



**Thèse** présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I

Discipline : Sciences du vivant Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par Adrien EBERLIN

# Caractérisation d'une conformation de la queue N-terminale de l'histone H3 modifiée en mitose et Étude des modifications post-traductionnelles du facteur de transcription TAF10 : deux mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes

Soutenue publiquement le 9 Novembre 2007

## Membres du jury :

Directeur de thèse : **Dr László TORA**, IGBMC, Illkirch Rapporteur Interne : **Dr Régine LOSSON**, IGBMC, Illkirch Rapporteur Externe : **Dr Annick HAREL-BELLAN**, Institut A Lwoff, Villejuif Rapporteur Externe : **Dr Didier TROUCHE**, LBME, Toulouse Examinateur : **Pr Stéphane VIVILLE**, IGBMC, Illkirch

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr László Tora de m'avoir accueilli dans son équipe dès la sortie de ma maîtrise et de m'avoir permis d'y effectuer également ma thèse. Merci aussi pour sa disponibilité, ses conseils et son soutien lorsque les résultats se faisaient attendre.

Je remercie les membres du jury, le Dr Annick Harel-Bellan, le Dr Régine Losson, le Dr Didier Trouche et le Pr Stéphane Viville d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse :

Merci Eli pour ton aide notamment sur le sujet TAF10 mais surtout pour m'avoir guidé durant les premiers jours au laboratoire, pour ta bonne humeur quotidienne, pour nos discussions sur le cinéma (on ne peut pas toujours parler de science !), bref pour ton immense contribution au bon fonctionnement et à la bonne ambiance du labo.

Mille mercis Maria-Elena pour toute l'aide que tu m'as apporté en si peu de temps que tu es parmi nous. Merci aussi d'avoir osé te lancer dans une lecture critique de ce long manuscrit.

Merci beaucoup Manuela pour tout ce temps que tu as passé sur les expériences de spectrométrie de masse sur TAF10. Merci pour ta patience, pour ton aide, et pour ton soutien.

Merci à mon homonyme, Pascal Eberling, pour avoir toujours pris mes commandes de peptides avec le sourire. « Quand y en a plus, y en a encore ! ».

Merci Pascal (Kessler cette fois-ci) et Marc du service imagerie pour leur sympathie et leur aide sur les expériences de microscopie confocale et de Time lapse.

Merci Didier pour avoir eu le courage de lire ce manuscrit et pour les conseils que tu m'as donnés.

Merci Flavie pour l'aide que tu m'as apporté sur le sujet 51TA2H12.

Merci à nos collaborateurs qui ont participé au projet 51TA2H12 : Cédric, le Dr Annick DeJaegere, le Dr Roland Stote, le Dr Danièle Spehner, le Dr Patrick Schultz, le Dr Jean-Marie Würtz et le Dr Mustapha Oulad-Abdelghani.

Merci aussi à tous les autres membres passés et présents de l'équipe Tora :

Merci Laure d'avoir réussi à supporter mes taquineries quasi quotidiennes sans m'avoir obligé à faire un tour à la médecine du travail.

Thanks Emese for your kindness, your frankness and your patience when we talk in french. Stay yourself !

Merci Tonie pour la bonne humeur que tu as apportée au labo le temps de ton DEA. Merci aussi pour la petite info sur TFIIC !

Merci à Mattia pour avoir répondu à mes questions et pour son soutien lorsqu'il fallait embêter notre très chère collègue.

Thanks Bill, Máté, Zita, Meritxell. Merci Sara, Nathalie, Arnaud, Guillaume, Céline et Jacques.

Merci à toutes ces personnes de l'institut avec lesquelles j'ai pu partager quelques discussions scientifiques ou non, ou quelques repas au restaurant universitaire : Marielle, Johan, Konstantin, Florence, Philippe, Anas, Lucas, Rafaella, Emilie, Gabrielle, Pierre et tous ceux que j'ai pu oublier.

Merci aussi à Maïté et Hélène pour leurs encouragements (notamment pour les petits chocolats lors de l'écriture de la thèse à la bibliothèque) mais aussi pour leur gentillesse tout au long de l'année. Merci encore à Maïté pour son aide dans l'impression de ce manuscrit.

