportunité unique de mieux comprendre les anomalies neurologiques.

Les cellules iPS humaines sont capables de s'auto-renouveler, comme les cellules souches embryonnaires humaines, et possèdent également la capacité de se différencier en n'importe quelle lignée cellulaire d'un organisme [65].

Une autre approche pour étudier les troubles neurologiques consiste à utiliser la technologie d'édition du génome par CRISPR-Cas9. La capacité de CRISPR-Cas9 à couper à un endroit précis du génome permet de comprendre comment une mutation sur un gène donné peut changer le profil d'expression des gènes. Ainsi en supprimant ou en introduisant une mutation dans un gène d'intérêt dans les cellules iPS humaines, on peut générer des lignées cellulaires mutantes et obtenir des modèles isogéniques. Cela peut permettre de récapituler certaines caractéristiques observées dans les maladies génétiques [66].

Par ailleurs, des études récentes utilisant des cellules souches pluripotentes humaines, ont décrit la capacité de générer des modèles neuronaux *in vitro*. En utilisant une combinaison d'inhibiteurs de la voie des SMAD, pour favoriser la lignée neuro-ectodermique, il est possible d'obtenir des cellules progénitrices neurales (NPC), qui peuvent être davantage différenciées pour former un réseau neuronal mature [67].

Outre l'utilisation de l'approche en 2D, l'utilisation d'un système 3D des organoïdes de cerveaux permet d'étudier comment les cellules dans une structure tissulaire 3D dérivées des iPSC vont s'auto-organiser pour former des structures internes complexes ressemblant à celles retrouvées dans le cerveau foetal (Fig.3) [68].

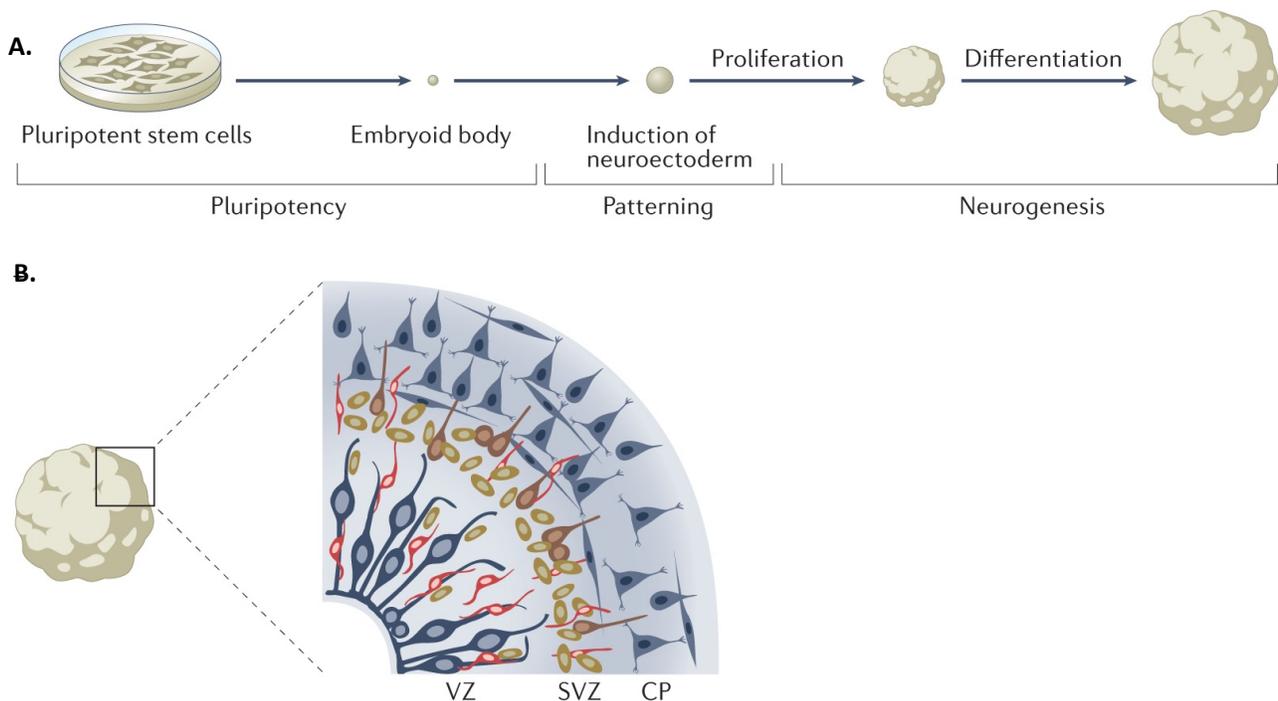


Figure 3. – Les organoïdes cérébraux, un modèle pertinent pour étudier la neurogenèse humaine- Extrait de *Nature Reviews Neurology*, (2022)[69].

Figure 3 : Les cellules iPS humaines vont s'agréger pour former une structure 3D qui, au cours de sa différenciation, va générer une variété de cellules que l'on va retrouver dans le cerveau humain en développement. B. Les cellules progénitrices vont s'organiser au niveau de la zone ventriculaire (VZ/SVZ). Ces cellules progénitrices vont par la suite migrer vers la plaque corticale (CP) pour donner naissance à plusieurs types de neurones matures.

Dans les troubles neuro-développementaux, plusieurs processus dans la différenciation peuvent être perturbés, entraînant des anomalies dans la formation et le fonctionnement du cerveau. L'utilisation des cellules iPS qui peuvent être différenciées en cellules neuronales, va permettre d'étudier le développement normal du système nerveux mais aussi d'étudier les malformations cérébrales en développant des lignées cellulaires porteuses de mutations germinales responsables des syndromes neuro-développementaux [69].

De plus, le développement du cerveau humain implique des processus uniques qui parfois ne peuvent être reproduits dans les modèles animaux, particulièrement lorsqu'il s'agit d'étudier les déficiences intellectuelles [70].

Depuis maintenant dix ans, les protocoles de culture 3D ne cessent de s'améliorer dans le but de modéliser les caractéristiques du cerveau humain, et les troubles qui lui sont associés.

Les organoïdes cérébraux sont des outils qui permettent d'identifier les mécanismes neurophysiologiques et bio-moléculaires qui sont perturbés dans les maladies neurologiques. Cette approche a été utilisée pour étudier l'effet du virus Zika qui entraîne une microcéphalie, les déficiences intellectuelles tels que Le syndrome de Down et la maladie d'Alzheimer [71-73].

En plus d'une meilleure compréhension des processus impliqués dans la neurogenèse, les organoïdes de cerveaux constituent une stratégie thérapeutique pour tester de nouveaux traitements que ça soit dans le contexte développemental ou tumoral [74].

Compte tenu de la complexité du cerveau humain, la ressemblance reste limitée dans les modèles actuels des organoïdes cérébraux. Néanmoins, ils ont la capacité de récapituler certains aspects fondamentaux de la neurogenèse, incluant la formation des ventricules, la différenciation neuronale avec l'organisation des couches corticales ainsi que la migration neuronale (Fig. 3B). De plus, de récentes études ont montré que les organoïdes de cerveaux récapitulent de nombreuses caractéristiques transcriptomiques du développement du cerveau humain de l'âge précoce à mi-foetal [75].

Ainsi, les organoïdes cérébraux peuvent servir de modèle pour étudier le développement précoce du cerveau humain ainsi que les syndromes neuro-développementaux qui surviennent au cours du développement embryonnaire, et de mieux comprendre le réseau intrinsèque.

Dans le cadre de mon projet de recherche, j'ai étudié les mutations ponctuelles impactant la région N-terminale du variant H3.3 et l'inactivation du régulateur épigénétique ZMYND11 dans le contexte des troubles du développement du cerveau en raison de leurs spécificités et de leurs conséquences phénotypiques dans le système nerveux.

L'établissement de l'identité cellulaire est précisément régulé par un programme épigénétique qui vient influencer l'expression des gènes au cours du développement. Une mutation sur les régulateurs épigénétiques ou sur des résidus clés de l'histone H3.3 peut venir perturber le remodelage de la chromatine et par conséquent la régulation de la transcription des gènes impliqués dans la différenciation des cellules neurales (Fig. 4).

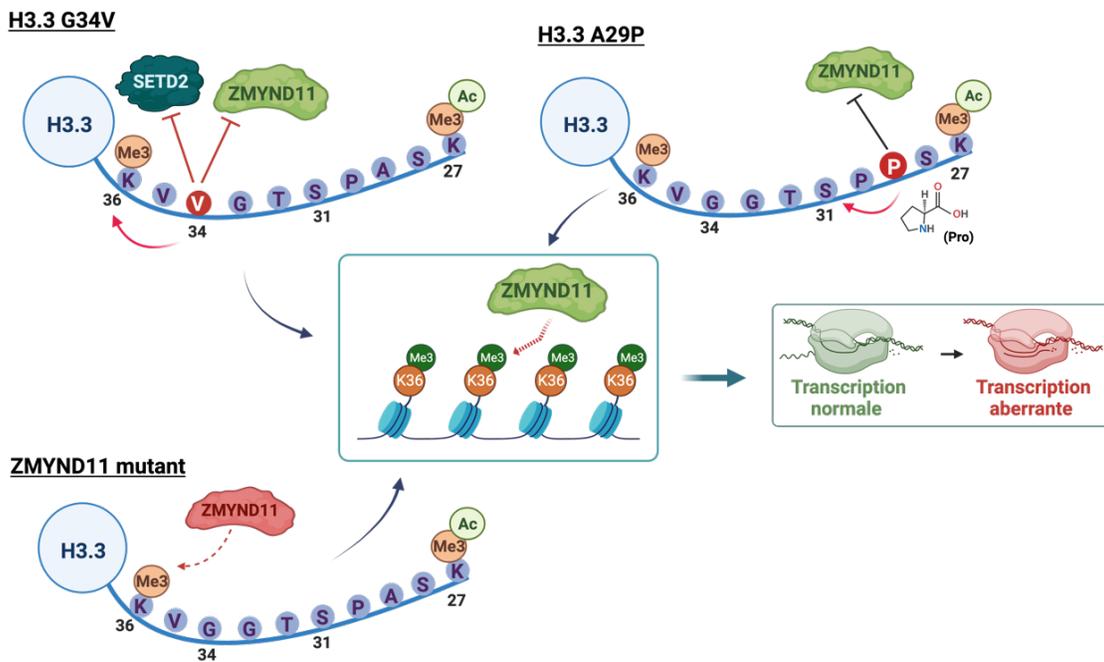


Figure 4. – Illustration de l'impact des mutations sur l'histone H3.3 et la perte de fonction de ZMYND11 sur la transcription.

Figure 4 : Représentation schématique des mutations sur l'histone H3.3 et l'inactivation de ZMYND11 et leur impact sur la transcription. La perte de fonction de ZMYND11 peut avoir des conséquences sur sa liaison à H3K36me3. La mutation H3.3G34V vient altérer directement la liaison de ZMYND11 à K36me3, ou indirectement en empêchant la tri-méthylation de H3.3K36 par SETD2. La substitution de l'alanine 29 en une proline peut modifier sa conformation et perturber la reconnaissance de ZMYND11 sur l'histone H3.3 à travers la sérine 31. Ces mutations convergent sur un effet commun qui est la perturbation de liaison de ZMYND11 sur H3.3K36me3, ce qui en conséquence peut altérer au niveau de la transcription des gènes.

Problématique :

La régulation de l'accessibilité à la chromatine est contrôlée par des modifications post-traductionnelles des histones (PTM) qui se produisent sur les variantes d'histones, dans le but de réguler la transcription au cours du développement embryonnaire.

Parmi ces variantes d'histones, H3.3 vient s'accumuler dans des régions spécifiques du génome notamment au niveau des promoteurs de gènes activement transcrits et des régions codantes [76]. Ces PTMs qui ont lieu sur la région N-Terminal de l'histone H3.3 vont également venir influencer le recrutement de régulateurs épigénétiques qui à leur tour modulent la régulation des gènes.

De récentes études ont montré l'implication de H3.3 dans la prolifération et la différenciation des cellules neurales progénitrices dans le système nerveux. Notamment, la suppression des gènes *H3F3A* et *H3F3B* qui codent pour l'histone H3.3 entraîne une perturbation dans l'identité neuronale [50].

Comme mentionné précédemment, ZMYND11 est un régulateur épigénétique qui se lie spécifiquement à H3.3K36me3 via la sérine 31, et co-réprime l'activité de l'ARN Pol II. Une mutation sur l'alanine 29, un résidu proche de la sérine 31, ou sur H3.3G34, pourrait potentiellement perturber l'interaction de ZMYND11 sur H3.3K36me3, ce qui impacterait la régulation transcriptionnelle de gènes spécifiques impliqués dans la neurogenèse.

Ce projet consiste à comprendre comment les mutations germinales sur la glycine 34 (H3F3B-G34V), l'alanine 29 (H3F3B-A29P), et la perte de fonction de ZMYND11 (ZMYND11-KO), viennent perturber la différenciation des cellules souches neurales, à un moment précis au cours de la neurogenèse, conduisant à des anomalies cérébrales.

Hypothèse :

J'émetts l'hypothèse que ces trois mutations germinales distinctes (ZMYND11^{KO}, H3F3B^{G34V} et H3F3B^{A29P}) pourraient perturber l'interaction de ZMYND11 avec H3.3K36me3. En raison de l'incapacité de ZMYND11 à co-réprimer l'ARN Pol II, cela entraînerait la dérégulation de certains gènes au cours de la neurogenèse.

Objectif du projet de recherche :

Ce projet consiste à comprendre comment l'interaction de ZMYND11 sur H3.3K36me3 coordonne spécifiquement la transcription de gènes impliqués dans la différenciation neuronale et comment ce mécanisme est perturbé dans les troubles neurologiques.

- Objectif 1:

Nous allons dans un premier temps générer des lignées cellulaires isogéniques à partir de cellules souches pluripotentes humaines induites (hiPSC). En utilisant la technologie du CRISPR-Cas9 sur les cellules iPS, je compte générer des lignées cellulaires isogéniques avec les mutations d'intérêt (ZMYND11^{KO}, H3F3B^{G34V} et H3F3B^{A29P}).

- Objectif 2:

Grâce au potentiel des cellules souches pluripotentes à se différencier en n'importe quelle lignée cellulaire, nous réaliserons une différenciation neuronale *in vitro* pour identifier si la lignée neuronale est affectée. Nous allons aussi générer des modèles d'organoïdes cérébraux afin d'identifier si l'organisation en 3D est perturbée.

- Objectif 3:

Enfin, en utilisant une approche épigénomique et transcriptomique, nous analyserons comment la perte de fonction de ZMYND11 et les mutations sur la région N-terminale de l'histone H3.3 viennent perturber d'une part l'interaction entre ZMYND11 et H3K36me3, mais également l'impact en aval sur la transcription.

Chapitre 2 – Matériel et Méthodes

1. Culture des hiPSCs

Pour ce projet, la lignée iPS humaine saine WT-NCRM1, issue de cordon ombilical, est utilisée afin de générer les mutations d'intérêt.

Des boîtes de Pétri sont traitées au préalable avec une matrice extracellulaire (matrigel) diluée à 1% dans du DMEM-F12. La polymérisation de cette matrice extracellulaire est réalisée pendant au minimum 30 minutes à 37°C et va permettre aux cellules iPS d'adhérer à la surface de la plaque de culture. Le milieu utilisé pour la culture des cellules iPS est le milieu mTeSR1⁺, qui est commercialisé par la compagnie STEMCELL, et permet de maintenir la prolifération des cellules au stade indifférencié car il est enrichi en FGF2 et il est changé tous les jours afin d'empêcher que les cellules se différencient.

Lorsque les colonies atteignent une confluence proche de 80%, le ReLeSR, un réactif non enzymatique, est utilisé pour la dissociation et le passage des cellules iPS. Le passage des cellules iPS humaines avec le ReLeSR permet de générer des agrégats de petite taille, tout en détachant uniquement les cellules souches pluripotentes.

2. Génération de lignées cellulaires iPS isogéniques :

La technologie révolutionnaire du CRISPR-Cas9 qui permet d'effectuer des modifications génétiques à l'échelle cellulaire ou sur un organisme, a été découverte et mise au point par le Dr. Emmanuelle Charpentier et le Dr. Jennifer Doudna qui ont reçu le prix Nobel de chimie en 2020.

Le système CRISPR-Cas9 établi dans le laboratoire utilise deux composants principaux : un ARN guide simple brin (ARNg) et une nucléase associée à CRISPR (Cas9). L'ARNg est une séquence d'ARN qui vient reconnaître spécifiquement la région cible d'ADN et y dirige la nucléase Cas9 pour l'édition génomique.

L'ARNg est composé de deux éléments : l'ARN CRISPR (ARNcr), une séquence de 17 à 20 nucléotides complémentaire à l'ADN cible, et un ARNtracr, qui sert d'échafaudage pour la nucléase Cas9. Ces deux composants sont incubés ensemble pendant 5 minutes à 95°C afin de permettre leur hybridation. Après l'hybridation de l'ARNcr (200 µM) avec l'ARNtracr (100 µM), nous procédons à la formation du complexe ribonucléoprotéique (RNP complexe) qui consiste à incubé pendant 20 minutes à température ambiante l'endonucléase Cas9 avec le duplex ARNcr-ARNtracr. Pendant que le complexe se forme, les cellules iPS sont dissociées par traitement enzymatique à l'accutase pendant 10 minutes à 37°C et 5×10^5 cellules sont resuspendues dans 100 µL de solution de tampon (Nucleofector solution) avec le complexe ribonucléoprotéique.

C'est uniquement dans le cas où une mutation Knock-in (KI) est générée, que l'ADN donneur (ssODN) est fourni dans le mélange de nucléofection. Dans le cas des KO, il n'y a pas d'ADN donneur mais uniquement la Cas9, qui est dirigée vers le locus spécifique de l'ADN grâce à l'ARNg, où il contribue à une cassure double brin.

La suspension cellulaire, avec le complexe RNP, est transférée dans une cuvette stérile qui va être placée dans l'appareil d'électroporation (Amaza Nucleofector), où les cellules sont ensuite soumises à une impulsion électrique qui va créer des pores au niveau de la membrane cellulaire par lesquels le complexe RNP peut s'insérer pour modifier le génome de la cellule. Les cellules transfectées sont mises en culture avec du Y-27632 afin de limiter la mort cellulaire.

Pour vérifier l'efficacité de la transfection, les cellules sont de nouveau dissociées à l'accutase et 300 cellules sont mises en culture sur quelques boîtes de pétris de 10cm². En cultivant les cellules à très faible densité, cela va générer des colonies distinctes. Le génome de chaque colonie est prélevé et amplifié par PCR pour effectuer un criblage par séquençage Sanger afin d'identifier les clones positifs contenant la mutation d'intérêt, et reconfirmé de nouveau par séquençage haut-débit par Illumina MiSeq.

3. Différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules neuronales

Il existe de nombreuses méthodes de différenciation des cellules iPS humaines vers la lignée neuronale. Les travaux menés par l'équipe du Dr. Yichen Shi publié en 2012 [77] et le Dr. Meixiang Zhang publié en 2018 [78], ont permis de faire la mise au point de la technique de différenciation cellulaire.

Brièvement, les cellules iPS sont détachées et dissociées par traitement à l'acutase, puis ensemencées à hauteur de 10 000 cellules par puits dans une plaque 96 puits, dont les fonds sont ronds et traités spécifiquement pour empêcher l'adhérence cellulaire. Les cellules sont mises en culture dans 150 μ L de milieu hESC low FGF par puits, et centrifuger 3 minutes à 300g afin de regrouper les cellules et favoriser la formation de corps embryonnaires.

Après 2-3 jours de récupération, selon l'apparence des corps embryonnaires, la moitié du milieu est remplacé délicatement avec du milieu frais hESC low FGF où 5 μ M de SB-431542 (inhibiteur de la voie TGF β), 3 μ M de CHIR99021 et 2 μ M de Dorsomorphine ont été supplémentés (inhibiteur de la voie BMP) pour deux jours supplémentaire.

Pour générer des cellules progénitrices, les sphéroïdes corticaux sont recueillis à l'aide de pointes de pipette à gros alésage afin de ne pas les briser. Ils sont ensuite transférés soigneusement dans des plaques préalablement traitées avec le Matrigel pour qu'elles adhèrent et forment des rosettes neurales avec le milieu d'induction neurale. Le milieu est changé un jour sur deux jusqu'à l'obtention de belles rosettes neurales enrichies en cellules progénitrices.

Au jour 8, les corps embryonnaires qui ont adhéré à la surface de la plaque de culture, vont avoir un aspect étalé et les rosettes neurales devraient commencer à être visibles. Au jour 12, les rosettes neurales sont sélectionnées à l'aide d'un réactif de sélection commercialisé par STEMCELL, et sont remises en culture dans le milieu d'expansion neurale. Celles-ci vont proliférer et donner naissance aux cellules NPC.

Pour générer des neurones matures à partir des cellules progénitrices neurales, les NPC sont mises en culture pendant une semaine dans le milieu de différenciation, commercialisé par STEMCELL (STEMdiff Forebrain Neuron Differentiation, Catalogue # 08600, protocole) puis cultivées pendant trois semaines dans le milieu de maturation également commercialisé par STEMCELL (STEMdiff Forebrain Neuron Maturation, Catalogue # 08605).

Les pages 80 et 81, dans la section annexes couvrent la composition des différents milieux de différenciation pour former le réseau de cellules neuronales, ainsi qu'une illustration du protocole de différenciation des cellules iPSC en cellules NPC et neurones avec leur validation par Immunofluorescence.