Merci à tous mes amis qui m'ont permis de m'aérer l'esprit quand je n'étais pas au laboratoire et qui ont parfois du subir quelques monologues scientifiques toutefois bien vite interrompus. Merci donc à Fab, Laety, Matteo, Phil, Marie, Seb, Laurence, Lolo, Gilbert, Khaly, Anne-So, Klara, Lionel, Youri, Martin, Eva, Mélanie, Gaëlle, Louis, Christelle, Seb et pardon à ceux que j'aurai oublié ici.

Merci à toute ma famille et plus particulièrement à toi papa et à toi maman qui m'avez toujours encouragé dans cette voie sans jamais m'y pousser. Sans vous, je ne serai pas là (biologiquement, ça tient la route puisque vous êtes mes parents !).

Mes derniers remerciements, et non des moindres, iront à ma fille et à ma femme, sans lesquelles tout cela n'aurait aucun sens. Merci Olivia pour tous ces moments de bonheur que tu nous offres depuis maintenant près d'un an, pour ces sourires du matin qui m'ont toujours mis du beaume au cœur pour aller travailler et pour ceux du soir qui m'ont souvent fait oublier la fatigue et les soucis d'une journée au laboratoire. Merci enfin à toi Monika d'avoir été à l'écoute toutes ces années, d'avoir été patiente lorsque les expériences ratées déteignaient sur mon humeur, de m'avoir toujours encouragé, et de m'avoir autant facilité les choses notamment durant ces trois derniers longs mois. Merci infiniment.

## **AVANT-PROPOS**

Ce manuscrit sera divisé en trois parties distinctes, la première introduisant les notions de biologie moléculaire et cellulaire auxquelles font référence les deux autres parties portant sur les deux projets majeurs qui ont constitué mon travail de thèse.

Le premier de ces projets reposait sur l'identification de modifications posttraductionnelles de la sous-unité TAF10 (pour *TBP Associated Factor*) et de leurs variations en fonction du cycle cellulaire et du complexe dans lequel se trouve la sous-unité, le facteur général de transcription TFIID ou le facteur TFTC (pour *TBP-Free TAF-Containing complex*). Ces travaux démontrent l'existence de nombreuses modifications touchant la sousunité TAF10 et leur variation selon, notamment, le cycle cellulaire. Par ailleurs, c'est au cours de ces recherches qu'un anticorps dirigé contre une forme diméthylée de TAF10 a été synthétisé et s'est finalement avéré reconnaître l'histone H3 en mitose.

La caractérisation de ce nouvel anticorps a conduit au deuxième projet qui fut consacré à la détermination d'une conformation particulière que la queue N-terminale de l'histone H3, à la fois diméthylée en lysine 9 et phosphorylée en sérine 10, adopte en mitose. C'est sur cette étude que s'est orientée la plus grande partie de mes recherches au cours de mon doctorat et c'est donc celle qui sera la plus détaillée dans ce manuscrit. Les résultats expérimentaux ainsi obtenus comprennent un manuscrit de publication récemment soumis pour publication et actuellement en révision.

Dans un souci de clarté, la section « matériel et méthodes » ainsi que la discussion et les perspectives de chacune de ces études figureront à la suite des résultats au sein de leur partie respective.