A la différence des cellules souches pluripotentes, les cellules progénitrices neurales se caractérisent par une morphologie plus allongée et expriment des marqueurs spécifiques tels que le filament intermédiaire Nestin, et les facteurs de transcription Sox1 et Pax6. Les neurones matures se caractérisent par leur prolongement et un marquage spécifique pour MAP2 (Annexes page 81).

4. Génération des organoïdes de cerveaux à partir des cellules hiPS

C'est dans l'Institut de biotechnologie moléculaire (IMBA) de l'Académie autrichienne des sciences (Österreichische Akademie der Wissenschaften-ÖAW), dirigé par le Dr. Jürgen Knoblich, que la scientifique Madeline Lancaster produit pour la première fois des organoïdes de cerveaux à partir de cellules souches pluripotentes humaines. L'article sur le développement d'organoïdes cérébraux voit le jour dans la revue Nature en 2013 [79].

Avec la capacité à reproduire certaines structures du cerveau, le modèle de « mini cerveaux » permet entre autres choses d'étudier la neurogenèse et les conséquences de certaines anomalies génétiques lors du développement du cortex cérébral.

Pour obtenir un modèle de culture en 3D optimal, des étapes clés sont essentielles : la première consiste à utiliser des facteurs de différenciation qui vont orienter le devenir des cellules vers la lignée neuro-ectodermique, puis neuronale lors de la différenciation.

Un autre composant important dans la formation d'organoïdes de cerveaux est la matrice extracellulaire également connue sous le nom de Matrigel. Le Matrigel va contribuer dans la prolifération et l'expansion des structures internes de l'organoïde.

Enfin, les organoïdes de cerveaux sont placés sur une plaque d'agitation dans l'incubateur pour apporter une meilleure oxygénation et favoriser la diffusion des nutriments, des facteurs de différenciation et de maturation au cours de la différenciation.

Le protocole publié par le Dr. Xuyu Qian en 2018, a été utilisé pour générer les organoïdes de cerveaux dans le laboratoire. Tout d'abord, les cellules iPS sont dissociées avec de l'acutase etensemencées sur des boîtes de pétris 10cm² à très faible densité pour générer des colonies distinctes.

Après obtention des colonies d'iPS, celles-ci sont incubées avec de la collagénase de Type IV entre 45 minutes et 1h à 37°C (Collagénase de Type IV, 100X dilué à 1X dans du DMEM/F12). La collagénase va permettre de détacher les colonies d'iPS de la plaque qui sont délicatement transférées dans une plaque 6 puits, traités pour une adhérence ultra-faible, et qui contient 3 mL de milieu hESC low FGF. Au jour 3, la moitié du milieu est remplacée par du milieu hESC low FGF, dans lequel a été rajouté 2 µM de Dorsomorphine et 2 µM de A83-01, des composants qui vont inhiber la voie de signalisation TGF-β/SMAD pour orienter les cellules souches pluripotentes vers la différenciation neuro-ectodermique.

Au cinquième jour, les organoïdes de cerveaux sont exposés de façon graduelle au milieu d'induction qui contient un milieu de base supplémenté avec 1µM de CHIR99021, 1 µM de SB-431542 et 5 µM de Cyclopamine pour favoriser la dorsalisation des organoïdes cérébraux. Deux jours après, les organoïdes de cerveaux sont encapsulés dans du Matrigel qui fait office de matrice extracellulaire, ce va permettre aux organoïdes de cerveaux de prendre en volume et organiser les structures internes. Ils sont cultivés dans le milieu d'induction pendant 7 jours supplémentaires. Au quatorzième jour, les organoïdes sont dissociés du Matrigel, et environ 20 organoïdes sont transférés dans une boîte de culture tissulaire de 60 mm contenant 5 mL de milieu de différenciation. Chaque boîte de 60 mm contenant les organoïdes cérébraux est placée sous agitation constante à 80 rpm, sur un agitateur orbital installé dans l'incubateur.

Du jour 35 au jour 70, de la matrice extracellulaire (ECM) est supplémentée dans le milieu de différenciation (Matrigel à 1 %). Au jour 70, le milieu de différenciation est remplacé par le milieu de maturation, et les organoïdes peuvent être cultivés jusqu'à plus de 110 jours dans le milieu de maturation.

Les page 83 et 84, dans la section annexes couvrent la composition des différents milieux de différenciation pour former les organoïdes de cerveaux, ainsi qu'une illustration du protocole de différenciation des cellules iPSC en structure 3D avec leur validation par Immunofluorescence.

5. Immunofluorescence

Les cellules sont fixées avec de la paraformaldéhyde 4% /15 % saccharose/PBS pendant 20 minutes à 4°C avant d'être rincées 3x5 minutes avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées avec 0,3 % de TritonX-100/PBS pendant 10 minutes à température ambiante, puis rincées de nouveau 3X5 minutes avec du PBS.

L'immunomarquage des cellules nécessite une étape de blocage des sites de liaisons aspécifiques avec une solution de 0,1 % TritonX-100/PBS et 5 % de sérum d'âne pendant 1h à température ambiante. Après l'étape de blocage, les cellules sont mises en incubation avec les anticorps primaires. Ces derniers sont dilués à des concentrations établies dans la solution de blocage et incubés sur les échantillons durant la nuit à 4°C (**Tableau 3**).

Le lendemain, les cellules sont lavées avec du PBS Tween 0,05 %, 3x5 minutes avant de les incuber avec les anticorps secondaires qui sont couplés à un fluorochrome 488, 555 ou 647 (dilution : 1/1000, **Tableau 3**), pendant une heure à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les échantillons sont finalement montés dans un milieu de montage qui contient du DAPI (ProLong™ Diamond Antifade Mountant).

Les images ont été acquises sur un microscope confocal Zeiss LSM780 Laser Scanning Confocal avec l'objectif de grossissement 20X et analysées à l'aide du logiciel Zen.

Les organoïdes cérébraux sont fixés pendant 30 minutes à température ambiante dans de la paraformaldéhyde 4% avant d'être rincés 3x5 minutes dans du PBS puis disposés dans une solution de sucrose 15% pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les organoïdes sont transférés de nouveau dans une solution de sucrose à 30% pendant une nuit à 4°C afin de préserver les échantillons.

Les organoïdes sont inclus dans un cryomoule en plastique pré-étiqueté contenant la solution OCT (Optimal cutting temperature). Les cryomoules sont placés dans un petit récipient, contenant de l'isopentane pré-refroidi, et va permettre à la solution d'OCT au contact du froid de se solidifier. Les tissus fixés et congelés sont stockés à -80°C.

Des coupes de 15 à 20µm d'épaisseur réalisées à l'aide d'un cryostat, sont récupérées sur des lames résistantes au froid (SuperFrostPlus) qui sont conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation pour l'immunomarquage.

L'immunofluorescence sur les coupes d'organoïdes commence par une étape de rinçage des lames avec du PBS, pour retirer l'OCT. Une fois les lames rincées, les échantillons sont perméabilisés avec du Triton-X à 0, 5%, PBS pendant 45 minutes. Après l'étape de perméabilisation, les lames sont séchées pour pouvoir appliquer le stylo DAKO autour des coupes de tissus. Le stylo DAKO va créer une barrière hydrophobe autour de l'échantillon.

Les tissus sont ensuite bloqués avec une solution de blocage qui est constituée de 0,05 % de Triton-X (PBST) et 10 % de sérum d'âne pendant 1 heure.

Les anticorps primaires sont dilués à des concentrations établies dans la solution de blocage et sont appliqués sur les coupes de tissus pendant une nuit à 4°C (**Tableau 3**).

Le lendemain, trois rinçages successifs avec du PBS Tween 0,05 % sont réalisés pendant 5 minutes avant d'incuber les coupes de tissus avec les anticorps secondaires qui sont couplés au fluorochrome 488, 555 ou 647 (dilution :1/1000, **Tableau 3**), pendant une heure à l'abris de la lumière et à température ambiante.

Les lames sont montées dans du milieu de montage qui contient du DAPI (ProLong™ Diamond Antifade Mountant). Les lames sont visualisées sur un microscope confocal Zeiss LSM780 Laser Scanning Confocal avec l'objectif de grossissement 20X et analysées à l'aide du logiciel Zen.

6. Western Blot

Les cellules iPSC humains sont lysées dans une solution RIPA composée de 0,1% de SDS et d'inhibiteurs de protéases pendant une heure à 4°C. Après centrifugation des cellules, le surnageant riche en protéine est conservé pour poursuivre avec l'isolement des noyaux et l'extraction des histones avec le kit d'extraction d'histone (Abcam-ab113476).

Le dosage protéique est évalué par la méthode BCA qui permet par colorimétrie de quantifier la concentration en protéine. Une gamme d'étalonnage de BSA (0 à 5 mg/mL) est utilisée comme contrôle positif pour déterminer la concentration des échantillons.

50µg de protéines sont ensuite dénaturées à 95°C pendant 10min avant de poursuivre à la migration sur gel d'acrylamide. La protéine ZMYND11 faisant 70kDa, la migration se fait dans un gel SDS à 10% d'acrylamide pendant 1h30 à 200V dans le tampon de migration. La protéine d'intérêt contenue dans le gel est ensuite transférée sur une membrane PVDF activée préalablement au méthanol. Le transfert de la protéine depuis le gel vers la membrane PVDF est effectué via un courant électrique de 250 mA. Les protéines chargées négativement vont migrer du pôle négatif vers le pôle positif, pendant 2h dans un tampon de transfert 1X avec 20 % de méthanol.

Afin de diminuer les interactions aspécifiques de l'anticorps primaire, la membrane PVDF est bloquée avec du PBST- 5% de BSA, puis incubée avec l'anticorps primaire (ZMYND11 MerckMillipore-ABE1889) dilué à 1/500 dans la solution de blocage contenant du PBST- 5% de BSA sur la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, après rinçage de l'anticorps primaire, la membrane PVDF est exposée à un anticorps secondaire lié à une enzyme, la horseradish peroxidase (HRP)(Ozyme- 120-100P). La membrane est à nouveau rincée 3x5 minutes dans du PBS-Tween avant d'être mise en contact avec le réactif de détection ECL (ThermoFisher-Catalog No.45-010-090), qui apporte le substrat de la HRP, et permet la révélation de l'anticorps primaire. Le signal est capté par chimiluminescence.

7. Analyse du transcriptome par RNA-seq

L'ARN total des culots cellulaires d'hiPS a été extrait à l'aide du kit Aurum Total RNA Mini (Bio-Rad, #732-6820). Pour chaque mutation, trois réplicats biologiques ont été récoltés pour chaque expérience d'analyse transcriptomique, à l'exception des mutations H3.3A29P et H3.3G34V, car seulement deux clones pour chaque mutation ont été générés. Afin d'éliminer l'ADN contaminant, un traitement à la DNase a été effectué.

La préparation des bibliothèques a été réalisée avec déplétion de l'ARN ribosomique pour obtenir une plus grande couverture de l'ARNm et autres longs ARN non codants (lncRNA). Les échantillons ont été séquencés de façon paired-end (2x100bp) sur l'appareil HiSeq 4000 d'Illumina.

Les données brutes de séquençage du transcriptome ont été analysées par Alva Annett qui a utilisé le pipeline d'analyse STAR v2.3.0 pour l'alignement des séquences sur un génome de référence, DESeq2 v1.4.5 pour l'analyse d'expression différentielle des gènes (DEG) et clusterProfiler v4.0.0 pour l'analyse d'enrichissement de l'ensemble des gènes (GSEA).

8. Protocole de CHIP-seq

Les cellules ont été fixées avec 1 % de formaldéhyde dans le but de maintenir la liaison des protéines d'intérêts ou les modifications PTMs qui ont lieu sur le génome. Les cellules fixées sont ensuite rincées au PBS, culottées et stockées à -80 °C. Avant de procéder à la sonication, les cellules subissent une lyse cellulaire et nucléaire. Les noyaux lysés sont dans un tampon contenant 1% de SDS. La sonication est réalisée sur l'appareil Bioruptor (UCD-300) de Diagenode, qui va générer des ultrasons pour fragmenter la chromatine. Le processus de sonication produisant de la chaleur, il est donc recommandé de maintenir la température à 4°C afin de préserver l'intégrité de la chromatine. La sonication des échantillons a été réalisée sur dix cycles « ON / OFF » de 30 secondes chacun à 4°C. L'efficacité de la sonication sur les échantillons a été évaluée en faisant migrer les échantillons sur gel par électrophorèse jusqu'à l'obtention de fragments enrichis entre 200 et 500 paires de bases.

Après sonication, 2% de chromatine issues des cellules de Drosophile S2 soniquées, ont été ajoutées dans les échantillons ; cela permet de normaliser le signal des échantillons expérimentaux avec le contrôle dans les données de séquençage finales.

La réaction de ChIP-seq pour les modifications d'histones a été réalisée sur l'appareil Diagenode SX-8G IP-Star, où 2 millions de cellules soniquées associées à des inhibiteurs de protéase sont incubées pendant 10 heures avec soit, 30µL de billes de protéine A pour les marques H3K27me3 et H3K27ac, soit 80 µL de billes de protéine anti-mouse pour la marque H3K36me3 préalablement incubés avec les anticorps.

Pour étudier le profil de la marque épigénétique ZMYND11 par ChIP-seq, 5 millions de cellules ont été soniquées. La chromatine associée à des inhibiteurs de protéase, est incubée avec 35 µL de billes de protéine A, préalablement incubées avec l'anticorps dirigé contre ZMYND11, durant une nuit à 4°C.

La dissociation des protéines à la chromatine a lieu par chauffage des échantillons à 65°C pendant 4 heures. Les échantillons sont ensuite traités avec 2 µl de RNase Cocktail à 65°C pendant 30 minutes, puis avec 2 µl de Protéinase K à 65°C pendant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite purifiés avec le kit de purification QIAGEN MiniElute PCR selon le protocole fourni et conservé à -80°C.

9. Analyse des marques d'histones par ChIP-seq

Pour chaque expérience, un échantillon dit « d'Input » est utilisé pour réduire le bruit de fond. Les échantillons sont soumis à une préparation de bibliothèques via l'utilisation du Kit KAPA HyperPrep et sont séquencés de façon paired-end (2x50bp).

L'analyse des données de séquençage de l'épigénome, a été effectuée par Alva Annett et Anthony Lemieux qui ont utilisé le pipeline Genpipes chipseq v3.6.2 pour l'alignement, et l'outil bio-informatique DeepTools v3.3.1 pour la normalisation des pistes (tracks) et la génération des heatmaps.

Chapitre 3 – Résultats

Objectif 1 - Modélisation des troubles neuro-développementaux dans les hiPSC

1. Génération des mutants isogéniques par CRISPR-Cas9

Pour comprendre comment l'inactivation de ZMYND11 et les mutations ponctuelles sur l'histone H3.3 entraînent des troubles du développement, nous avons utilisé la technologie d'édition du génome par CRISPR-Cas 9 pour générer des mutants isogéniques sur les cellules hiPSC.

Pour générer des KO pour le gène *ZMYND11*, des ARNg adaptés ont été identifiés, pour cibler l'exon 3 du gène *ZMYND11* se trouvant sur le chromosome 10, à l'aide du site bio-informatique UCSC Genome Browser (Fig. 5A). Ces mêmes guides sont utilisés afin de générer des mutants hétérozygotes et homozygotes.

Tableau 1. – Liste des oligos pour ZMYND11 (5' vers 3')

Séquences de guide ARN_ZMYND11		
ZMYND11-Exon3	gRNA1	AGGTATATGTCTCGAGTCCA brin positif
ZMYND11-Exon3	gRNA2	AGCTAAGCTCAGCTGACGGG brin négatif
Séquences des amorces pour Séquençage par Sanger_ZMYND11		
ZMYND11_Ex2-3F	Primer-For	CGCTGATTTGGGACTATTTTG brin positif
ZMYND11_Ex2-3R	Primer-Rev	ATGCTCATCTCCTGGCAACCAAT brin négatif
Séquences des amorces pour Séquençage par Miseq_ZMYND11		
ZMYND11_Ex2-3_Miseq1		ACACTGACGACATGGTTCTACACCACCATTTTCTTATTTTCATTCA
ZMYND11_Ex2-3_Miseq2		TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTTGTTTAAAAGCTAAAAGTTCACATCTC

Tableau 1. Séquences des ARN guides ciblant l'exon 3 du gène ZMYND11. Les ARN guides gRNA1 s'hybrident en 5' sur le brin positif tandis que l'ARN guide gRNA2 s'hybride en 5' sur le brin négatif de l'ADN. Séquences des primers ciblant l'exon 2 et 3 du gène ZMYND11 pour identifier la présence de mutations induites par CRISPR-Cas9. L'amorce ZMYND11_ex2-3F s'hybride en 5' sur le brin positif tandis que l'amorce ZMYND11_ex2-3 s'hybride en 5' sur le brin négatif de l'ADN. Validation des clones positifs par séquençage haut débit Miseq afin d'identifier la présence ou non d'autres variants sur la séquence amplifiée.

2. Validation des mutations générées par CRISPR-Cas9

Afin de valider l'efficacité de ciblage des ARN guides sur la région génomique d'intérêt, une centaine de clones ont été prélevés et soumis aux séquençages par la méthode Sanger. La validation des clones mutants a été réalisée grâce à des amorces spécifiques ciblant l'exon 2 à l'exon 3 du gène *ZMYND11* qui amplifient la séquence d'ADN cible et génèrent des produits de 500pb (**Tableau 1**).

L'électrophorégramme représente une portion de l'exon 3 du gène *ZMYND11*, montrant en gras la séquence non modifiée WT, tandis que les clones C18 à C21 sont les clones homozygotes qui montrent une délétion de 29 nucléotides (Fig. 5B).

Pour conforter les résultats obtenus par Sanger, les clones mutants ont été validés par MiSeq (**Tableau 1**) et par Western-Blot. Le Western-Blot montre que la délétion de 29 paires de bases sur le gène *ZMYND11* entraîne bien une absence de production de la protéine ZMYND11 dans le KO homozygote. Tandis que le KO hétérozygote semble montrer une expression partielle de la protéine (Fig. 5C).

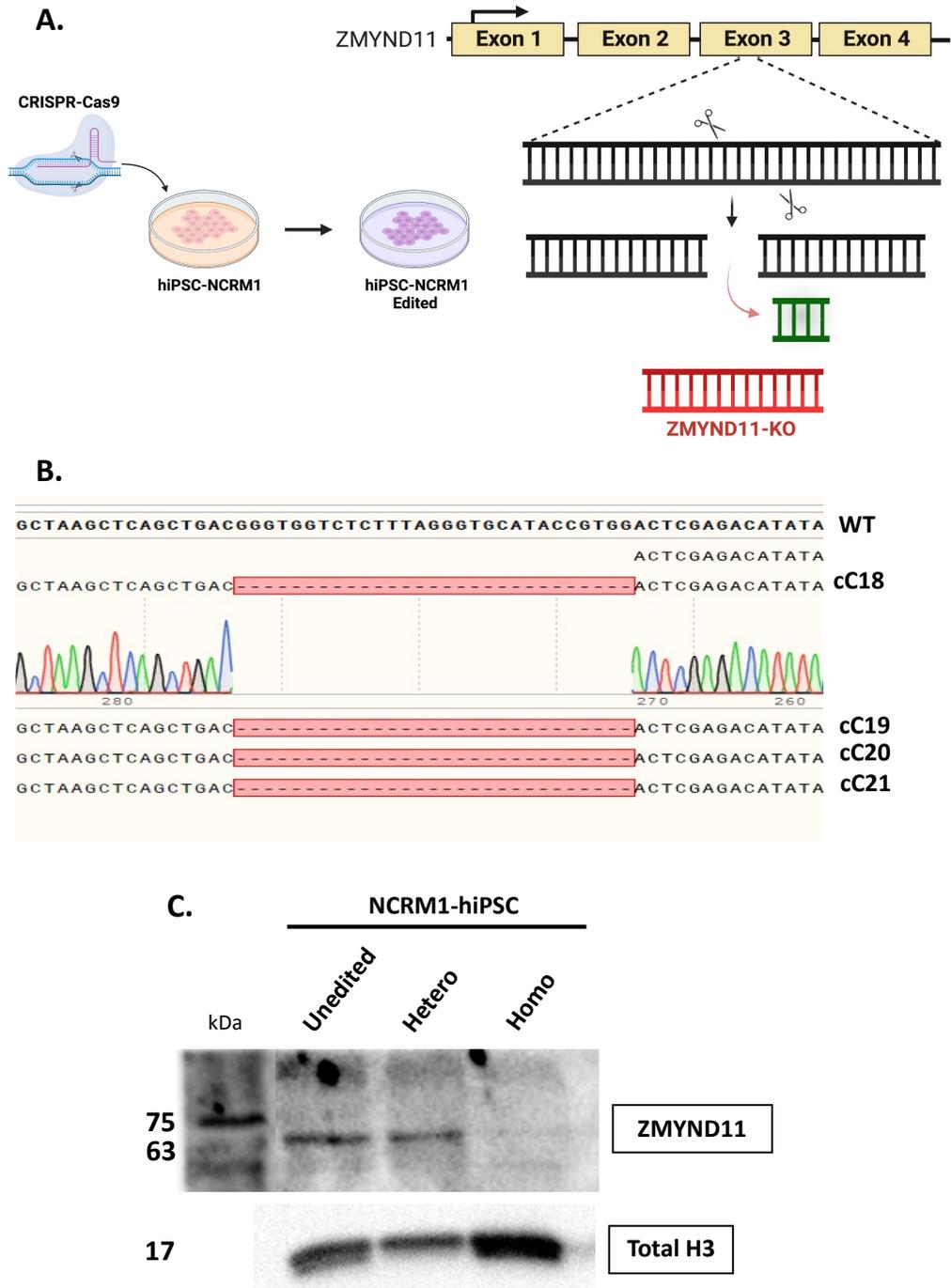


Figure 5. – Validation des mutants ZMYND11-KO générés par CRISPR-Cas9

Figure 5 : A. Illustration de la stratégie CRISPR-Cas9 pour générer les mutants KO pour ZMYND11 sur les cellules iPS-NCRM1. B. Résultat du séquençage par Sanger de l'ADNc amplifié par PCR généré à partir des clones d'iPSC afin de valider la délétion génique. C. Visualisation par Western blot de la production de ZMYND11, 50µg de protéine ont été utilisées pour un clone WT-unedited, un clone mutant hétérozygote et un clone mutant homozygote.

Pour générer les mutations hétérozygote G34V et A29P sur l’histone H3.3, l’approche de l’édition du génome par CRISPR-Cas9 a également été utilisée, à la différence que comme il s’agit d’introduire une mutation ponctuelle sur le gène *H3F3B*, des séquences d’ADN donneur (ssODN) qui portent chacune la mutation d’intérêt, ont été conçus (fig. 6A). Après le passage de la Cas9 qui va induire des cassures double brin sur le gène *H3F3B*, la séquence d’ADN donneur qui fait 200 paires de bases, portant la mutation ponctuelle, va servir de template pour introduire le changement d’un nucléotide dans le gène qui a été ciblé, lors de la réparation par recombinaison homologue (HDR) (Tableau 2).

Le gRNA et les ADN donneurs ssODN sont répertoriés dans le tableau 2. La validation des clones mutants est réalisée grâce à des amorces spécifiques ciblant l’exon 2 du gène *H3F3B* qui vont amplifier la séquence d’ADN cible et générer des produits de 500pb (Tableau 2).

Tableau 2. – Liste des oligos pour les mutants H3.3A29P et H3.3G34V (5’ vers 3’)

Séquence de guide ARN pour G34V et A29P		
H3F3B-Exon2	gRNA1	AAGCGCTCCCTCTACCGGCG brin négatif
Séquences ssODN pour G34V et A29P		
H3F3B-A29P	ssODN	GCCTTATCTTCGGGGCGTCTTTCTTAGGTGAAAGAAAATGGCCCGAACCAAGCA GACTGCTCGTAAGTCCACCGGTGGGAAAGCCCCCGCAAACAGCTGGCCACGAA AGCCGCCAGGAAAAGCCTCCCTCTACCGGCGGGGTGAAGAAGCCTCATCGCTA CAGGTAGGTCGGGCGGGGAACAATGGCCCGGCGGTGG
H3F3B-G34V	ssODN	GCCTTATCTTCGGGGCGTCTTTCTTAGGTGAAAGAAAATGGCCCGAACCAAGCA GACTGCTCGTAAGTCCACCGGTGGGAAAGCCCCCGCAAACAGCTGGCCACGAA AGCCGCCAGGAAAAGCCTCCCTCTACCGGCGGTGAAGAAGCCTCATCGCTA CAGGTAGGTCGGGCGGGGAACAATGGCCCGGCGGTGG
Séquences de primers pour le séquençage par Sanger pour G34V et A29P		
H3F3B_For	Primer 1	CCTCCTGTTGAGGACGAGAG
H3F3B_Rev	Primer 2	CTTATCTTCGGGGCGTCTTT
Séquences des amorces pour Séquençage par Miseq pour G34V et A29P		
H3.3G34V_CS1	Miseq-For	ACACTGACGACATGGTTCTACACCTCCTGTTGAGGACGAGAG
H3.3G34V_CS2	Miseq-Rev	TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTCTTATCTTCGGGGCGTCTTT

Tableau 2. Séquences de l’ARN guides ciblant l’exon 2 du gène *H3F3B*. L’ARN guide gRNA1 s’hybride en 5’ sur le brin négatif, les ADN donneurs ssODN qui portent respectivement les mutations A29P et G34V contribuent à la modification du gène *H3F3B*. Séquences des primers ciblant l’exon 2 du gène *H3F3B* pour identifier la présence des mutations ponctuelles induites par CRISPR-Cas9. L’amorce *H3F3B_For* s’hybride en 5’ sur le brin positif tandis que l’amorce *H3F3B_Rev* s’hybride en 5’ sur le brin négatif de l’ADN. Validation des clones positifs par séquençage haut débit Miseq afin d’identifier la présence ou non d’autres variants sur la séquence amplifiée.

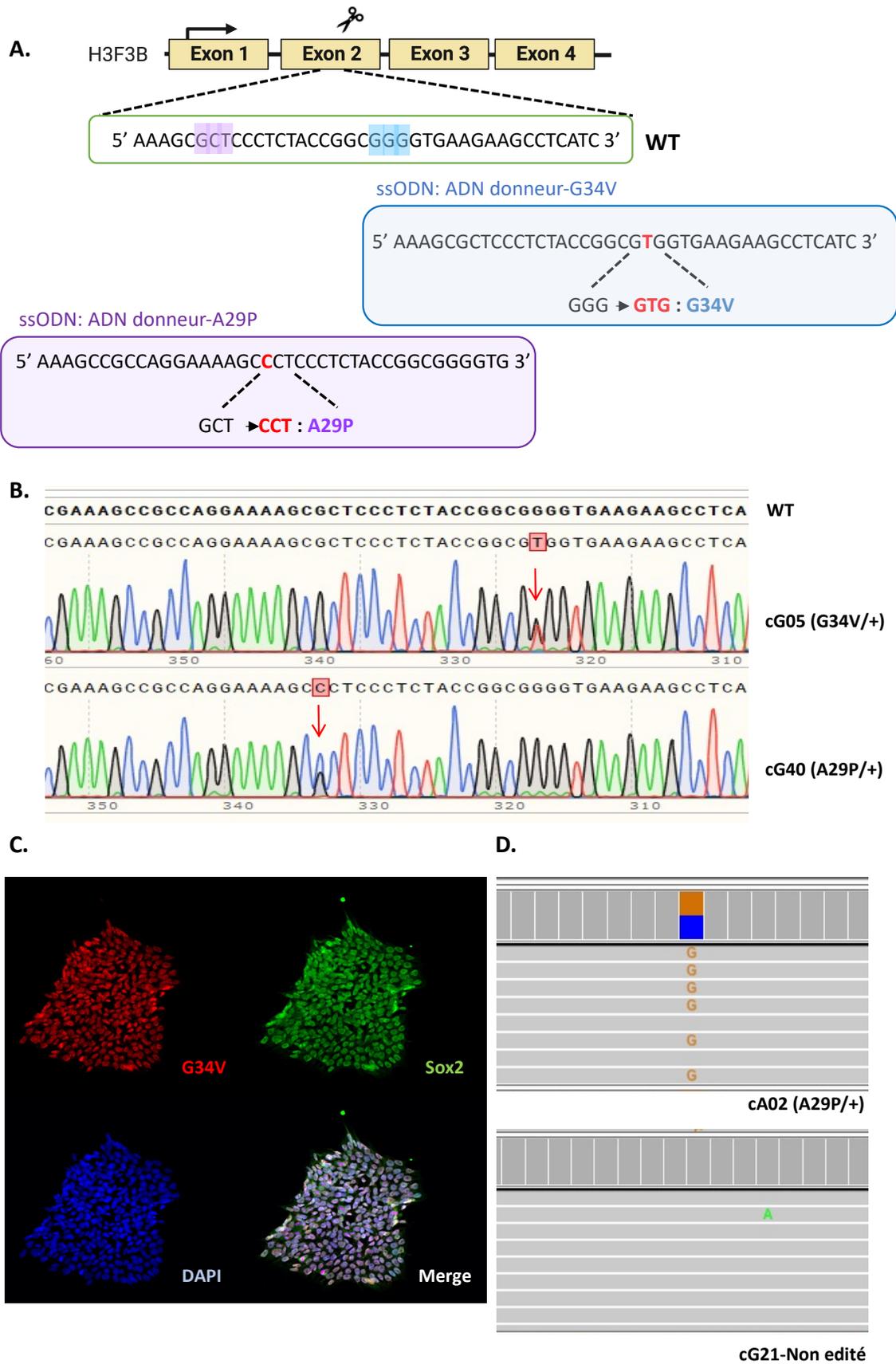


Figure 6. – Validation des mutants KI-H3F3B-G34V et KI-H3F3B-A29P générés par CRISPR-Cas9

Figure 6 : A. Illustration de la stratégie CRISPR-Cas9 pour générer les mutants knock-In (KI) H3F3B-G34V et H3F3B-A29P hétérozygote grâce à l'utilisation d'un ADN donneur (ssODN). La séquence nucléotidique qui code pour l'alanine (GCT) est surlignée en violet et la séquence d'acide nucléique qui code pour la glycine (GGG) est surlignée en bleu. La séquence d'ADN donneur ssODN porteuse de la mutation ponctuelle « CCT » pour A29P est indiquée à l'intérieur de la boîte violette, tandis que la substitution de la guanine en thymine va permettre de générer la mutation G34V (boîte bleue). B. Validation de la mutation H3F3B-G34V (clone cG05) et la mutation H3F3B-A29P par séquençage Sanger (clone cG40). C. Validation du clone cB08 pour la mutation G34V par Immunofluorescence au stade hiPSC. D. Validation du clone cA02 pour la mutation A29P par Mi-Sequencing.

Les résultats de séquençage par Sanger montrent une portion de l'exon 2 du gène *H3F3B*. La séquence en gras correspond à la séquence non modifiée WT, tandis que le clone hétérozygote cG05 montre en position 324 (flèche rouge) la substitution de la guanine en thymine, et le clone hétérozygote cG40 montre en position 334 (flèche rouge) la substitution de la cytosine en guanine (Fig. 6B).

Les résultats obtenus sur Sanger pour les mutations ponctuelles ont été davantage validés par Immunofluorescence pour la mutation H3.3G34V et par MiSeq pour la mutation H3.3A29P, (Fig. 6C-D).

Il est important de noter que l'insertion de la mutation ponctuelle H3.3G34V n'a pas impacté la pluripotence des cellules iPS NCRM1, comme le montre l'immunomarquage du mutant G34V qui est capable d'exprimer Sox2, un marqueur de la pluripotence. Il en est de même pour la mutation H3.3A29P et l'inactivation du gène *ZMYND11* qui n'ont montré aucun changement morphologique des cellules hiPS mutées comparé à des cellules saines WT.

Objectif 2 : Études des mutations épigénétiques sur un modèle de culture 3D

Au cours du développement, le cortex cérébral joue un rôle essentiel dans les processus cognitifs et intellectuels. Les cellules neuronales sont établies à partir des cellules souches neurales qui sont produites au niveau de la zone ventriculaire du cerveau. Pour mettre en place les différentes couches corticales qui gouvernent notre système nerveux, les cellules progénitrices migrent vers les couches supérieures du cortex et se différencient jusqu'à leur maturation [80].

Il est possible désormais de récapituler l'architecture interne du cortex cérébral en générant des structures 3D ou organoïdes corticaux à partir de cellules souches pluripotentes.

Les organoïdes cérébraux vont imiter les ventricules du cerveau sous forme de lumen. La région la plus proche du lumen va correspondre à la zone ventriculaire où les cellules vont s'établir le long d'un axe apico-basal et constituer une région riche en cellules souches neurales. Ces cellules neuronales prolifèrent et migrent vers la zone sous-ventriculaire (SVZ) pour donner naissance aux cellules progénitrices intermédiaires, qui à leur tour vont davantage se différencier pour migrer vers la plaque corticale et donner naissance aux neurones et cellules gliales (Fig. 7)

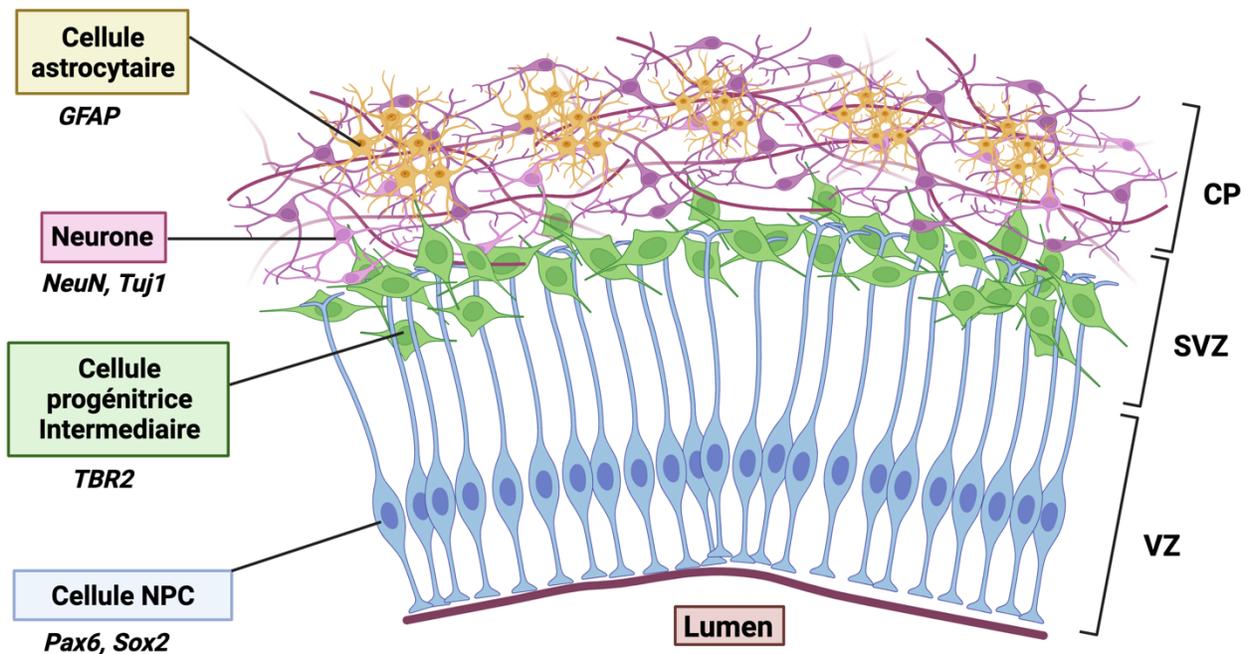


Figure 7. – Illustration d'un organoïde cortical.

Figure 7 Illustration, réalisée à partir du site BioRender, d'un organoïde cérébral révélant sa structure et sa composition cellulaire. Les cellules souches neurales se divisent à la surface apicale (lumen) et forment la zone ventriculaire (VZ). Ces cellules NPC vont se différencier en progéniteurs intermédiaires (IP) qui vont à leur tour migrer et donner naissance aux neurones ou cellules gliales au niveau de la plaque corticale (CP). Les marqueurs Sox2 et Pax6 sont exprimés dans les cellules NPC, TBR2 est un marqueur des cellules progénitrices intermédiaires ; CTIP2, Tuj1 et NeuN sont des marqueurs spécifiques aux neurones, et enfin GFAP s'exprime dans les cellules gliales.

Dans le cadre de mon projet, pour comprendre si la perte de la protéine ZMYND11 ou si les mutations épigénétiques H3F3B-A29P et H3F3B-G34V entraînent une dérégulation de la neurogenèse, la culture d'organoïdes cérébraux a été mise en place à partir des lignées hiPS isogéniques pour chaque mutation générée. L'impact de chaque mutation a été évalué en réalisant une caractérisation phénotypique des organoïdes cérébraux (taille, organisation de structures internes avec présence ou absence de lumens ou d'une lignée cellulaire) par Immunofluorescence (Fig.8). Le but étant d'identifier si un type cellulaire ou si la structure interne de l'organoïde pourraient être altérés.

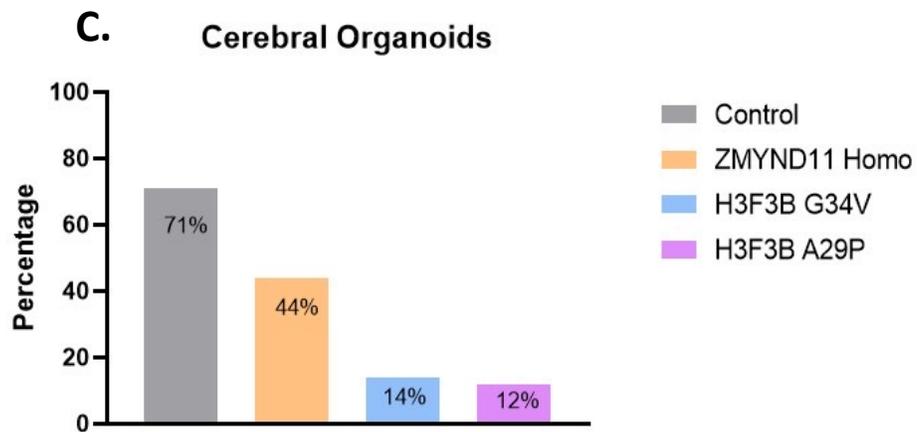
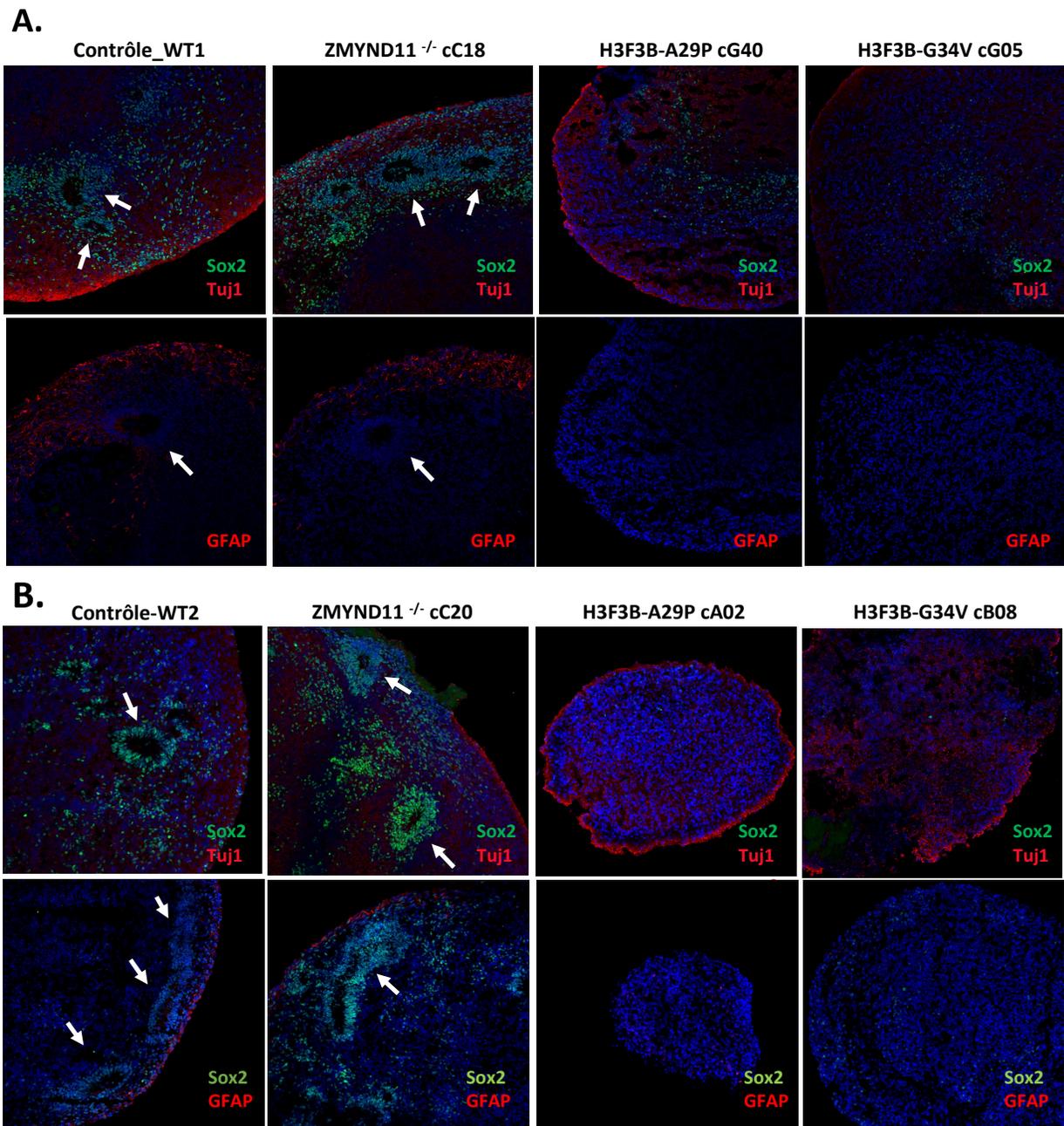


Figure 8. – Modélisation des organoïdes cérébraux à partir des modèles iPSC mutants

Figure 8: A. Image des organoïdes corticaux WT et mutants analysés à 60 jours de différenciation. Il s'agit de l'expérience I réalisée sur le clone H3F3B-WT1, le clone C18 pour le mutant ZMYND11-KO homozygote, le clone G40 pour le mutant H3F3B-A29P, et le clone G05 pour le mutant H3F3B-G34V. Le panel du haut montre le marqueur Sox2 (cellules NPC) localisé au niveau de la zone ventriculaire (flèches blanches) et TUJ1 (neurones) qui est localisé en périphérie autour des cellules progénitrices. Sur le panel du bas, l'immunofluorescence montre le marquage pour GFAP (astrocytes). B. Représentation des organoïdes corticaux WT et mutants analysés à 45 jours de différenciation ; Il s'agit de l'expérience II réalisée avec les mêmes marquages que l'expérience I mais sur d'autres clones : H3F3B-WT2, le clone C20 pour le mutant ZMYND11-KO homozygote, le clone A02 pour le mutant H3F3B-A29P, et le clone B08 pour le mutant H3F3B-G34V. C. Pourcentage de formation de structures internes dans le contrôle WT et les différents mutants à 8 semaines de différenciation (n= 8 organoïdes/condition).