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
AVANT-PROPOS	3
SOMMAIRE	5
LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX	11
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	13
INTRODUCTION	19
I. LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES OU COMMENT L'INFORMATION GENETIQUE EST MODULEE POUR S'ADAPTER AUX BESOINS DE LA CELLULE	19
A. LE DOGME CENTRAL DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE	19
1. La réplication de l'ADN	20
2. La transcription de l'ADN en ARN	20
B I ES DIFFERENTS NIVEAUX DE REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES	22
1. La régulation transcriptionnelle	23
a) La régulation transcriptionnelle par les facteurs de transcription	24
b) L'épigénétique	25
2. La régulation post-transcriptionnelle	26
a) L'epissage alternatif	26
c) La régulation post-traductionnelle de la fonction des protéines	27
II. LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES PAR LES FACTEURS	
GENERAUX DE TRANSCRIPTION	30
A. LA MACHINERIE DE BASE DE LA TRANSCRIPTION	30
1. Des séquences régulatrices au cœur de l'ADN	30
a) Le promoteur minimal	30
(i) La boue IAIA (ii) L'initiateur (Inr)	31
<i>(iii) Les éléments de reconnaissance de TFIIB ou BRE</i>	32
(iv) L'élément DPE	32
(v) L'élément MTE	33
(vi) L'élément DCE	33
b) Les elements de regulation	54 31
(ii) Les séquences régulatrices proximilies	35
<ol> <li>Les principaux acteurs de l'initiation de la transcription et l'assemblage du</li> </ol>	
complexe de préinitiation (PIC)	37

a) L'ARN polymerase II (ARN Pol II)	
b) Les facteurs généraux de la transcription (GTF)	
( <i>i</i> ) <i>TFIID</i>	39
TBP (TATA Binding Protein) et ses homologues	40
Les TAFs (TBP Associated Factors)	41
Les différents complexes contenant des TAFs	
( <i>ii</i> ) <i>TFIIA</i>	
(iii) TFIIB	
(iv) TFIIE	
( <i>v</i> ) <i>TFIIF</i>	
(vi) TFIIH	
c) L'assemblage du PIC	
(i) Le modèle séquentiel	
(u) Le modèle de l'holoenzyme	
(iii) Le modele actuel.	
d) Le complexe Mediateur et les autres complexes co-activateurs	
(1) Les complexes de type Mediateur	
(1) Les co-activateurs ATP-aepenaants remodelant la chromatine	
5. L'initiation de la tarmingison de la transcription	
4. L'etonganon et la terminaison de la transcription et les modifications post $\mathbf{B}$ - L'es facteurs centre aux de transcription et les modifications post	
D. LES FACTEURS GENERAUX DE TRANSCRIPTION ET LES MODIFICATIONS POST- TRADUCTIONNELLES	57
1 Quelques exemples de facteurs généraux de transcription pourvues de modif	ication
nost-traductionnelles	58
a) TFIIA	58
b) TFIIB	
c) TFIIE	
d) TFIIF	
e) TFIIH	
2. Les modifications post-traductionnelles de TFIID et TFTC	62
a) Les modifications au niveau de TBP	
b) Les modifications au niveau des TAFs	63
c) Les modifications au niveau de GCN5	67
III I F DVNAMISME DE LA STRUCTURE CHROMATINIENNE · UN	
MECANISME EPIGENETIOUE DE L'EXPRESSION DES GENES	
A. LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE	
1. Le nucleosome	
2. La libre de 30 nm	
<ol> <li>Les inveaux superieurs de compactage de l'ADN</li> <li>Notions d'auchromatine et d'hétérochromatine</li> </ol>	
4. Notions a eachiomathe et a neterochiomathe	
D. LA METHYLATION DE L'ADIN	DES
C. LES MODIFICATIONS FOST-TRADUCTIONNELLES DES EXTREMITES IN-TERMINALES HISTONES	DES 76
1 Les différents types de modification avant lieu au niveau des histories	
a) L'acétylation	
b) La méthylation	
(i) Un rôle d'activation de la transcription	
Un rôle de répression de la transcription	
(iii) Les autres rôles de la méthylation des histones	