Grâce à la génération de plusieurs clones, chaque expérience a été menée avec un clone différent. Les images ont été prises à huit semaines de développement pour l'expérience I (Fig. 8A) et à six semaines de développement pour l'expérience II (Fig. 8B). Les images ont été acquises au microscope confocale Zeiss LSM780 Laser Scanning Confocal avec un objectif de grossissement 20X et analysées à l'aide du logiciel Zen.

La différenciation de la lignée parentale WT montre la présence de cellules progénitrices qui expriment la protéine Sox2, un marqueur des cellules souches neurales. Ces cellules progénitrices s'organisent autour de cavités communément appelées lumens (flèche blanche). Pour identifier la présence de cellules matures appartenant à la voie neuronale ou gliale, un anticorps dirigé contre la protéine Tuj1 spécifique pour le marquage des neurones, et l'anticorps GFAP exprimé dans les astrocytes ont été testés sur les organoïdes cérébraux (Fig. 8A-B). Les neurones et les cellules astrocytaires s'expriment et se localisent en zone périphérique des cellules progénitrices à partir de quatre semaines de différenciation [81].

Les mêmes marquages ont été réalisés dans les modèles mutants pour voir si l'organisation interne des organoïdes cérébraux était perturbée. Il a été surprenant de voir que le mutant ZMYND11-KO homozygote est capable de former des structures internes, au même titre que le modèle parental WT. En effet les deux clones ZMYND11-KO homozygote, C18 et C20, forment des lumens autour desquels les cellules progénitrices vont proliférer et se différencier en cellules matures neuronales et gliales (Fig.8A-B).

En revanche, les mutants H3.3G34V et H3.3A29P montrent clairement une diminution de la population de cellules NPC et une absence de structures internes. L'expression de GFAP est totalement absente dans les deux clones mutants pour H3.3G34V (cB08 et cGG05) et pour H3.3A29P (cG40 et cA02) comparé au contrôle WT1 et WT2 (Fig.8A-B).

Enfin, pour chaque condition, huit organoïdes à huit semaines de différenciation ont été analysés en termes de morphologie et leur capacité à former des structures internes. Les mutations H3F3B-G34V et H3F3B-A29P entraînent des effets plus sévères sur la morphologie des organoïdes comparé au contrôle WT. Tandis que les mutants ZMYND11-KO homozygote montrent un impact modéré comparé au contrôle WT (Fig.8C).

Toutefois, on peut noter la présence de neurones à travers l'expression de Tuj1 dans les mutants H3.3G34V et H3.3A29P. Au vu de ces résultats, il est plausible que la perte de cellules progénitrices soit survenue peu après un mois de différenciation.

En effet, à un mois de différenciation le mutant H3.3G34V est capable de générer des cellules progénitrices neurales (Fig. 9A). Le niveau d'expression de Sox2 a été quantifié dans les contrôles H3F3B-WT et les mutants H3.3G34V et les résultats montrent que l'expression de Sox2 est statistiquement plus élevée dans les deux clones H3.3G34V comparé au contrôle WT (Fig.9B).

Dans le contexte normal, les cellules NPC prolifèrent et se différencient pour donner naissance aux neurones. Dans le cas de la mutation H3.3G34V, qui montre une expression de Sox2 significativement augmentée, il est probable que l'expression élevée de Sox2 dérégule les voies de signalisations impliquées dans la différenciation neuronale à un stade ultérieur à deux mois du développement des organoïdes cérébraux. Cette forte augmentation de Sox2 dans les cellules progénitrices a permis de produire des neurones, mais aussi d'induire une forme d'apoptose des cellules progénitrices à deux mois de différenciation (Fig. 8A-B). Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour valider cette hypothèse afin d'expliquer le déclin de la population cellulaire progénitrice dans les mutants H3.3G34V et H3.3A29P.

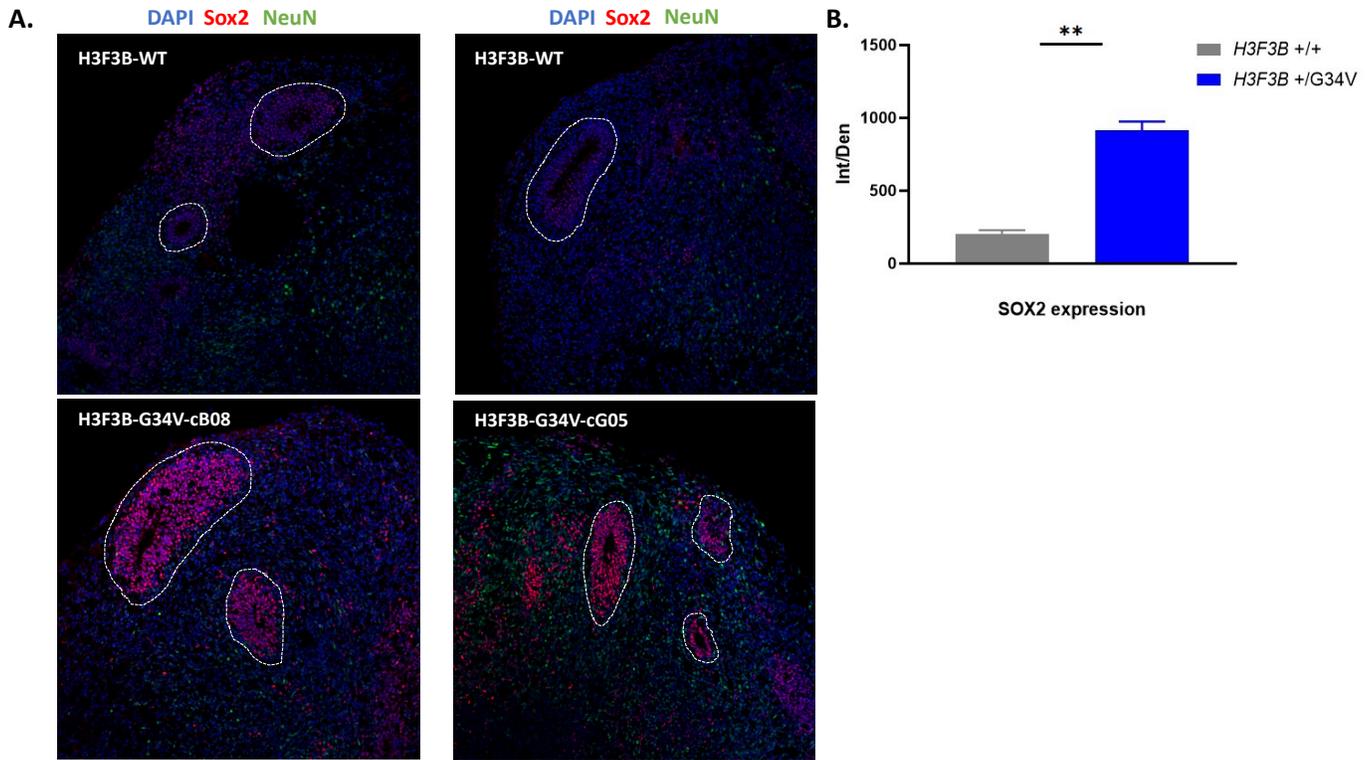


Figure 9. – Expression de Sox2 dans les organoïdes cérébraux H3F3B-G34V à 30 jours

Figure 9 : A. Images des organoïdes cérébraux pour le contrôle WT (panel haut) et les mutants G34V (panel bas) différenciés à 30 jours prises au grossissement 20X. La coloration par Immunofluorescence a été réalisée pour les marqueurs Sox2 (rouge) et NeuN (vert). B. Analyse quantitative des cellules positives pour Sox2 (régions délimitées par une ligne blanche en pointillée) sur 2 répliques H3F3B^{-G34V/+} et 2 répliques H3F3B^{+/+} dans une expérience. Pour chaque génotype, la signification statistique a été évaluée à l'aide du test de Student. **P<0,01.

Objectif 3 : Impact des mutations germinales sur H3F3B et ZMYND11 au niveau épigénomique et transcriptomique

Pour comprendre comment ces mutations impactent l'épigénome, les modèles cellulaires isogéniques ont été différenciés vers la voie neuronale, et collectés à des étapes clés lors de la différenciation : le stade de pluripotence (iPSC) et le stade progéniteur (NPC), afin d'identifier de possibles changements transcriptomiques ou épigénomiques.

La marque de tri-méthylation sur l'histone H3K36 (H3K36me3) au niveau des régions codantes va promouvoir le recrutement de ZMYND11 sur ces mêmes régions du génome où il vient réguler l'activité de l'ARN Pol II. Dans le contexte de la perte de fonction de la protéine ZMYND11 ou que H3.3 soit mutée sur des résidus clés tels que l'alanine 29 et la glycine 34, on émet la possibilité de voir une perte de la liaison de ZMYND11 à H3K36me3, ce qui risque d'entraîner une augmentation de l'enrichissement en ARN Pol II au niveau de gènes spécifiques, impliqués très probablement dans la différenciation neurale en raison de l'incapacité de ZMYND11 à co-réprimer l'activité de l'ARN Pol II.

1. Perte de liaison de ZMYND11 à H3K36me3 dans les modèles mutants

Pour valider cette théorie, un CHIP-sequencing a été effectué sur une lignée contrôle parentale et les lignées mutantes pour la marque épigénétique ZMYND11. L'enrichissement de ZMYND11 sur les régions codantes et sa co-localisation avec H3K36me3 ont été validés par CHIP-seq. Les résultats montrent bien que ZMYND11 se dépose sur les régions codantes et co-localise avec la marque de H3K36me3 (régions encadrées en bleu). Néanmoins, il existe certaines régions, où la marque de H3K36me3 est présente, qui ne sont pas régulées par ZMYND11 (régions encadrées en jaune) (Fig. 10A-B). Le profil d'expression de ZMYND11 dans le contrôle WT ainsi que dans les différents mutants est représenté sous forme de graphes de densité d'enrichissement (Heatmap) (Fig. 10D).

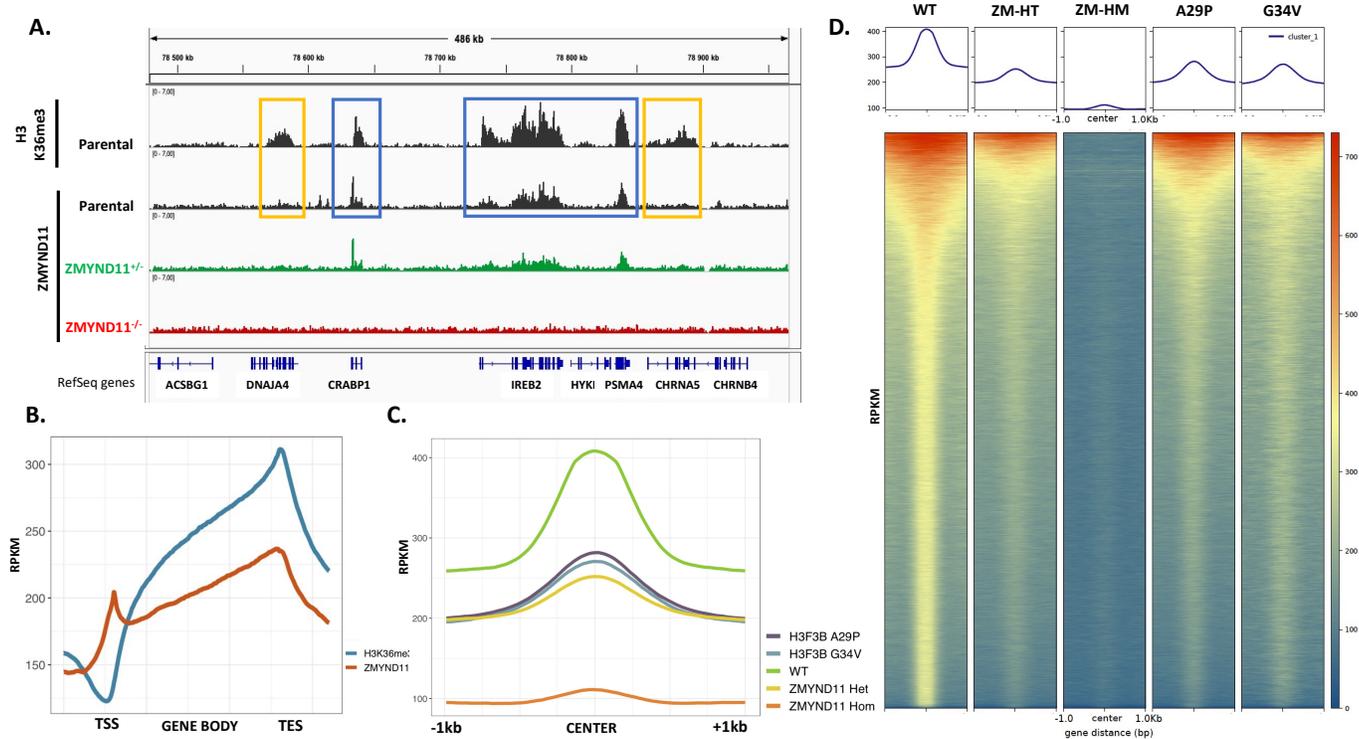


Figure 10. – Enrichissement de ZMYND11 sur le génome

Figure 10 : A. Représentation des ChIP-seq tracks pour la marque de K36me3 dans le contrôle parental WT (noir) et la déposition de ZMYND11 dans le contrôle parental WT (noir), le ZMYND11 mutant hétérozygote (vert) et ZMYND11 homozygote (rouge). B. Occupations moyennes de ZMYND11 et H3K36me3 sur les régions codantes du génome. 3kb en amont du TSS et 3kb en aval du TTS sont également inclus. C. Profil de déposition de la marque ZMYND11 sur les régions d'exons dans le contrôle WT et les différents mutants, le centre des exons est en position 0 avec 1 kb en amont et en aval. Aucun/faible enrichissement = 0-100 rpk, enrichissement modéré = 200-300 rpk, enrichissement élevé= 300-400rpk. D. Visualisation par Heatmap du signal ChIP-seq pour ZMYND11 dans l'ensemble du génome dans le contrôle WT et les divers mutants générés. Aucun/faible enrichissement = 0-200 rpk, enrichissement modéré = 200-500 rpk, enrichissement élevé= 500-700rpk.

Comme attendu, la déposition de ZMYND11 dans le mutant ZMYND11-KO hétérozygote comparé au contrôle WT est bien diminuée, et quasi absente dans le mutant ZMYND11-KO homozygote, sur l'ensemble des régions codantes du génome.

L'enrichissement de ZMYND11 dans les mutations H3.3G34V et H3.3A29P est également diminué au même niveau que le mutant ZMYND11 hétérozygote, comparé au contrôle WT (Fig. 10C).

Ces résultats montrent que la perte de fonction de ZMYND11 ainsi que les mutations ponctuelles sur l'histone H3.3 (H3.3G34V et H3.3A29P) affectent le recrutement de ZMYND11 sur les régions codantes du génome.

Afin de repérer si l'inactivation de ZMYND11 ou si les mutations H3.3G34V et H3.3A29P ont un impact sur les marques d'histones sur les cellules au stade pluripotent, un ChIP-seq sur les lignées mutantes pour les marques d'histones H3K27ac, H3K27me3 et H3K36me3 a été réalisé.

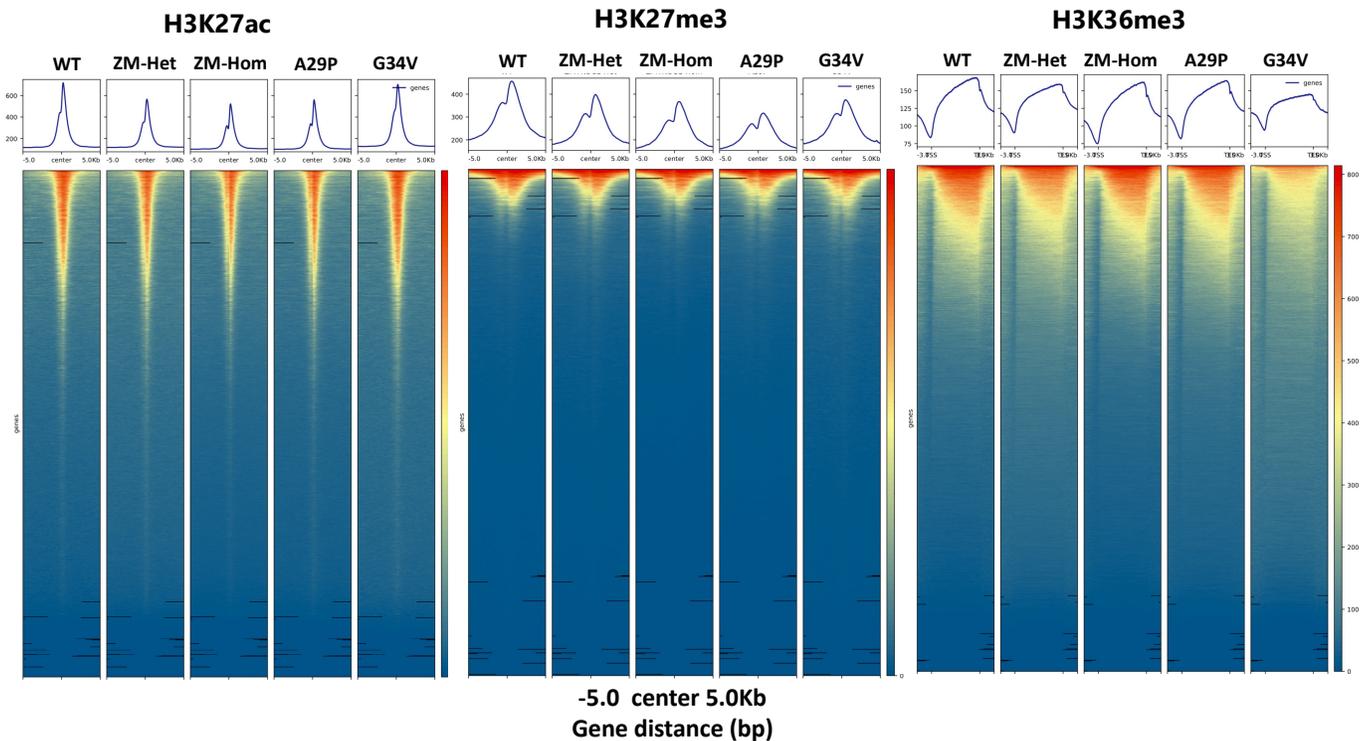


Figure 11. – Profile des marques d'histones sur le génome dans les mutants iPS isogéniques

Figure 11 : Représentation des pics d'enrichissement et des Heatmap visualisant le signal ChIP-seq pour les marques d'histones H3K27ac, H3K27me3 et H3K36me3 sur les régions codantes dans le contrôle WT et les mutations d'intérêts générées sur les cellules hiPS-NCRM1. Aucun/faible enrichissement = 0-200 rpkm, enrichissement modéré = 200-500 rpkm, enrichissement élevé= 500-800rpkm.

Les pics d'enrichissements montrent que l'inactivation complète de ZMYND11 entraîne une diminution de la marque H3K27ac avec une intensité à 500 rpkm contre 650 rpkm dans le contrôle WT. Le niveau de la marque épigénétique H3K27me3 est également diminué dans le mutant ZMYND11 homozygote avec une valeur de 350 rpkm, tandis que le WT possède une intensité à environ 500 rpkm. Cette diminution pour les deux marques épigénétiques semble progressive ; dans le sens où, elle est plus prononcée dans le mutant ZMYND11 homozygote comparé au mutant ZMYND11 hétérozygote (Fig. 11).

La mutation H3.3A29P semble affecter la tri-méthylation de H3.3K27 avec une réduction de celle-ci à 300 rpkm, tandis que le contrôle WT a un enrichissement de 500 rpkm. Toutefois, dans l'ensemble la mutation H3.3A29P et la perte de fonction de ZMYND11 ne montrent pas de changement statistiquement significatif sur l'ensemble des marques d'histones au stade de cellules souches lorsque l'on regarde l'intensité des marques épigénétiques au niveau des régions promotrices et régions codantes du génome (Fig. 11).

En revanche, la mutation H3.3G34V entraîne une diminution importante du niveau de tri-méthylation sur H3K36 et du recrutement de la protéine ZMYND11 (Fig. 12).

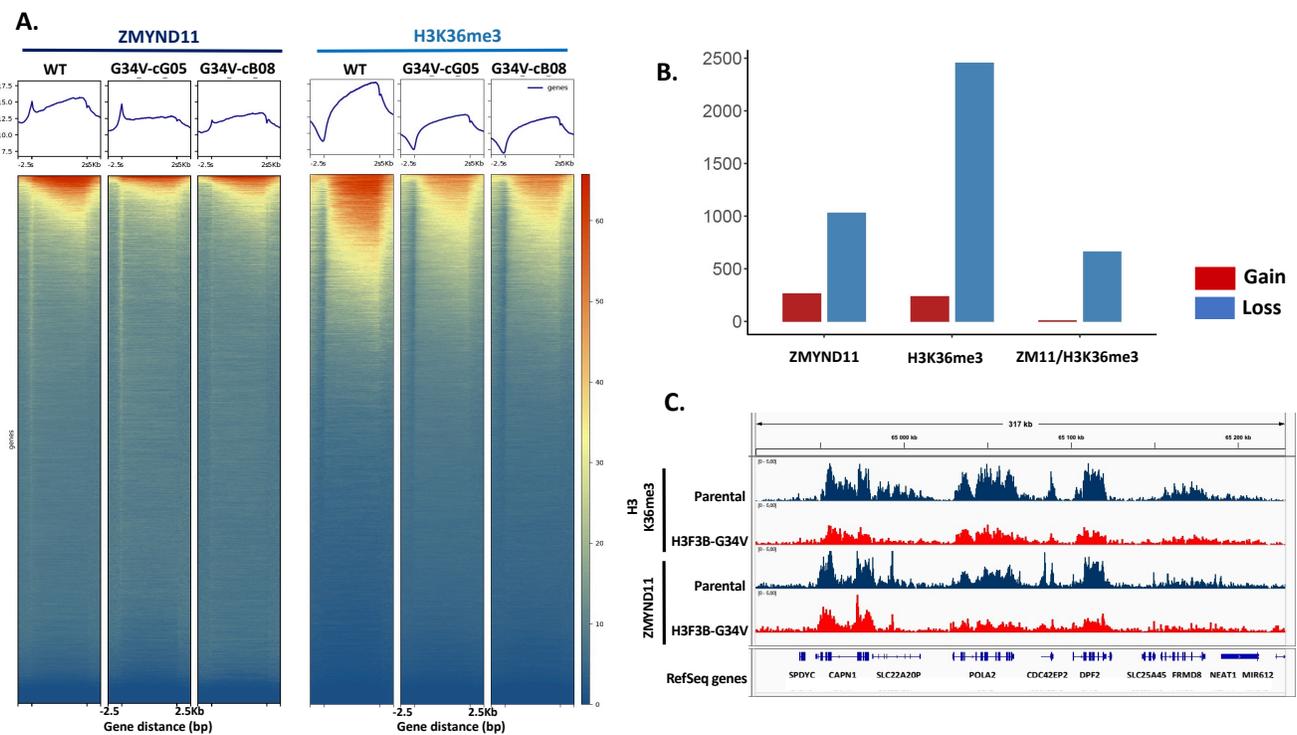


Figure 12. – Impact de la mutation H3.3G34V sur ZMYND11 et la tri-méthylation de H3K36

Figure 12 :: A. Visualisation par ChIP-seq de l'enrichissement de ZMYND11 et la marque H3K36me3 dans les mutants G34V sur les régions codantes dans le contrôle WT et les clones cG05et cB08 portant la mutation H3.3G34V. Le dégradé de rouge à bleu indique les enrichissements élevés à faibles dans la région correspondante. Aucun/faible enrichissement = 0-20 rpkm, enrichissement modéré = 20-40 rpkm, enrichissement élevé= 40-60rpkm. B. Quantification du nombre de gènes qui perdent la marque de ZMYND11 et H3K36me3 sur les régions codantes pour la mutation H3.3G34V. C. Visualisation des ChIP-seq tracks pour la marque ZMYND11 et la marque H3K36me3 dans le clone mutant G34V-cG05 sur les régions codantes (enrichissement en rouge) comparés au contrôle WT parental (enrichissement en bleu).

D'après la littérature, il a été montré que la mutation H3.3G34V impacte la liaison de ZMYND11 sur H3K36me3 [36], et que la substitution de la glycine 34 en valine sur la région N-terminale de l'histone de H3.3 (H3.3G34V), altère l'activité enzymatique de SETD2 sur H3K36 en cis [45]. A ce jour, l'impact de la mutation H3F3B-G34V n'a pas été étudié dans le contexte développemental.

A travers le modèle cellulaire d'iPS mutant pour H3F3B-G34V, il a été possible d'étudier par CHIP-seq l'impact de la mutation G34V sur la tri-méthylation de H3K36 et la déposition de la marque épigénétique ZMYND11 sur les régions codantes. Les deux clones cB08 et cG05 portant la mutation H3.3G34V montrent une réduction de H3K36me3 sur l'ensemble des régions codantes du génome et une réduction de l'expression de ZMYND11 (Fig. 12A). De plus, une grande partie de la perte de ZMYND11 corrèle avec la diminution de H3K36me3 (Fig. 12B-C).

On peut conclure sur cette partie que le recrutement de ZMYND11 est bien diminué dans les mutants ZMYND11-KO et dans les mutants H3.3G34V et H3.3A29P au niveau des régions codantes. Les résultats obtenus pour la mutation H3.3G34V sur les cellules iPS pour la marque d'histone H3K36me3 et la marque épigénétique ZMYND11 concordent avec les études publiées dans la littérature, notamment le fait que la mutation H3.3G34V affecte le recrutement de la protéine ZMYND11 et l'HMT SETD2. Enfin la mutation H3.3A29P semble diminuer la marque épigénétique H3K27me3 dans les cellules iPS.

Il serait intéressant de voir, lorsque ZMYND11 est inactivée, l'impact sur la transcription des gènes, étant donné son implication dans la transcription, et d'identifier de potentielles altérations sur le transcriptome dans les mutants H3.3G34V et H3.3A29P.

2. Analyse du transcriptome des mutants ZMYND11-KO, H3.3G34V et H3.3A29P dans les cellules iPS.

L'étude du transcriptome sur les cellules iPS WT et les mutants ZMYND11-KO homozygote et hétérozygote a été réalisée afin d'évaluer si la perte de fonction de ZMYND11 affecte le niveau d'expression de certains gènes.

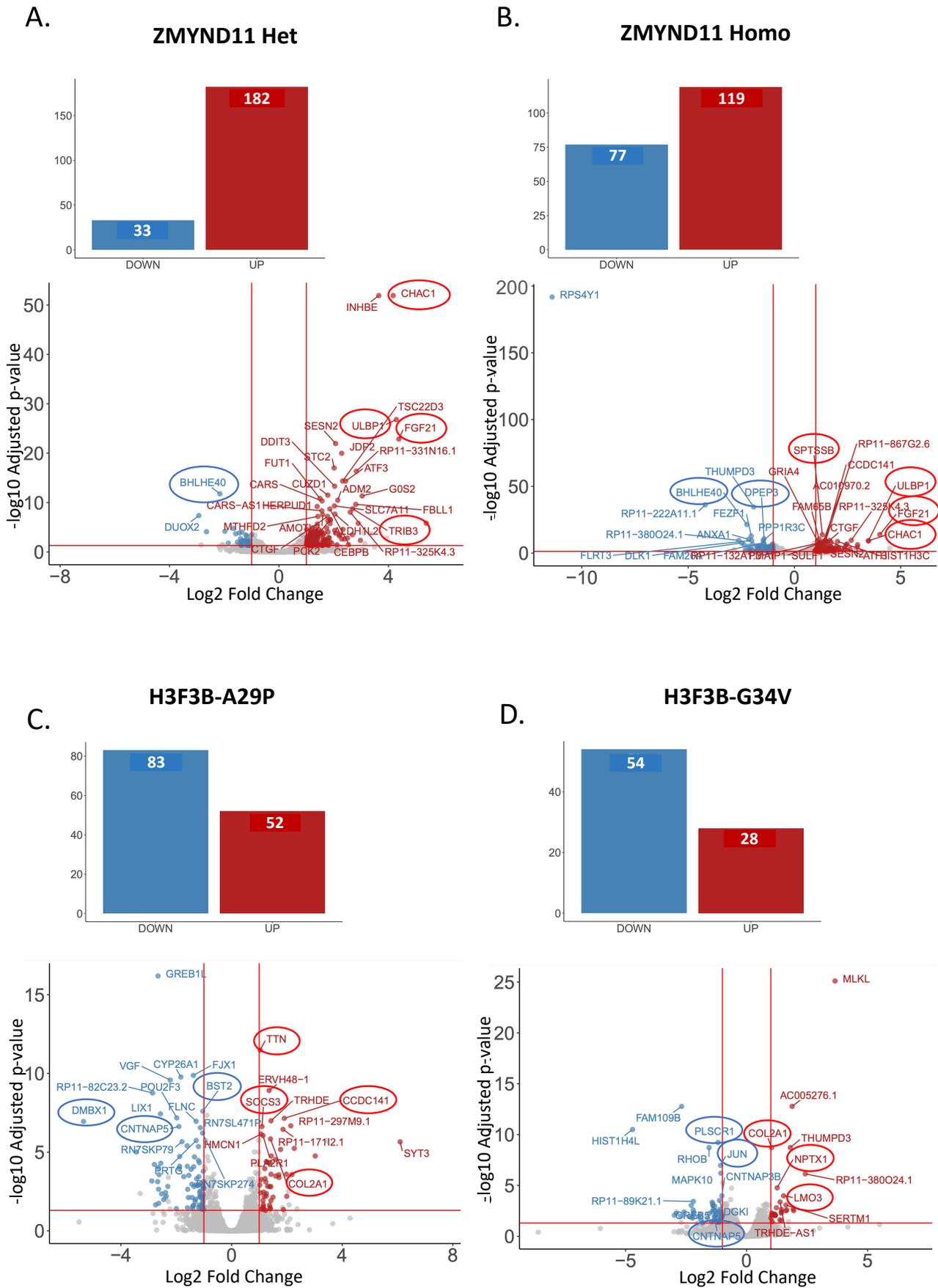


Figure 13. – Résultats de RNA-seq pour les mutants ZMYND11-KO et H3F3B au stade iPSC

Figure 13 : A. Résultat de l'analyse des données de RNA-Seq pour le mutant ZMYND11-KO hétérozygote. Le panel du haut représente une analyse du nombre de gènes différentiellement exprimés (DEG) avec en bleu les gènes qui perdent en expression, et en rouge les gènes surexprimés. Le panel du bas montre la distribution des gènes différentiellement exprimés (DEG) représentée sous forme de volcano plot. (Adjusted p-value < 0.05, log2fc > 1, base mean >100). B. Analyse du niveau d'expression des gènes pour le mutant ZMYND11-KO homozygote comparé au WT. C. Analyse du niveau d'expression des gènes pour le mutant H3F3B-A29P comparé au WT. D. Analyse du niveau d'expression des gènes pour le mutant H3F3B-G34V comparé au WT. Les résultats de séquençage de l'ARN (RNA-seq) ont été générés avec trois réplicats (n=3).

Au stade pluripotent, les mutants ZMYND11 hétérozygotes montrent une surexpression de 182 gènes et une diminution d'expression génique sur 33 gènes. Les mutants ZMYND11 homozygotes montrent également des changements transcriptomiques avec une surexpression de 119 gènes et une sous-expression génique de 77 gènes. Parmi les gènes en commun qui sont affectés dans les mutants ZMYND11 hétérozygotes et homozygotes, on retrouve les gènes *ULBP1*, *BHLHE40* qui sont impliqués dans les voies de réponses au système immunitaire, et les gènes *FGF21*, *DPEPB* et *SPTSSB* qui sont impliqués dans le métabolisme cellulaire (Fig. 13A-B).

L'analyse du transcriptome a été également réalisée sur les cellules iPS pour les mutations H3.3G34V et H3.3A29P qui ont aussi montré des altérations géniques, notamment certains gènes impliqués dans le développement du système nerveux tels que *DMBX1*, *CCDC141*, *CNTNAP5*, *LMO3* et *NPTX1* qui sont perturbés dans les mutants H3.3G34V et H3.3A29P. En plus des processus impliqués dans le développement cérébral, les gènes *JUN*, *BST2* et *SOCS*, impliqués dans la voie de réponse à l'inflammation sont dérégulés. Il en est de même pour les gènes *TTN* (Titin) et *COL2A1* qui sont impliqués dans la formation du tissu musculo-squelettique (Fig. 13C-D).

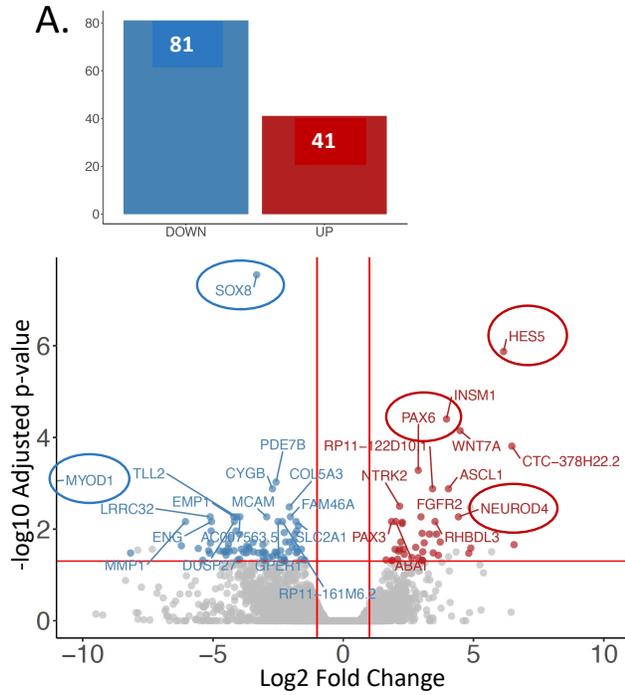
En conclusion de cette partie, les mutants H3.3G34V et H3.3A29P montrent déjà des perturbations sur certains gènes impliqués dans les voies neuronales au stade iPS, tandis que la perte de fonction de ZMYND11 montre des effets sur l'expression de certains gènes principalement impliqués dans les voies immunitaires, et métabolique au stade pluripotent. Ces changements transcriptomiques pourraient expliquer l'impact sévère des mutations sur l'histone H3.3 dans les organoïdes de cerveaux, comparés à la perte de fonction de ZMYND11. Il est possible que des changements plus importants au niveau transcriptomique se produisent à un stade plus différencié des cellules pour les mutants ZMYND11-KO, H3.3G34V et H3.3A29P.

Les cellules souches ont cette particularité de se différencier en n'importe quelles lignées cellulaires. Les lignées mutantes isogéniques ont été différenciées en cellules progénitrices neurales, et envoyées au séquençage afin de voir si des changements transcriptomiques plus importants s'établissent.

3. Analyse du transcriptome des mutants ZMYND11-KO au stade de cellules NPC

C'est bien au stade de NPC, lorsque ZMYND11 est muté, que des changements d'expression géniques plus importants apparaissent, comparé au stade cellulaire iPS. En effet, lorsque les mutants hétérozygotes sont comparés aux mutants homozygotes pour ZMYND11, l'impact est plus prononcé dans les mutants homozygotes avec 491 gènes surexprimés contre 41 dans les mutants hétérozygotes, et 1036 gènes négativement régulés dans les mutants homozygotes contre 81 gènes dans les mutants ZMYND11 hétérozygotes (Fig. 14 A-B)

ZMYND11 Het



ZMYND11 Homo

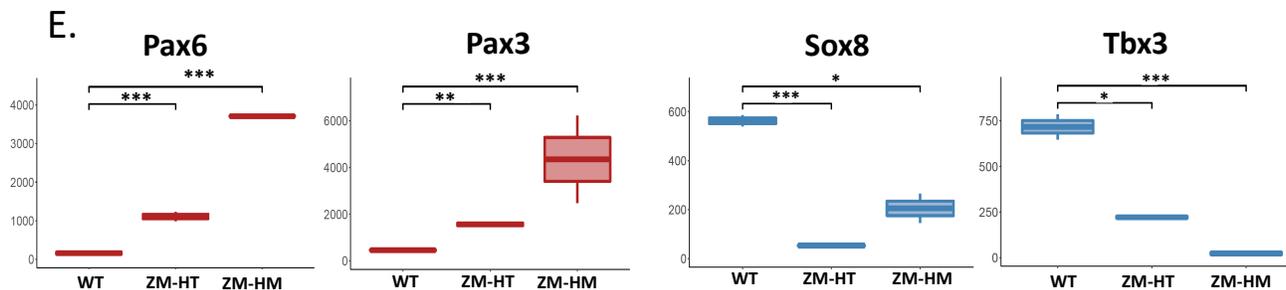
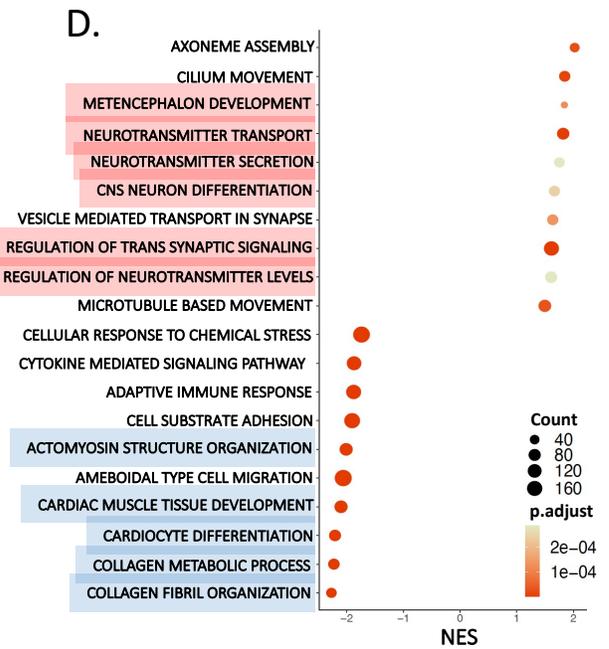
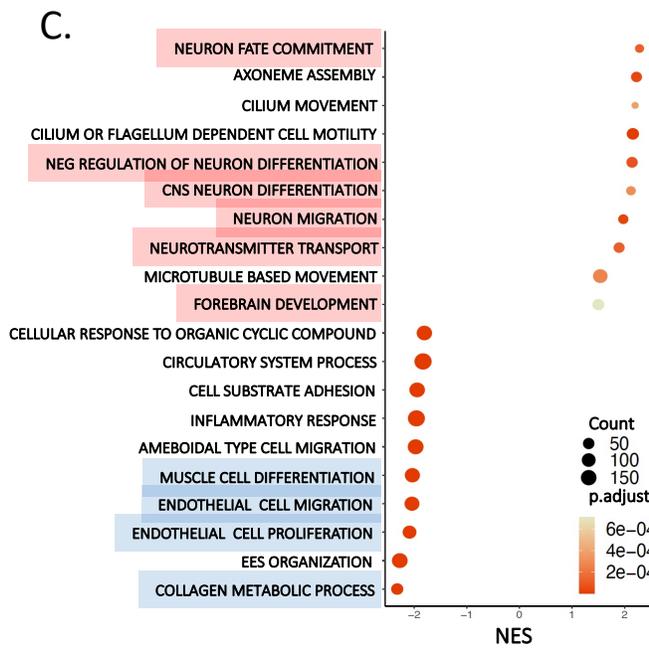
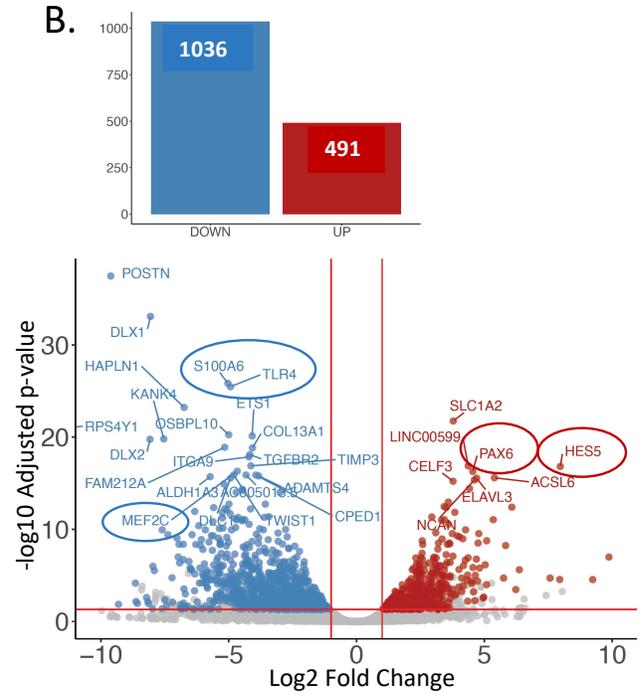


Figure 14. – Résultats de RNA-seq pour les mutants ZMYND11 au stade NPC

Figure 14: A-B. Résultat de l'analyse des données de RNA-Seq, pour le mutant ZMYND11-KO hétérozygote (A) et le mutant ZMYND11-KO homozygote (B). Le panel du haut représente une analyse du nombre de gènes différentiellement exprimés (DEG) avec en bleu les gènes qui perdent en expression, et en rouge les gènes surexprimés. Le panel du bas montre la distribution des gènes différentiellement exprimés (DEG) représentée sous forme de volcano plot. Les gènes *Sox8*, *MyoD1*, *S100A6*, *MEF2C* et *TLR4* sont impliqués dans la voie de différenciation musculo-squelettique. Les gènes *Pax6*, *Hes5*, *NeuroD4* régulent la neurogenèse. (Adjusted p -value < 0.05, $\log_2fc > 1$, base mean > 100. C-D. (GSEA- Gene Set Enrichment Analysis). C-D. Représentation des voies de signalisations significativement enrichies positivement ou négativement dans le mutant hétérozygote (C) et le mutant homozygote (D). Les termes sur l'axe vertical correspondent aux voies de signalisations et l'axe horizontal représente le score d'enrichissement normalisé. La profondeur de la couleur est représentée en valeur p ajustée. Le diamètre du cercle sur le graphique correspond au nombre de gènes. E. Représentation des boîtes à moustaches avec les niveaux d'expression des gènes *Pax6* et *Pax3* impliqués dans la différenciation neuronale et les gènes *Sox8* et *Tbx3* impliqués dans la différenciation du tissu musculo-squelettique dans le contrôle WT, les mutants ZMYND11-KO hétérozygote et homozygote. (Valeur p : 0.05 = *, 0.01 = **, 0.001 = ***, ns = non significatif). Les résultats de séquençage de l'ARN (RNA-seq) ont été générés avec deux répliquats ($n=2$) pour cette expérience.