c) La phosphorylation	
(i) Un rôle d'activation de la transcription	
(ii) Les autres rôles de la phosphorylation des histones	
d) L'ubiquitination	
e) L'ADP-ribosylation	
f) Les autres modifications touchant les histones	
2. Les protéines et complexes capables de modifier les histones	
a) Les protéines et complexes à activité HAT ou HDAC	91
(i) Les histone-acétyltransférases (HAT)	
(ii) Les histone-déacétylases (HDAC)	
b) Les protéines et complexes à activité HMT ou HDM	
(i) Les histone-méthyltransférases (HMT)	
Les HMTs spécifiques des lysines (HKMT)	
Les HMTs spécifiques des arginines (PRMT)	
(ii) Les histone-déméthylases (HDM)	100
c) Les protéines et complexes à activité kinase ou phosphatase	101
(i) Les kinases	101
(ii) Les phosphatases	103
3. Les protéines capables de lier les modifications d'histones	104
a) Les domaines de liaison aux acétylations et quelques exemples de protéin	es en
étant pourvues	104
b) Les domaines de liaison aux methylations et quelques exemples de protein	nes en
etant pourvues	105
(1) Le chromoaomaine	105
(11) La repetition wD40	100
(III) Le domaine Tudor	100
(W) Le doint de zinc de type PHD	107
(V) Le dougi de Linc de type i IID	otéines
en étant nourvues	107
4 Le dialogue entre les modifications d'histones	108
a) Les influences entre modifications d'histories en CIS	108
b) Les influences entre modifications d'histories en TRANS	111
5 Le « code historie » et autres hypothèses sur le mécanisme de régulation de	
l'expression des gènes par les modifications d'histones	111
a) L'hypothèse « électrostatique »	
b) L'hypothèse du « code histone »	112
c) L'hypothèse du « langage de la chromatine »	112
6. Et la structure des queues d'histories dans tout ça ?	113
D. LES VARIANTS D'HISTONES	113
1. Les variants de l'histone H2A	114
2. Les variants de l'histone H2B	117
3. Les variants de l'histone H3	117
IV. LA CONDENSATION MITOTIQUE DE L'ADN	119
A. LES FACTEURS PROTEIQUES DE LA CONDENSATION	122
1. Les complexes à protéines SMC	123
a) Le complexe condensine	123
b) Le complexe cohésine	124
2. La topoisomérase IIα	126

B. LES QUEUES D'HISTONES DANS LA CONDENSATION	126
1. La phosphorylation mitotique des histones	127
a) La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3	127
(i) Corrélation spatio-temporelle avec la condensation des chromosomes	127
(ii) La kinase Aurora B et le Complexe Passager du Chromosome	129
(iii) La fonction de la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10	
au cours de la mitose	130
Un rôle dans la condensation de la chromatine	130
Un rôle de marquage des chromatides prêtes à être séparées	133
b) Les autres phosphorylations mitotiques	133
2. Les autres modifications des histones associées à la mitose	135
a) Les modifications mitotiques des histones « canoniques »	135
b) Les modifications mitotiques des variants d'histones	
PARTIE 1 : Etude des modifications post-traductionnelles de la sous-unité TAF10 au sein des complexes TFIID ou TFTC et de leurs variations en fonction du cycle cellulaire	137
I. L'HISTORIQUE DU PROJET	138
II. MATERIEL ET METHODES	139
A. PREPARATION D'EXTRAITS PROTEIQUES TOTAUX DE CELLULES HELA OU SF9	
B. PREPARATION D'EXTRAITS NUCLEAIRES DE CELLULES HELA	139
C. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE ET WESTERN BLOT	
D. SYNCHRONISATION DES CELLULES HELA EN PHASE G1/S OU G2/M DU CYCLE	
CELLULAIRE	
E. PREPARATION DES CELLULES POUR L'ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYT	OMETRIE
DE FLUX A L'AIDE DU FACSCAN	142
F. DOUBLE IMMUNOPRECIPITATION POUR LA PURIFICATION DE COMPLEXES TFIID	ET
L'OBTENTION D'UN SURNAGEANT CONTENANT LE COMPLEXE TFTC	143
G. REALISATION DE GELS EN DEUX DIMENSIONS	145
H. IMMUNOPURIFICATION ANTI-TAF10 POUR LA CONCENTRATION DE LA PROTEINI	E EN VUE
DE SON ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	147
I. COLORATION A L'ARGENT COMPATIBLE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE	147
J. PREPARATION D'ECHANTILLONS ET ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	148
III. RESULTATS	152
A. RECHERCHE DE L'EXISTENCE DE MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES SU	R LA
PROTEINE TAF10 DANS DES EXTRAITS CELLULAIRES	152
B. ÉTUDE DES VARIATIONS DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE TA	F10 en
FONCTION DU CYCLE CELLULAIRE	153
C. ÉTUDE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE TAF10 AU SEIN DES	
COMPLEXES TFIID ET TFTC	156
D. IDENTIFICATION DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE TAF10	158
1. Recherche des formes phosphorylées de TAF10	158
2. Recherche d'autres modifications de TAF10 par spectrométrie de masse	159
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	162