Après avoir fait une analyse d'enrichissement d'ensemble des gènes (GSEA) pour déterminer si un groupe de gènes défini présente des différences significatives dans une voie biologique donnée, comparé au contrôle WT. Il s'avère que la perte de fonction ZMYND11 entraîne la sous régulation de gènes impliqués dans le développement mésenchymateux, comprenant le développement du muscle et les cellules endothéliales. Tandis que les gènes qui sont surexprimés sont impliqués dans le développement du système nerveux central et la différenciation des neurones (Fig. 14C-D).

Parmi ces gènes, on retrouve *Pax6*, un facteur de transcription qui exerce un rôle majeur dans le développement cortical. Il est exprimé dans les cellules souches neurales et est impliqué dans leur prolifération et leur renouvellement [82]. *Pax3* est également un facteur de transcription qui a été décrit essentiellement dans la formation du tube neural mais qui joue aussi un rôle dans le développement du muscle squelettique et le système nerveux central [83, 84](Fig. 14E).

Parmi les gènes sous-exprimés on retrouve le gène *Sox8*, un facteur de transcription exprimé dans la formation du tissu osseux et dans les cellules satellites, qui agit comme un régulateur négatif [85, 86]. On retrouve également le gène *Tbx3*, un facteur de transcription qui joue un rôle important dans le développement musculo-squelettique [87](Fig. 14E).

La perte d'expression des gènes impliqués dans la voie mésenchymateuse pourrait expliquer les anomalies squelettiques observées chez les patients atteints de troubles développementaux, liés aux mutations sur le gène ZMYND11, d'où son importance dans le développement embryonnaire [88].

Dans l'ensemble, ces résultats de RNA-seq suggèrent que ZMYND11 joue un rôle dans la régulation de la transcription de certains gènes impliqués dans la neurogenèse, notamment dans la régulation physiologique des neurotransmetteurs et la différenciation neuronale. En effet, la perte de production de la protéine ZMYND11 entraîne une surexpression de ces gènes et une réduction d'expression de gènes impliqués dans le développement du tissu musculo-squelettique.

L'augmentation d'expression des gènes impliqués dans la voie neuronale peut s'expliquer par le fait que l'abolition de ZMYND11 ne puisse plus réguler négativement l'activité de l'ARN polymérase II au niveau de ces gènes, ce qui expliquerait l'augmentation de marqueurs tels que Pax6, Hes5, Neurod4 et Pax3. Cette augmentation peut conduire les cellules neurales à ne pas pouvoir se différencier correctement vers une lignée neuronale spécifique et entraîner un déséquilibre du système nerveux.

Récemment, nous avons effectué le RNA-seq sur les mutants H3.3G34V et H3.3A29P au stade de cellules neurales. Nous attendons les résultats pour confirmer s'il y'a une dérégulation plus importante de l'expression des gènes au vue des résultats obtenus sur les organoïdes de cerveaux.

Chapitre 4 – Discussion

Dans le cadre de mon projet, l'utilisation du modèle de cellules souches pluripotentes aura permis de mieux comprendre l'importance des mécanismes épigénétiques au cours du développement. En effet, grâce à l'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 sur les cellules iPS, il a été possible d'inactiver le gène *ZMYND11* et d'insérer les mutations ponctuelles d'intérêt sur le gène *H3F3B* impliqué dans les troubles neuro-développementaux.

Avec leur capacité à se différencier, il a été possible d'identifier certaines causes qui pourraient expliquer les phénotypes observés chez les patients atteints de troubles du développement. Notamment, la perte de la protéine ZMYND11 dans les cellules progénitrices a montré que l'expression des voies impliquées dans la différenciation neuronale était augmentée, tandis que l'expression des gènes impliqués dans le tissu musculaire et squelettique était diminuée. ZMYND11 n'étant plus présente pour réguler l'activité de l'ARN polymérase II, celle-ci pourrait avoir l'opportunité d'augmenter son activité transcriptionnelle sur les gènes neuronaux à un moment défini lors de la neurogenèse.

Cette dérégulation des voies de différenciations neuronales pourrait en partie expliquer les phénotypes observés chez les patients dont le gène *ZMYND11* est muté, (Fig 2B). Il est fort probable que les fonctions cognitives du cortex préfrontal soient altérées car la majorité de ces patients montrent une déficience intellectuelle, des épisodes épileptiques et des troubles du comportement souvent associés à une hyperactivité et à de l'agressivité [89]. Les résultats obtenus à partir des cellules NPC ont montré une diminution d'expression des gènes impliqués dans la différenciation musculo-squelettique, tel que le gène *Tbx3* impliqué dans le développement des glandes mammaires, des membres supérieurs et du cœur [90]. La perte de fonction du gène *Tbx3* est associée au syndrome cubito-mammaire, une maladie autosomique dominante rare caractérisée par une hypoplasie ou une aplasie des membres supérieurs, des glandes mammaires et des glandes apocrines. Un patient atteint du syndrome cubito-mammaire a également montré un dysmorphisme facial et un retard mental dus à une délétion sur le gène *Tbx3* [91].

Cette étude montre que la perte d'expression de gènes impliqués dans le développement du tissu musculo-squelettique entraîne des malformations crânio-faciales, un faible tonus musculaire et qu'elle est étroitement liée au développement du système nerveux.

De ce fait, nos résultats sur la perte de fonction de ZMYND11 pourraient expliquer les malformations crânio-faciales et le faible tonus musculaire présents chez les patients avec une déficience intellectuelle. Cependant, il reste à établir davantage d'expériences afin de valider cette théorie.

Parmi les gènes neuronaux surexprimés on retrouve *Pax6*, un facteur de transcription exprimé dans les progéniteurs neuronaux, ce qui le rend important dans le développement et le fonctionnement du cerveau. Il module un grand nombre de gènes, dont des gènes associés aux troubles du spectre d'autistique (TSA). Dans une étude récente publiée par le Dr Maeva Devoucoux et le Dr Jacques Côté, il a été démontré que lorsque la forme tronquée de ZMYND11 était surexprimée dans les cellules embryonnaires de souris, le niveau d'expression de *Pax6* (marqueurs de la différenciation neurale) était nettement augmenté comparé au niveau basal [92], ce qui coïncide avec les résultats obtenus à partir des cellules NPC mutantes pour ZMYND11. Il est possible que la perte de fonction de ZMYND11 ne puisse plus réguler l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase II au niveau du gène *Pax6*, ce qui pourrait contribuer à son augmentation lors de la neurogenèse et entraîner une déficience intellectuelle.

Étonnamment, avec les résultats observés du transcriptome, les organoïdes cérébraux n'exprimant plus la protéine ZMYND11 ne montrent aucun impact majeur sur la formation de la structure 3D. En effet, les organoïdes cérébraux ZMYND11-KO sont capables de générer des structures internes et des cellules matures indiquant que l'inactivation de ZMYND11 n'entrave pas le développement des organoïdes cérébraux à deux mois de différenciation.

D'un point de vue moléculaire, la perte de fonction de ZMYND11 entraîne une surexpression des voies de la différenciation neuronale et des neurotransmetteurs. ZMYND11 étant impliquée dans la régulation de la transcription, il est possible que la protéine ne puisse plus réprimer l'activité de l'ARN polymérase II sur les gènes impliqués dans les voies synaptiques.

En effet, l'épilepsie et les troubles du comportement sont des symptômes observés chez les patients dont le gène *ZMYND11* est muté. La cause de ces anomalies n'est pas encore élucidée mais pourrait être associée à l'activité des neurones GABAergiques.

Les neurotransmetteurs GABA ayant une fonction inhibitrice dans l'activité électrique des cellules neuronales, un déséquilibre dans leur fonction pourrait affecter d'autres récepteurs et entraîner des différences électrophysiologiques [93]. De récentes études ont montré que des organoïdes cérébraux porteurs de mutations liées aux pathologies neurologiques étaient capables de générer des neurones matures. Cependant, des dysfonctionnements neuronaux liés à une expression altérée des neurotransmetteurs ont été identifiés [94].

Lorsque *ZMYND11* est inactivée, une diminution de la marque active H3K27ac et de la marque répressive H3K27me3 ont été identifiées au stade iPSC. A ce jour, une étude a montré une interaction entre le domaine MYND de *ZMYND11* et l'unité EZH2 du complexe PRC2. Cependant la fonction de cette interaction n'a pas été élucidée [95]. Les résultats obtenus dans le cadre de mon projet pourraient identifier un mécanisme impliquant *ZMYND11* dans les modifications post-traductionnelles.

La culture cellulaire 3D est un outil supplémentaire qui a permis d'observer l'impact sévère des mutations H3.3A29P et H3.3G34V sur la formation des organoïdes cérébraux et le dérèglement de la différenciation (Fig. 8). En effet, les mutations H3.3A29P et H3.3G34V altèrent la différenciation des cellules en astrocytes et la formation de structures internes. A ce jour, il n'a été rapporté qu'un patient avec la mutation hétérozygote germinale H3F3B A29P et un patient avec la mutation hétérozygote germinale H3F3B G34V. Ces deux patients souffrent d'un retard du développement, présentent une microcéphalie et sont sujets à des convulsions.

D'après la littérature, le variant d'histone H3.3 est nécessaire à la prolifération des cellules progénitrices car son inactivation entraîne une diminution de celle-ci et une augmentation précoce de la population des neurones [63]. Le profil d'incorporation de l'histone H3.3 sur la chromatine dans les cellules augmente considérablement au cours de la différenciation [50].

Enfin, l'inactivation de l'histone H3.3 entraîne un changement plus significatif dans l'expression des gènes des cellules astrocytaires que des neurones, indiquant son rôle important dans la régulation de la transcription astrocytaire [96].

L'histone H3.3 est recruté et incorporé sur la chromatine au cours de la différenciation cellulaire. Son accumulation va réguler la dynamique de la chromatine dans le but d'établir les identités neuronales distinctes. Ainsi, lorsque les histones H3.3G34V ou H3.3A29P sont recrutés au niveau des nucléosomes pendant la différenciation cellulaire, ces mutations germinales pourraient influencer l'état de méthylation de H3.3K36 ou le recrutement de ZMYND11 sur le génome.

En effet, il est possible que la mutation H3.3G34V ait un impact direct sur la capacité de ZMYND11 à se lier sur H3.3K36me₃, du fait de la proximité entre la Glycine 34 et la Lysine 36, ce qui réduirait le recrutement de ZMYND11 sur H3.3K36me₃. Cependant, il est également possible qu'il y ait un effet indirect, notamment par le fait que H3.3G34V empêche SETD2 de déposer la marque de triméthylation sur H3.3K36, ce qui entraînerait par conséquent cette réduction du niveau de ZMYND11 sur les régions codantes du génome. Dans les deux cas, la mutation G34V diminue à la fois le recrutement de ZMYND11 sur le génome et la déposition de la marque H3K36me₃.

Les cellules tumorales KNS42 qui portent la mutation H3.3G3V ont montré un enrichissement de H3K36me₃ et de l'ARN polymérase II sur les gènes impliqués dans le maintien des cellules souches tel que *Sox2* [46]. Fait intéressant, notre étude sur le mutant H3.3G34V a montré une augmentation de l'expression du marqueur de cellules souches neurales *Sox2* dans les organoïdes cérébraux après un mois de différenciation. Puis à deux mois de différenciation, il y a un déclin de cette population des cellules progénitrices, et une absence des astrocytes.

La substitution de l'alanine 29 en proline pourrait venir interférer avec le régulateur épigénétique ZMYND11 pour reconnaître H3.3 via la sérine 31, notamment par le fait de sa proximité avec la sérine 31, un résidu important pour la reconnaissance de ZMYND11, mais aussi par sa structure de type cage aromatique qui pourrait lui conférer un mécanisme de répulsion envers ZMYND11, ce qui expliquerait cette réduction de la liaison de ZMYND11 sur le génome.

Ces altérations épigénétiques pourraient perturber l'expression des gènes impliqués dans la différenciation des cellules souches neurales, ce qui en conséquence pourrait impacter les neurones post-mitotiques immatures dans leur processus de différenciation vers des cellules gliales. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent bien que l'histone H3.3 régule de manière symphonique la différenciation neuronale au début du développement cortical.

Étant donné que les mutations sur l'histone H3.3 ont lieu sur des acides aminés proches de résidus importants tels que la lysine 36 et la lysine 27, il est essentiel de rappeler que ces résidus sont sujets à des modifications post-traductionnelles. Par conséquent, une mutation ponctuelle sur des acides aminés proches de la lysine 36 et la lysine 27 de l'histone H3.3 peut altérer l'activité de plusieurs régulateurs épigénétiques et impacter sur la transcription des gènes.

C'est le cas pour la mutation G34V qui perturbe à la fois l'activité de la méthyltransférase SETD2 et le régulateur transcriptionnel ZMYND11. La mutation H3.3A29P diminue le recrutement de ZMYND11 sur le génome, et semble impacter légèrement sur la marque épigénétique H3K27me3. Étant un résidu proche de la lysine 27 et la sérine 31 de l'histone H3.3, il est possible que la substitution de l'alanine en proline puisse bloquer la liaison de ZMYND11 sur la sérine 31 de l'histone H3.3, mais également interférer avec les complexes Polycomb PRC1 et PRC2 pour trimétyler la lysine 27.

Contrairement au mutant ZMYND11-KO, qui a montré des changements plus importants au stade NPC, les mutations sur l'histone H3.3 semblent affecter l'expression des gènes au stade cellulaire iPS. La perturbation de l'activité de plusieurs régulateurs épigénétiques pourrait expliquer les changements transcriptomiques précoces que l'on observe dans les mutants H3.3G34V et H3.3A29P sur certains gènes neuronaux.

Ainsi, les mutations H3.3A29P et H3.3G34V et l'inactivation de ZMYND11 sont devenues importantes dans la recherche à cause de leur implication dans les tumeurs cérébrales pédiatriques, mais aussi dans les déficits intellectuels.

Limitations de l'étude : Le système de culture en 3D reste un défi sur plusieurs critères, notamment la culture sur le long terme. Le cerveau embryonnaire humain étant une structure complexe avec une diversité cellulaire importante, celui-ci requiert un système de vascularisation pour l'apport en

oxygène et en nutriments. Au fur et à mesure que les mini cerveaux grossissent, les cellules se trouvant au centre de l'organoïde partent en apoptose en raison du manque d'approvisionnement en oxygène et en nutriments [97].

L'autre défi porte sur l'étude des mécanismes d'interactions entre le système nerveux et d'autres systèmes, tel que le système neuro-musculaire par exemple. En effet, les patients ayant la mutation sur le gène *ZMYND11* présentent à la fois une déficience intellectuelle et un faible tonus musculaire. Le modèle de culture en 3D ne permet pas encore d'élucider un éventuel mécanisme commun qui pourrait expliquer le phénotype observé chez les patients avec un trouble neurologique.

La différenciation neuronale des cellules iPS, à la fois dans les modèles 2D et les systèmes 3D *in vitro*, permet d'étudier les mécanismes responsables des maladies neurologiques. Cependant, une préoccupation dans l'utilisation des cellules iPS concerne l'origine des cellules utilisées lors de la reprogrammation. La question se pose de savoir si leur origine cellulaire pourrait influencer la capacité de différenciation [98].

Les cellules iPS NCRM1 utilisées sont originaires de sang de cordon ombilical. Lorsque le protocole d'organoïdes de cerveaux a été optimisé et mis en place, malgré la capacité de ces cellules à former des structures internes lors de la différenciation en 3D, elles n'ont pas la capacité de produire des cellules progénitrices intermédiaires comme cela est le cas dans les cellules souches embryonnaires humaines H1 (H1-ESC).

Il a été démontré dans une étude que les cellules de sang périphérique (PBMC) et les kératinocytes reprogrammés en cellules iPS ne montrent pas de différences majeures dans la formation des organoïdes 3D. Tandis que lorsque les cellules iPS sont différenciées en neurones dopaminergiques, elles affichent des différences dans leurs profils d'expression génique [99].

De plus, de nombreuses études ont montré que les lignées hiPSC conservent un certain nombre de signatures épigénétiques ou métaboliques caractéristiques de leur tissu d'origine, ce qui pourrait influencer sur leur potentiel de différenciation [100]

Autre approche : Dans le but d'investiguer davantage la fonction des gènes *ZMYND11* et *H3F3B* dans le développement du cerveau. Le modèle de souris portant la même mutation germinale que celle retrouvée chez les patients atteints de trouble du développement constituerait un modèle efficace pour étudier les conséquences de ces mutations sur le développement du cerveau, mais aussi les effets sur la réorganisation de la chromatine au cours de la neurogenèse.

A ce jour, un modèle de souris ayant une délétion intragénique sur le gène *ZMYND11* a été décrit sur la plateforme Mouse Genome Informatics (MGI), récapitulant certains phénotypes retrouvés chez l'Homme. Le modèle murin muté pour *ZMYND11* présente des malformations crânio-faciales, une morphologie musculaire anormale avec un myocarde fin, ainsi qu'un système nerveux défectueux.

Une étude a montré que les souris *H3f3b+/- KO* présentent de graves troubles du développement avec un déficit au niveau de leur croissance et que l'ablation du gène *H3f3b* est létale, ce qui indique l'importance de l'histone H3.3 non seulement dans la régulation de l'intégrité du génome, mais aussi dans le développement embryonnaire.

Une expérience, telle que mesurer l'activité électrique des neurones, permettrait de comprendre les troubles du comportement comme le déficit de l'attention et l'hyperactivité. Il serait intéressant de voir comment les voies synaptiques sont perturbées dans les modèles mutants. Dans le contexte où la mutation entraîne une microcéphalie, comme c'est le cas chez les patients ayant la mutation *H3.3A29P* ou *H3.3G34V*, l'étude de la migration des cellules progénitrices par live Imaging permettrait de voir si la migration ou la prolifération cellulaire vers la plaque corticale sont perturbées et contribuent à une malformation cérébrale [101].

A partir de cellules fibroblastiques de patients atteints de troubles du développement, les cellules pourraient être reprogrammées pour obtenir des cellules iPS afin d'étudier si les mécanismes de la différenciation neuronale sont perturbés à l'échelle cellulaire et moléculaire.

À ce jour, le mécanisme d'action de *ZMYND11* sur l'ARN polymérase II est inconnu et peu d'études ont décrit l'implication de *ZMYND11* dans la rétention d'intron. Davantage d'expériences doivent être réalisées pour comprendre l'implication de *ZMYND11* dans la régulation de l'activité de l'ARN Pol II et dans l'épissage de l'ARN.

Chapitre 5 – Conclusion

En conclusion, à partir des cellules d'iPS-NCRM1, des lignées mutantes pour les gènes *H3F3B* et *ZMYND11* ont été générées. L'approche transcriptomique et épigénomique a permis de démontrer que lorsque *H3F3B* est muté sur des résidus clés, tels que la Glycine34 et l'Alanine 29 sur l'histone H3.3, la liaison de *ZMYND11* sur H3.3K36me3 est perturbée au même niveau que le mutant *ZMYND11-KO* hétérozygote.

Grâce aux modèles d'organoïdes cérébraux, il a été mis en évidence que les mutations H3.3G34V et H3.3A29P entraînent une diminution de la population de cellules progénitrices, une absence de structures de lumen et une absence totale d'astrocyte (Fig. 15). Les résultats de RNA-seq sur les mutants H3.3G34V et H3.3A29P ont montré dès le stade iPS des dérégulations transcriptomiques particulièrement sur certains gènes impliqués dans la voie neuronale. Ceci expliquerait l'impact plus sévère des mutants H3.3G34V et H3.3A29P sur les organoïdes corticaux comparé au contrôle WT et le mutant *ZMYND11-KO* homozygote.

En effet, malgré la perte de la protéine *ZMYND11*, les cellules mutantes ont été capables de former une structure interne similaire au contrôle WT et de produire des cellules neuronales et astrocytaires. A l'aide du séquençage d'ARN sur les mutants *ZMYND11-KO* hétérozygote et homozygote, des changements plus importants au niveau de l'expression génique de certaines voies de signalisations ont été observés qu'à partir du stade NPC, notamment une élévation de l'expression des gènes impliqués dans la voie neuronale et une diminution des voies de signalisations impliquées dans la formation du système musculo-squelettique (Fig. 15). Par ailleurs, l'impact est bien plus important dans le mutant *ZMYND11-KO* homozygote comparé au mutant hétérozygote. Ces résultats sont compatibles avec les caractéristiques cliniques décrites chez les patients, à savoir des troubles du comportement et un retard global du développement.

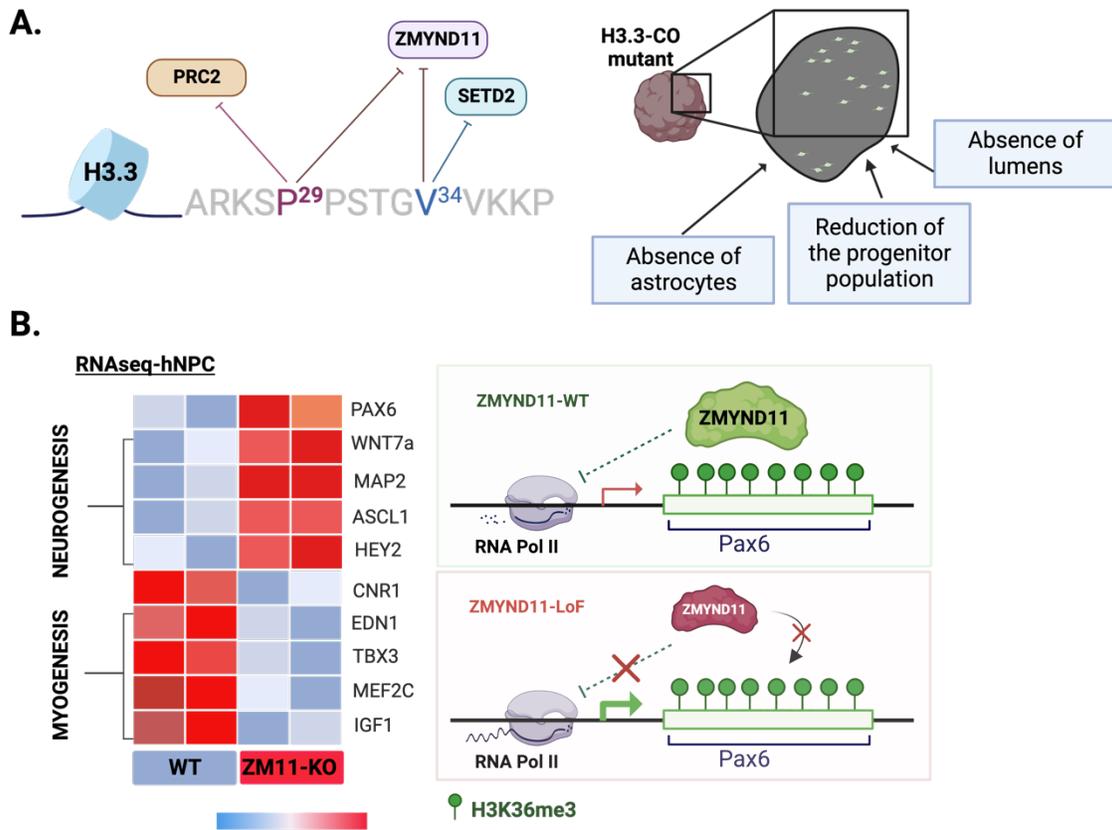


Figure 15. – Impacte de la perte de fonction de ZMYND11 et les mutations sur l’histone H3.3 au cours de la neurogenèse

Figure 15 : Schéma de conclusion : A. Impact des mutations H3.3G34V et H3.3A29P sur plusieurs régulateurs épigénétiques PRC2, ZMYND11 et SETD2. Les modèles d’organoïdes mutants H3.3G34V et H3.3A29P, ayant un impact sévère, ces mutations entraînent une absence de structures internes, une diminution des cellules progénitrices, et une absence totale d’astrocyte. B. D’après les résultats de RNA-seq, lorsque la protéine ZMYND11 n’est plus produite, on observe une augmentation de l’expression des gènes impliqués dans la voie neuronale et une diminution de gènes impliqués dans la formation du système musculo-squelettique. Dans le contexte WT, ZMYND11 est probablement impliqué dans la répression de l’activité transcriptionnelle de l’ARN polymérase II sur certains gènes impliqués dans la différenciation neuronale, ce qui expliquerait que lorsque ZMYND11 est absent, l’activité de l’ARN polymérase II pourrait être augmentée sur les gènes neuronaux et entraîner ainsi une dérégulation sur d’autres voies de signalisations, dont la voie de formation du système musculo-squelettique.

Chapitre 6 – Perspectives

En termes de perspectives, étant donné que des changements épigénomiques ont été observés sur les marques d'histones au stade de cellule iPS notamment, une réduction de la marque H3K27me3 dans le mutant H3.3A29P, et les marques d'histones H3K27me3 et H3K27ac qui sont diminués dans les mutants ZMYND11-KO. Davantage d'analyses sur les régions et les gènes affectés seront réalisées afin de mieux comprendre si une corrélation entre ces changements épigénétiques et les résultats transcriptomiques observés existe. Il est probable que ces altérations expliquent les phénotypes obtenus sur les modèles de cultures 3D.

Avec les résultats de RNA-seq qui ont été obtenus sur les cellules neurales dans les mutants ZMYND11-KO, un CHIP-seq sur les cellules au stade NPC sera réalisé pour les marques d'histones H3K27ac, H3K27me3 et H3K36me3, pour voir si des changements plus importants pourraient se produire. En effet, des changements plus importants sur les modifications post-traductionnelles dans les mutants comparés au contrôle WT sont attendus.

Les cellules NPC, dont l'épigénome est affecté, seront différenciées en neurones matures pour observer si les altérations transcriptomiques observées au stade progéniteurs sont maintenues ou amplifiées au cours de la différenciation. Des études plus approfondies sur leur morphologie et leur prolifération cellulaire seront à déterminer.

D'autre part, grâce à une approche de séquençage d'ARN des neurones et des organoïdes cérébraux dérivés des modèles isogéniques, nous envisageons de générer une carte de profil d'expression des gènes impliqués dans le développement du cortex, mais aussi d'identifier si des changements au niveau du profil d'expression des gènes spécifiques aux organoïdes mutants comparés au organoïdes WT se mettent en place.

Afin de mieux comprendre et définir les fonctions de ZMYND11 dans la régulation de l'épissage alternatif et la régulation transcriptionnelle, étant donné que ce sont deux processus couplés, la quantification par CHIP-seq de l'occupation de l'ARN polymérase II sur le génome dans le contrôle WT et les mutants isogéniques au stade NPC permettra de voir si la perte de la protéine ZMYND11 contribue à une occupation prolongée de l'ARN Pol II sur le génome.

De plus, pour voir si ZMYND11 est impliquée dans l'épissage alternatif, et plus particulièrement dans la rétention d'introns, l'approche par séquençage long read est une méthode intéressante qui permettra de détecter des anomalies dans l'épissage alternatif lorsque ZMYND11 est déficient. Enfin, la méthode de qRT-PCR permettra à partir des extractions d'ARN, de quantifier le niveau de transcrits générés lorsque ZMYND11 est absent.

ZMYND11 est un régulateur épigénétique qui reconnaît certaines régions codantes associées à H3.3K36me3, et qui se lie spécifiquement à l'histone H3.3 via sa sérine 31 (H3.3S31).

Il s'avère que la liaison de ZMYND11 à H3.3K36me3 est inhibée lorsque la sérine 31 est phosphorylée. La phosphorylation de H3.3S31 favorise le recrutement de SETD2 et éjecte simultanément ZMYND11, pour renforcer une transcription active des gènes induits après stimulation. Une expérience a montré que lorsque les neurones sont stimulés avec le facteur neurotrophique BDNF, la phosphorylation sur H3.3S31 augmente [43].

La phosphorylation de la sérine 31 stimule également le recrutement de l'acétyltransférase p300 responsable de l'acétylation sur la lysine 27 (H3K27ac) lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires [26].

Lors de la neurogenèse, il est envisageable que H3.3S31 phosphorylé participe à l'augmentation des marques actives H3K36me3, via l'expulsion de ZMYND11, et H3K27ac sur les gènes neuronaux.

En collaboration avec le Dr Geneviève Almouzni de l'Institut Marie Curie, nous prévoyons d'étudier d'une part l'impact de la mutation H3.3A29P sur la phosphorylation de la sérine 31 et en conséquence l'acétylation sur H3K27 au cours du développement. D'autre part, Il serait intéressant d'évaluer si le niveau de H3.3S31ph augmente pendant la différenciation cellulaire à la suite de l'inactivation de ZMYND11, et contribue à des changements transcriptomiques.

Les mutations sur les gènes *ZMYND11* et *H3F3B* (G34V et A29P) sont des mutations hétérozygotes, localisées dans la région hémisphérique du cerveau. Ce qui rend ces mutations intéressantes c'est qu'elles sont retrouvées à la fois dans les tumeurs cérébrales pédiatriques (pHGG) et dans les pathologies neurologiques.

En collaboration avec le Dr Nada Jabado, qui a identifié pour la première fois les mutations sur l'histone H3.3 et *ZMYND11* dans le contexte cancéreux, nous souhaitons comparer nos observations sur les pathologies neurologiques avec les études menées sur les lignées tumorales pédiatriques. En effet, ces tumeurs pédiatriques sont localisées dans la région hémisphérique et sont associées à une perte de fonction de TP53 et ATRX, contribuant à la tumorigenèse. Dans le cas des déficiences intellectuelles, les mutations hétérozygotes sur l'histone H3.3 et *ZMYND11* sont des mutations germinales *de novo* qui ne contribuent pas à la formation de tumeurs cérébrales. Il serait donc intéressant de comprendre dans ces deux contextes, si les mutations H3F3B-G34V, H3F3B-A29P et *ZMYND11* partagent des mécanismes moléculaires communs ou distincts.

Tableau 3. – Liste des Anticorps primaires et secondaires

Anticorps primaires				
Anticorps	Espèce	Compagnie	Catalogue#	Dilution
GFAP	Rabbit	Cell Signaling	12389	1:300
Tuj1	Rabbit	Cell Signaling	5568	1:500
NeuN	Mouse	Cell Signaling	24307	1:500
MAP2	Rabbit	Cell Signaling	4542	1:500
Nestin	Mouse	R&D systems	MAB1259	1:1000
Pax6	Rabbit	Biologend	901302	1:500
Sox2	Mouse	R&D systems	MAB2018	1:500
Sox1	Goat	R&D systems	AF3369	1:200
Anticorps secondaires				
Espèce cible	Hôte	Compagnie	Catalogue#	Dilution
Mouse 488	Donkey	Life technology	A-21202	1 :2000
Mouse 594	Donkey	Life technology	A-21203	1 :2000
Rabbit 488	Donkey	Life technology	A-21206	1 :2000
Rabbit 594	Donkey	Life technology	A-21207	1 :2000

Annexes

Differentiation media from hiPS cells to neurons

Low bFGF hESC media (EB media): 100 mL with DMEM/F12 (Gibco-Life Tech, Cat #10656-018).

Complete to 100ml DMEM/F12 L-Glut, High Glucose

- 20 mL KOSR,
- 1 mL Pen-Strep
- 1 mL Glutamax
- 1 mL MEM/NEAA
- 3mL ESC FBS qualified
- 2,4 uL bFGF
- 0.7 uL 2-mercaptoethanol (Dilute 1/10 before use)
- Add ROCKi

Neural induction media (NIM): 100 mL with DMEM/F12 (Gibco-Life Tech, Cat #10656-018).

Complete to 100ml DMEM/F12 L-Glut, High Glucose

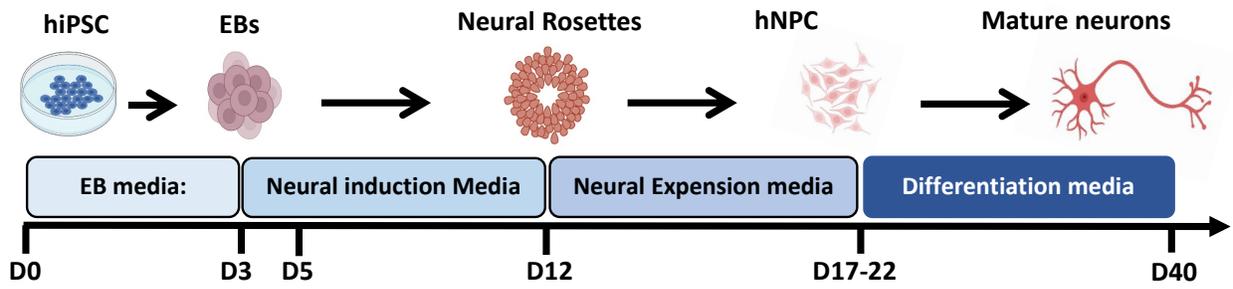
- 1 mL N2 supplement
- 1 mL Glutamax
- 1 mL MEM NEAA
- 1 mL Pen-Strep
- 100 uL Laminin
- 3 μ M CHIR 99021 (GSK3 β inhibitor)
- 5 μ M Cyclopamine (SHH pathway Inhibitor)
- 5 μ M SB-431542 (TGF-beta Receptor Inhibitor)

Neural expansion media (NEM): 100 mL with DMEM/F12 (Gibco-Life Tech, Cat #10656-018).

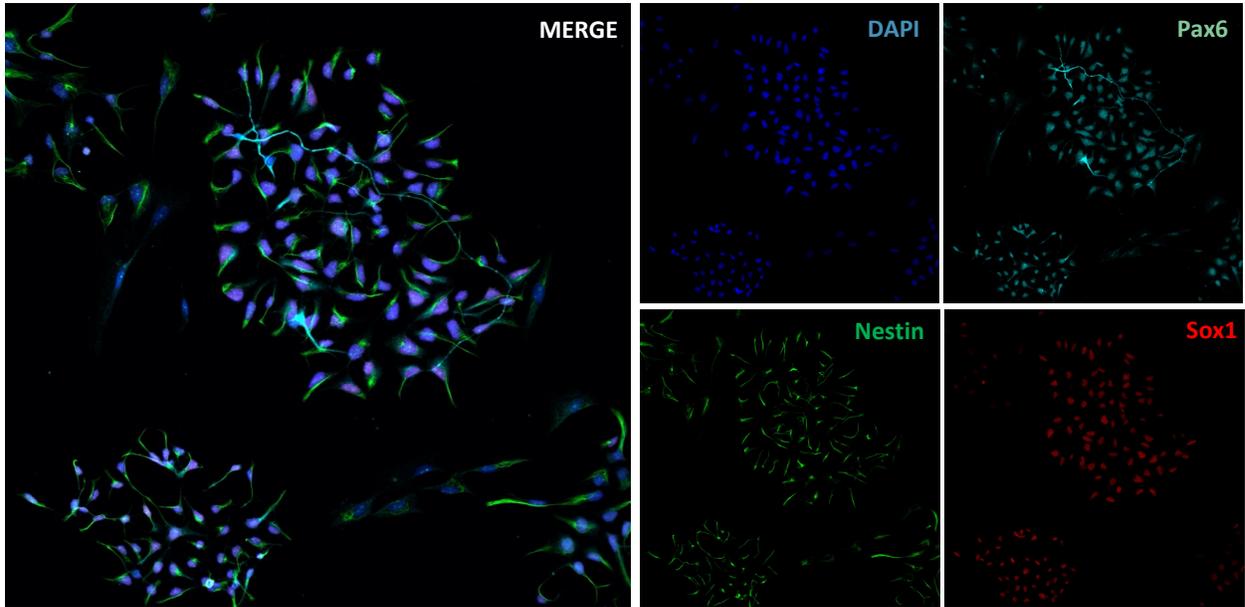
Complete to 100ml DMEM/F12 L-Glut, High Glucose

- 1 mL N2 supplement
- 2 mL B27 - vit A
- 1 mL Glutamax
- 1 mL MEM NEAA
- 1 mL Pen-Strep
- 2 μ g/mL heparin
- 20 ng/mL bFGF

Neuronal differentiation media: Forebrain Neuron Differentiation Kit (StemCell, Cat # 08600) and Forebrain Neuron maturation Kit (StemCell, Cat #08605).



B.



C.

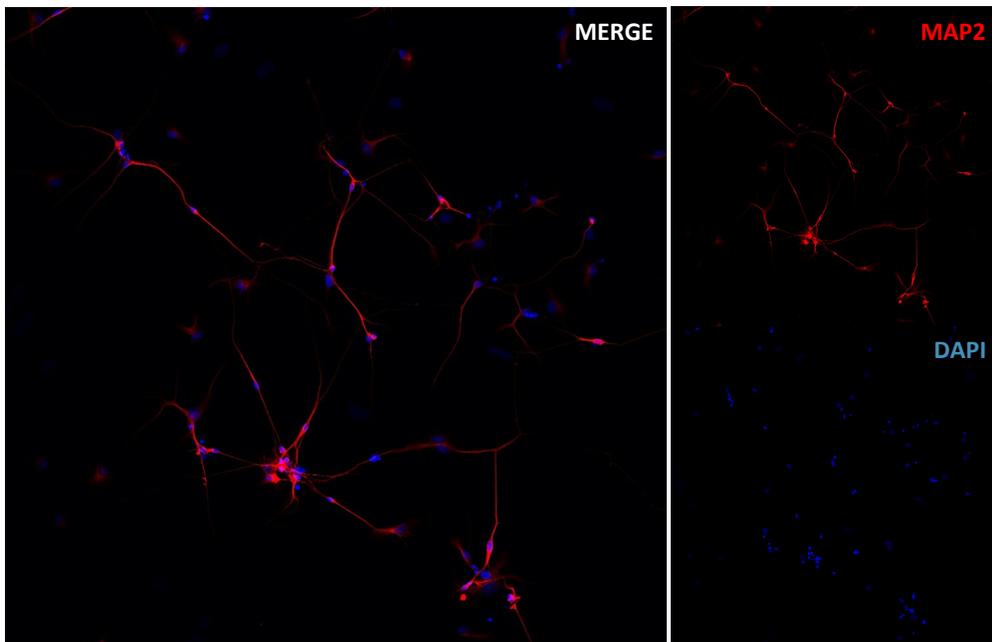


Figure 16. – Protocole de différenciation des cellules iPS vers la lignée neuronale

Figure 16 **Protocole de différenciation des cellules iPS vers la lignée neuronale** : A. Schéma du protocole de différenciation neuronale, il y'a quatre étapes majeures : l'induction neurale qui dure 5 à 7 jours avec la formation de sphéroïdes. La formation des rosettes neurales (jours 8 à 12). La dissociation des rosettes neurales pour générer les cellules NPC. Enfin la différenciation des cellules progénitrices en cellules neuronales. B. Validation des cellules progénitrices NPC par Immunofluorescence avec un triple marquage pour Nestin (vert), Sox1 (rouge) et Pax6 (cyan) qui sont spécifiques aux cellules progénitrices neurales. C. Validation des cellules neuronales où le marquage montrent par immunofluorescence les neurones (MAP2) obtenues à partir des cellules NPC-NCRM1_WT qui ont été différenciés en neurones. Les images ont été prises au microscope confocal au grossissement 20X, Cette expérience a été réalisée dans le but de valider le protocole de différenciation en 2D.

Differentiation media from hiPS cells to cerebral organoids

Low bFGF hESC media (EB media):

- DMEM/F12 (Cat #10656-018)
- 20% KnockOut Serum Replacement
- 1X Non-essential Amino Acids
- 1X Penicillin/Streptomycin
- 1X 2-Mercaptoethanol
- 1X Glutamax
- 2 uM Dorsomorphine (added on day 2 or 3 depending on how the EBs look like)
- 2 uM A83-01 (added on day 2 or 3 depending on how the EBs look like)

Induction medium :

- DMEM:F12 (Cat #10656-018)
- 1X N2 Supplement
- 1X Penicillin/Streptomycin,
- 1X Non-essential Amino Acids
- 1X GlutaMax
- 1uM CHIR99021
- 1 uM SB-431542
- 5uM Cyclopamine A (dorsalization).

Differentiation medium :

- DMEM:F12
- 1X N2 Supplement
- B27 Supplements
- 1X Penicillin/Streptomycin
- 1X 2-Mercaptoethanol
- 1X Non-essential Amino Acids
- 2.5 ug/ml human Insulin.

Maturation medium :

- Neurobasal medium
- 1X B27 Supplement
- 1X Penicillin/Streptomycin
- 1X 2-Mercaptoethanol
- 0.2 mM Ascorbic Acid
- 20 ng/ml BDNF
- 20 ng/ml GDNF
- 1 uM Dibutyryl-cAMP.

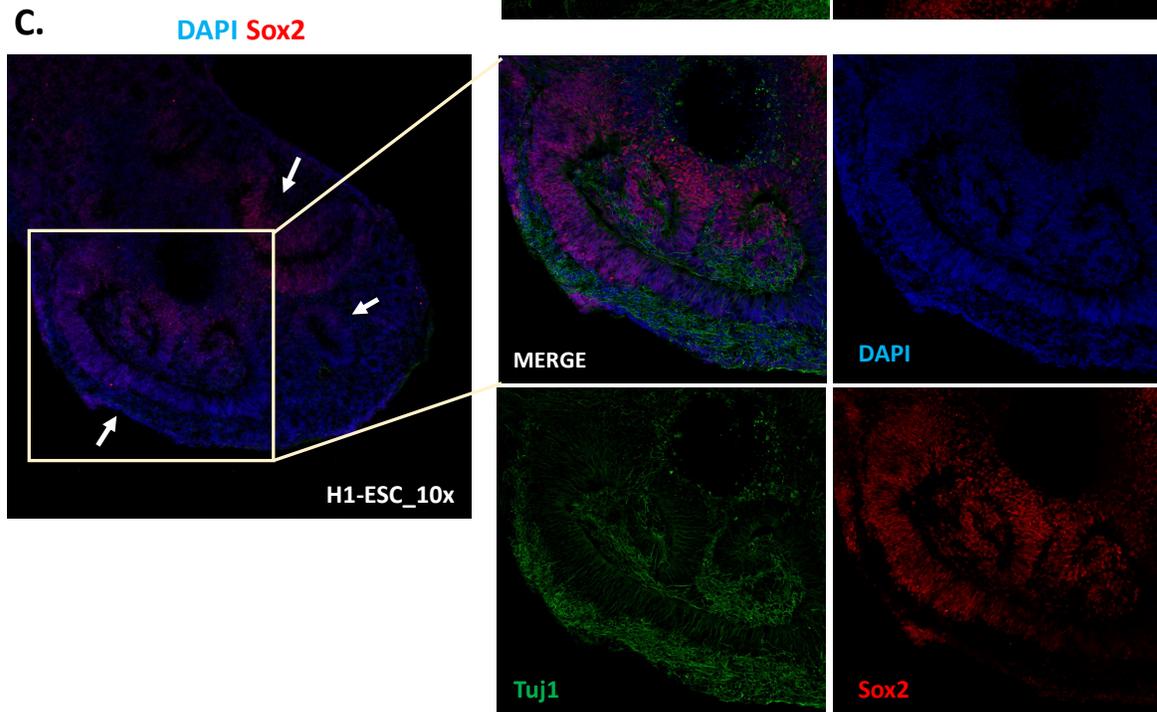
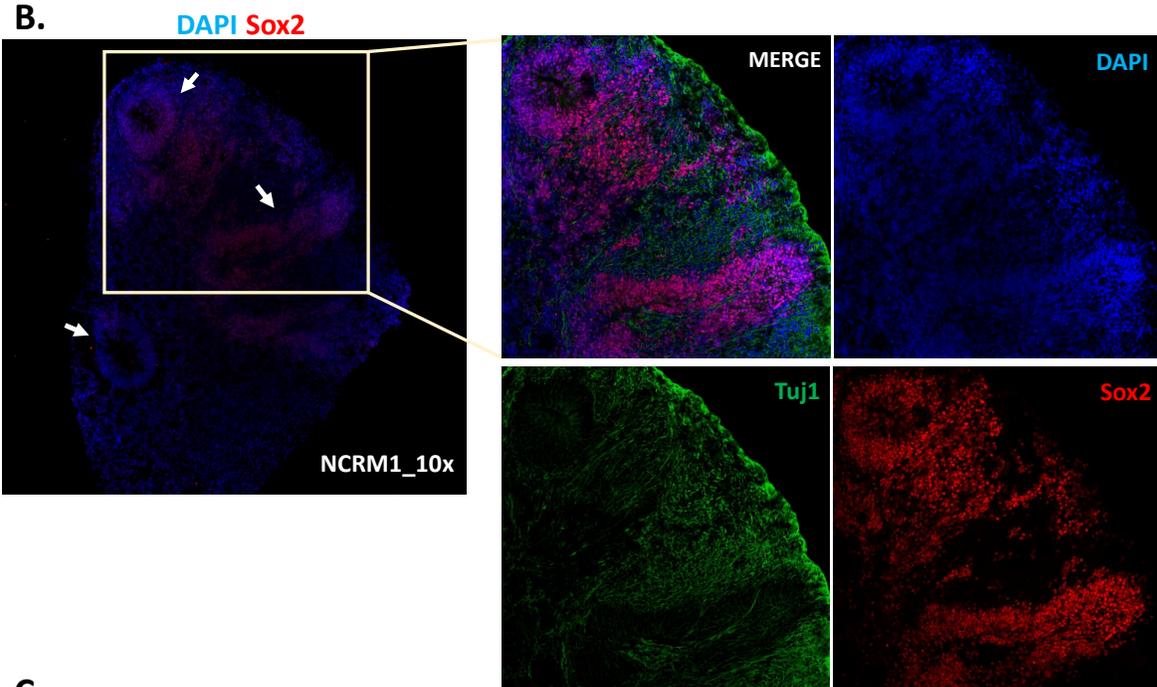
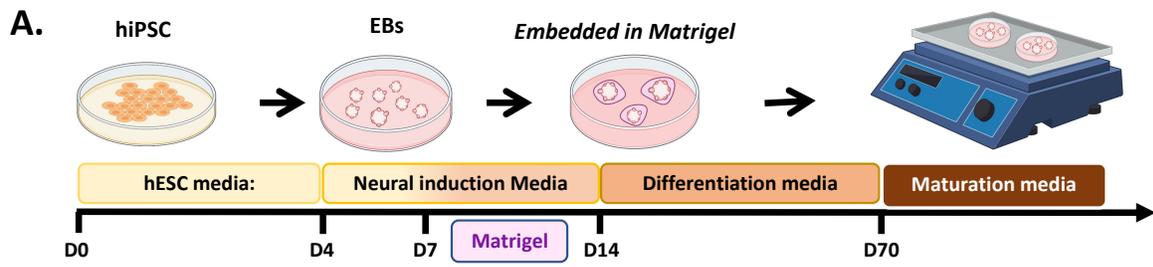


Figure 17. – Caractérisation des organoïdes cérébraux

Figure 17 : **Caractérisation des organoïdes cérébraux** : A. Illustration du protocole de différenciation des cellules iPS en organoïdes cérébraux. Il existe trois étapes majeures : l'induction neurale qui dure 4 à 7 jours avec la formation d'embryoïdes corticaux. L'encapsulation des embryoïdes corticaux dans le matrigel pour favoriser la croissance des organoïdes (jours 7 à 14), et le transfert des mini organoïdes sur l'orbital shaker. B. Image d'un organoïde cérébral NCRM1- WT analysé à 30 jours. Le marqueur Sox2 (cellules progénitrices neurales) est localisé au niveau de la zone ventriculaire (flèches blanches) et le marquage pour TUJ1 (neurones) est localisé en périphérie autour des cellules progénitrices. C. Image d'un organoïde cérébral hESC- WT analysé à 30 jours. Le marqueur Sox2 (cellules progénitrices neurales) est localisé au niveau de la zone ventriculaire (flèches blanches) et le marquage pour TUJ1 (neurones) est localisé en périphérie autour des cellules progénitrices. Deux lignées contrôles ont été utilisées dans le but de valider le protocole de différenciation en structure 3D.

Références bibliographiques

1. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 381-95.
2. Frye, M., et al., *RNA modifications modulate gene expression during development*. Science, 2018. **361**(6409): p. 1346-1349.
3. Ryan, R.J. and B.E. Bernstein, *Molecular biology. Genetic events that shape the cancer epigenome*. Science, 2012. **336**(6088): p. 1513-4.
4. Reichard, J. and G. Zimmer-Bensch, *The Epigenome in Neurodevelopmental Disorders*. Front Neurosci, 2021. **15**: p. 776809.
5. Trovato, M., et al., *Histone Variant H3.3 Mutations in Defining the Chromatin Function in Mammals*. Cells, 2020. **9**(12).
6. Tremethick, D.J., *Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber*. Cell, 2007. **128**(4): p. 651-4.
7. Zhou, V.W., A. Goren, and B.E. Bernstein, *Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(1): p. 7-18.
8. Xu, J. and Y. Liu, *Probing Chromatin Compaction and Its Epigenetic States in situ With Single-Molecule Localization-Based Super-Resolution Microscopy*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 653077.
9. Hyun, K., et al., *Writing, erasing and reading histone lysine methylations*. Exp Mol Med, 2017. **49**(4): p. e324.
10. Millan-Zambrano, G., et al., *Histone post-translational modifications - cause and consequence of genome function*. Nat Rev Genet, 2022. **23**(9): p. 563-580.
11. Fang, H.T., et al., *Global H3.3 dynamic deposition defines its bimodal role in cell fate transition*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1537.
12. Bates, S.E., *Epigenetic Therapies for Cancer*. N Engl J Med, 2020. **383**(7): p. 650-663.

13. Szenker, E., D. Ray-Gallet, and G. Almouzni, *The double face of the histone variant H3.3*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 421-34.
14. Filipescu, D., E. Szenker, and G. Almouzni, *Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones*. Trends Genet, 2013. **29**(11): p. 630-40.
15. Jambhekar, A., A. Dhall, and Y. Shi, *Author Correction: Roles and regulation of histone methylation in animal development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(1): p. 59.
16. Greenberg, M.V.C. and D. Bourc'his, *The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(10): p. 590-607.
17. Tan, J.Z., et al., *EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery*. Acta Pharmacol Sin, 2014. **35**(2): p. 161-74.
18. Comet, I., et al., *Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(12): p. 803-810.
19. Piunti, A. and A. Shilatifard, *Author Correction: The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022. **23**(6): p. 444.
20. Schmitges, F.W., et al., *Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks*. Mol Cell, 2011. **42**(3): p. 330-41.
21. Alabert, C., et al., *Domain Model Explains Propagation Dynamics and Stability of Histone H3K27 and H3K36 Methylation Landscapes*. Cell Rep, 2020. **30**(4): p. 1223-1234 e8.
22. Lam, U.T.F., et al., *Structural and functional specificity of H3K36 methylation*. Epigenetics Chromatin, 2022. **15**(1): p. 17.
23. Weinberg, D.N., et al., *The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape*. Nature, 2019. **573**(7773): p. 281-286.
24. Fang, Y., et al., *The H3K36me2 methyltransferase NSD1 modulates H3K27ac at active enhancers to safeguard gene expression*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(11): p. 6281-6295.
25. Martire, S., et al., *Differential contribution of p300 and CBP to regulatory element acetylation in mESCs*. BMC Mol Cell Biol, 2020. **21**(1): p. 55.

26. Martire, S., et al., *Phosphorylation of histone H3.3 at serine 31 promotes p300 activity and enhancer acetylation*. Nat Genet, 2019. **51**(6): p. 941-946.
27. Streubel, G., et al., *The H3K36me2 Methyltransferase Nsd1 Demarcates PRC2-Mediated H3K27me2 and H3K27me3 Domains in Embryonic Stem Cells*. Mol Cell, 2018. **70**(2): p. 371-379 e5.
28. Pasini, D., et al., *Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(15): p. 4958-69.
29. Lavarone, E., C.M. Barbieri, and D. Pasini, *Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1679.
30. Wagner, E.J. and P.B. Carpenter, *Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 115-26.
31. Krogan, N.J., et al., *Methylation of histone H3 by Set2 in Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(12): p. 4207-18.
32. Kizer, K.O., et al., *A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3305-16.
33. Bhattacharya, S., et al., *The methyltransferase SETD2 couples transcription and splicing by engaging mRNA processing factors through its SHI domain*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1443.
34. Yoh, S.M., J.S. Lucas, and K.A. Jones, *The Iws1:Spt6:CTD complex controls cotranscriptional mRNA biosynthesis and HYPB/Setd2-mediated histone H3K36 methylation*. Genes Dev, 2008. **22**(24): p. 3422-34.
35. Fong, N., et al., *RNA Pol II Dynamics Modulate Co-transcriptional Chromatin Modification, CTD Phosphorylation, and Transcriptional Direction*. Mol Cell, 2017. **66**(4): p. 546-557 e3.

36. Wen, H., et al., *ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression*. Nature, 2014. **508**(7495): p. 263-8.
37. Guo, R., et al., *BS69/ZMYND11 reads and connects histone H3.3 lysine 36 trimethylation-decorated chromatin to regulated pre-mRNA processing*. Mol Cell, 2014. **56**(2): p. 298-310.
38. Wong, J.J., et al., *Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation*. Cell, 2013. **154**(3): p. 583-95.
39. Middleton, R., et al., *IRFinder: assessing the impact of intron retention on mammalian gene expression*. Genome Biol, 2017. **18**(1): p. 51.
40. Zheng, J.T., et al., *Intron Retention as a Mode for RNA-Seq Data Analysis*. Front Genet, 2020. **11**: p. 586.
41. Braunschweig, U., et al., *Widespread intron retention in mammals functionally tunes transcriptomes*. Genome Res, 2014. **24**(11): p. 1774-86.
42. Maslon, M.M., et al., *A slow transcription rate causes embryonic lethality and perturbs kinetic coupling of neuronal genes*. EMBO J, 2019. **38**(9).
43. Armache, A., et al., *Histone H3.3 phosphorylation amplifies stimulation-induced transcription*. Nature, 2020. **583**(7818): p. 852-857.
44. Schuhmacher, M.K., et al., *Author Correction: Sequence specificity analysis of the SETD2 protein lysine methyltransferase and discovery of a SETD2 super-substrate*. Commun Biol, 2020. **3**(1): p. 600.
45. Fang, J., et al., *Cancer-driving H3G34V/R/D mutations block H3K36 methylation and H3K36me3-MutSalpha interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(38): p. 9598-9603.
46. Bjerke, L., et al., *Histone H3.3. mutations drive pediatric glioblastoma through upregulation of MYCN*. Cancer Discov, 2013. **3**(5): p. 512-9.
47. Chen, C.C.L., et al., *Histone H3.3G34-Mutant Interneuron Progenitors Co-opt PDGFRA for Gliomagenesis*. Cell, 2020. **183**(6): p. 1617-1633 e22.

48. Yu, G., et al., *The role of HIRA-dependent H3.3 deposition and its modifications in the somatic hypermutation of immunoglobulin variable regions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(50).
49. Shi, L., et al., *Histone H3.3 G34 Mutations Alter Histone H3K36 and H3K27 Methylation In Cis*. J Mol Biol, 2018. **430**(11): p. 1562-1565.
50. Funk, O.H., et al., *Postmitotic accumulation of histone variant H3.3 in new cortical neurons establishes neuronal chromatin, transcriptome, and identity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(32): p. e2116956119.
51. Schwartzenuber, J., et al., *Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma*. Nature, 2012. **482**(7384): p. 226-31.
52. Kumar, V.C. and R. Pai, *Genes of the month: H3.3 histone genes: H3F3A and H3F3B*. J Clin Pathol, 2021. **74**(12): p. 753-758.
53. Jain, S.U., et al., *Histone H3.3 G34 mutations promote aberrant PRC2 activity and drive tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(44): p. 27354-27364.
54. Salloum, R., et al., *Characterizing temporal genomic heterogeneity in pediatric high-grade gliomas*. Acta Neuropathol Commun, 2017. **5**(1): p. 78.
55. Molenaar, T.M. and F. van Leeuwen, *SETD2: from chromatin modifier to multipronged regulator of the genome and beyond*. Cell Mol Life Sci, 2022. **79**(6): p. 346.
56. Yates, T.M., et al., *ZMYND11-related syndromic intellectual disability: 16 patients delineating and expanding the phenotypic spectrum*. Hum Mutat, 2020. **41**(5): p. 1042-1050.
57. Maver, A., et al., *Clinical Next Generation Sequencing Reveals an H3F3A Gene as a New Potential Gene Candidate for Microcephaly Associated with Severe Developmental Delay, Intellectual Disability and Growth Retardation*. Balkan J Med Genet, 2019. **22**(2): p. 65-68.
58. Bryant, L., et al., *Histone H3.3 beyond cancer: Germline mutations in Histone 3 Family 3A and 3B cause a previously unidentified neurodegenerative disorder in 46 patients*. Sci Adv, 2020. **6**(49).

59. Parker, C.C., et al., *Genome-wide association study of behavioral, physiological and gene expression traits in outbred CFW mice*. *Nat Genet*, 2016. **48**(8): p. 919-26.
60. Park, B.Y., et al., *The Core Splicing Factors EFTUD2, SNRPB and TXNL4A Are Essential for Neural Crest and Craniofacial Development*. *J Dev Biol*, 2022. **10**(3).
61. Jang, C.W., et al., *Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development*. *Genes Dev*, 2015. **29**(13): p. 1377-92.
62. Tang, M.C., et al., *Contribution of the two genes encoding histone variant h3.3 to viability and fertility in mice*. *PLoS Genet*, 2015. **11**(2): p. e1004964.
63. Xia, W. and J. Jiao, *Histone variant H3.3 orchestrates neural stem cell differentiation in the developing brain*. *Cell Death Differ*, 2017. **24**(9): p. 1548-1563.
64. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.
65. Liu, G., et al., *Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications*. *Stem Cell Rev Rep*, 2020. **16**(1): p. 3-32.
66. McTague, A., et al., *Genome Editing in iPSC-Based Neural Systems: From Disease Models to Future Therapeutic Strategies*. *Front Genome Ed*, 2021. **3**: p. 630600.
67. Kang, S., et al., *Characteristic analyses of a neural differentiation model from iPSC-derived neuron according to morphology, physiology, and global gene expression pattern*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 12233.
68. Luo, C., et al., *Cerebral Organoids Recapitulate Epigenomic Signatures of the Human Fetal Brain*. *Cell Rep*, 2016. **17**(12): p. 3369-3384.
69. Eichmuller, O.L. and J.A. Knoblich, *Human cerebral organoids - a new tool for clinical neurology research*. *Nat Rev Neurol*, 2022. **18**(11): p. 661-680.
70. Yang, Q., et al., *What Makes Organoids Good Models of Human Neurogenesis?* *Front Neurosci*, 2022. **16**: p. 872794.

71. Xu, R., et al., *OLIG2 Drives Abnormal Neurodevelopmental Phenotypes in Human iPSC-Based Organoid and Chimeric Mouse Models of Down Syndrome*. *Cell Stem Cell*, 2019. **24**(6): p. 908-926 e8.
72. Qian, X., et al., *Using brain organoids to understand Zika virus-induced microcephaly*. *Development*, 2017. **144**(6): p. 952-957.
73. Shimada, H., et al., *A next-generation iPSC-derived forebrain organoid model of tauopathy with tau fibrils by AAV-mediated gene transfer*. *Cell Rep Methods*, 2022. **2**(9): p. 100289.
74. Sun, N., et al., *Applications of brain organoids in neurodevelopment and neurological diseases*. *J Biomed Sci*, 2021. **28**(1): p. 30.
75. Camp, J.G., et al., *Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(51): p. 15672-7.
76. Shi, L., H. Wen, and X. Shi, *The Histone Variant H3.3 in Transcriptional Regulation and Human Disease*. *J Mol Biol*, 2017. **429**(13): p. 1934-1945.
77. Shi, Y., P. Kirwan, and F.J. Livesey, *Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks*. *Nat Protoc*, 2012. **7**(10): p. 1836-46.
78. Zhang, M., et al., *Highly efficient methods to obtain homogeneous dorsal neural progenitor cells from human and mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells*. *Stem Cell Res Ther*, 2018. **9**(1): p. 67.
79. Lancaster, M.A., et al., *Cerebral organoids model human brain development and microcephaly*. *Nature*, 2013. **501**(7467): p. 373-9.
80. Nadarajah, B. and J.G. Parnavelas, *Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex*. *Nat Rev Neurosci*, 2002. **3**(6): p. 423-32.
81. Zhao, J., et al., *Author Correction: APOE4 exacerbates synapse loss and neurodegeneration in Alzheimer's disease patient iPSC-derived cerebral organoids*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 2707.

82. Sansom, S.N., et al., *The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis*. PLoS Genet, 2009. **5**(6): p. e1000511.
83. Buckingham, M. and F. Relaix, *The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 645-73.
84. Koblar, S.A., et al., *Pax-3 regulates neurogenesis in neural crest-derived precursor cells*. J Neurosci Res, 1999. **56**(5): p. 518-30.
85. Schmidt, K., et al., *Sox8 is a specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29769-75.
86. Schmidt, K., et al., *The high mobility group transcription factor Sox8 is a negative regulator of osteoblast differentiation*. J Cell Biol, 2005. **168**(6): p. 899-910.
87. Colasanto, M.P., et al., *Development of a subset of forelimb muscles and their attachment sites requires the ulnar-mammary syndrome gene Tbx3*. Dis Model Mech, 2016. **9**(11): p. 1257-1269.
88. Moskowitz, A.M., et al., *A de novo missense mutation in ZMYND11 is associated with global developmental delay, seizures, and hypotonia*. Cold Spring Harb Mol Case Stud, 2016. **2**(5): p. a000851.
89. Hoogman, M., et al., *Brain Imaging of the Cortex in ADHD: A Coordinated Analysis of Large-Scale Clinical and Population-Based Samples*. Am J Psychiatry, 2019. **176**(7): p. 531-542.
90. Washkowitz, A.J., et al., *Diverse functional networks of Tbx3 in development and disease*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2012. **4**(3): p. 273-83.
91. Klopocki, E., et al., *Ulnar-mammary syndrome with dysmorphic facies and mental retardation caused by a novel 1.28 Mb deletion encompassing the TBX3 gene*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(12): p. 1274-9.

92. Devoucoux, M., et al., *Oncogenic ZMYND11-MBTD1 fusion protein anchors the NuA4/TIP60 histone acetyltransferase complex to the coding region of active genes*. Cell Rep, 2022. **39**(11): p. 110947.
93. Tang, X., R. Jaenisch, and M. Sur, *The role of GABAergic signalling in neurodevelopmental disorders*. Nat Rev Neurosci, 2021. **22**(5): p. 290-307.
94. Foliaki, S.T., et al., *Neuronal excitatory-to-inhibitory balance is altered in cerebral organoid models of genetic neurological diseases*. Mol Brain, 2021. **14**(1): p. 156.
95. Velasco, G., S. Grkovic, and S. Ansieau, *New insights into BS69 functions*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16546-50.
96. Maze, I., et al., *Critical Role of Histone Turnover in Neuronal Transcription and Plasticity*. Neuron, 2015. **87**(1): p. 77-94.
97. Agboola, O.S., et al., *Brain organoid: a 3D technology for investigating cellular composition and interactions in human neurological development and disease models in vitro*. Stem Cell Res Ther, 2021. **12**(1): p. 430.
98. Eremeev, A.V., et al., *Cerebral Organoids-Challenges to Establish a Brain Prototype*. Cells, 2021. **10**(7).
99. Chlebanowska, P., et al., *Origin of the Induced Pluripotent Stem Cells Affects Their Differentiation into Dopaminergic Neurons*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(16).
100. Poetsch, M.S., A. Strano, and K. Guan, *Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine*. Stem Cells, 2022. **40**(6): p. 546-555.
101. Doobin, D.J., et al., *Severe NDE1-mediated microcephaly results from neural progenitor cell cycle arrests at multiple specific stages*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12551.