PARTIE 2 : Caractérisation d'une conformation particulière de la queue N-terminale de l'histone H3 doublement modifiée en mitose	169
I. HISTORIQUE DU PROJET	170
II. MATERIEL ET METHODES	
<ul> <li>A. MICROINJECTION DE PEPTIDES COMPETITEURS DANS DES CELLULES NIH3T3</li> <li>B. TIME LAPSE POUR LE SUIVI DES CELLULES NIH3T3 PREALABLEMENT MICROINIECTEES</li> </ul>	171
III. RESULTATS	
<ul> <li>A. LA PUBLICATION</li> <li>B. RESULTATS NON PUBLIES</li></ul>	173 et α- 177 · les 178 tion du 181 queue 182
IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	186
ANNEXE	193
BIBLIOGRAPHIE	193

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Représentation schématique de la théorie fondamentale de la biologie	
moléculaire	20
Figure 2 : Représentation schématique du phénomène d'épissage alternatif	22
Figure 3 : Les différentes étapes de régulation de l'expression des gènes	23
Figure 4 : Représentation schématique de quelques mécanismes de régulation de	
l'activité d'une protéine	28
Figure 5 : Représentation schématique des éléments régulateurs de l'expression	
des gènes	31
Figure 6 : Trois types de mécanismes proposés pour expliquer l'action des séquences	
régulatrices distales à distance	35
Figure 7: Structure cristallographique de l'ARN polymérase II	38
Figure 8 : Représentation schématique de divers complexes TFIID	44
Figure 9 : Les différents modèles d'assemblage du PIC sur un promoteur contenant	
une boîte TATA	49
Figure 10 : Représentation schématique des principaux complexes ATP-dépendant	
remodelant la chromatine	53
Figure 11 : Représentation schématique des GTFs, excepté TFIID, et de leurs	
modifications post-traductionnelles	62
Figure 12 : Représentation schématique des complexes TFIID et TFTC et de leurs	
modifications post-traductionnelles	66
Figure 13 : Représentation schématique des différents niveaux de compaction de	
l'ADN	69
Figure 14 : Structure atomique d'un nucléosome résolue par cristallographie aux	
rayons X	70
Figure 15 : Modèles d'organisation de la fibre chromatinienne de 30 nm	71
Figure 16 : Modèles de repliement de la fibre de 30 nm	73
Figure 17 : Localisation des principales modifications post-traductionnelles des	
histones du cœur du nucléosome chez les mammifères	77
Figure 18 : Profil de distribution de certaines modifications d'histone à travers le	
génome dans le contexte de la régulation de l'expression des gènes	83
Figure 19 : Représentation en structures semi-développées de la conversion chimique	
d'une arginine en citrulline	90
Figure 20 : Caractéristiques structurales des HKMTs contenant un domaine SET	
regroupées en sept familles	96
Figure 21 : Spécificités de site et de degré de méthylation des	
histone-méthyltransférases (HMTs) et histone-déméthylases (HDMs)	99
Figure 22 : Représentation des principaux évènements d'interdépendance entre	
modifications d'histones en CIS et en TRANS chez les mammifères	110
Figure 23 : Représentation schématique des variants d'histones de mammifères	116
Figure 24 : Illustration du livre Zellsubstanz, Kern und Zellheilung, 1882,	
(Substance cellulaire, Noyau et Division cellulaire) représentant les	
différentes phases de la mitose	119
Figure 25 : Représentation de l'évolution de la morphologie cellulaire et de la	
structure chromosomique à travers les phases du cycle cellulaire	120
Figure 26 : Les différentes étapes de la mitose	122
Figure 27 : Représentation schématique des complexes à protéines SMC des	
eucaryotes	123

### LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 28 :	Représentation schématique de deux mécanismes de condensation	
	de l'ADN par les condensines	124
Figure 29 :	Différents modèles pour le mécanisme de la cohésion des chromatides	
	sœurs par le complexe cohésine	125
Figure 30 :	Représentation schématique du profil de la phosphorylation de la	
	sérine 10 de l'histone H3 au cours de la mitose	128
Figure 31 :	Représentation schématique du complexe passager du chromosome	
-	(CPC)	
Figure 32 :	Les trois modèles illustrant la fonction de H3S10p au cours de la	
e	mitose	132
Figure 33 :	Représentation schématique des profils de phosphorylation des résidus	
0	S28, T11 et T3 de l'histone H3 au cours de la mitose	134
Figure 34 :	TAF10 existe sous différentes formes probablement issues de	
0	modifications post-traductionnelles dans les cellules HeLa	153
Figure 35 :	Les modifications post-traductionnelles de TAF10 varient en fonction	
8	du cycle cellulaire	154
Figure 36 :	Les modifications post-traductionnelles de TAF10 varient en fonction	
8	du complexe dans lequel se trouve la sous-unité et comprennent des	
	formes phosphorylées	157
Figure 37 ·	Plusieurs sites de la protéine TAF10 apparaissent comme	
1 18ai 0 5 / .	notentiellement modifiés suite à l'analyse par spectrométrie de masse	160
Figure 38 ·	Quelques modèles du rôle des modifications post-traductionnelles des	
i iguit 50 .	facteurs de transcription	166
Figure 39 ·	L'anticorns 51TA2H12 occupe les régions internes de la chromatine	100
i iguite 57 .	en présence de l'anticorps q_dimeK9nS10 qui lui est recruté au	
	niveau de la chromatine périnhérique	178
Figure 40 ·	51TA 2H12 reconnect un motif Km2Sn ou Km22D aussi bien dans	1/0
Figure 40.	los pontidos H2 que dons los pontidos TAE10	170
Figure 11.	51TA2H12 reconnect une conformation átiráe de la queue d'historie H2	1/9
Figure 41.	doublement modifiée régultant de la formation d'un lien hydrogène	
	autro K0mo2 at \$10m at d'une position portioulière de P8	101
Eiguna 42	La madification conformation alla macannua non 51TA 21112 nourmait	181
Figure 42 :	La modification conformationnelle reconnue par 511A2H12 pourrait	
	etre impliquee dans la progression des cellules à travers le cycle	104
г <sup>.</sup> 42		184
Figure 43 :	Nodele resumant la reconnaissance de la queue d'histone H3 par	
	1 anticorps 511A2H12 en fonction des modifications qui y ont lieu	105
	et de la conformation de la chaine peptidique	187

Tableau 1 : Nouvelle nomenclature des TAFs associés à TFIID chez H. sapiens et	
de leurs orthologues connus chez d'autres modèles	. 40
Tableau 2 : Composition biochimique des complexes hTFIID et hTFTC	42

# LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

ac = acétylationAcétyl-CoA = acétyl-coenzyme AACF = ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor ADA = *ADAptator* AdMLP = Adenovirus Major Late Promoter ADN = Acide DésoxyriboNucléique AMP = Adénosine MonoPhosphate ar = ADP-ribosylation ARC = Activator-Recruited Complex ARN = Acide RiboNucléique ARN polymérase I = ARN Pol I ARN polymérase II = ARN Pol II ARN polymérase III = ARN Pol III ARNm = ARN messager ARNr = ARN ribosomique ARNsc = petit ARN cytoplasmique (*small cytoplasmic RNA*) ARNsi = petit ARN interférant (*small interfering RNA*) ARNsn = petit ARN nucléaire (small nuclear RNA) ARNsno = petit ARN nucléolaire (small nucleolar RNA) ARNt = ARN de transfertASH1L = Absent Small and Homeotic disks protein 1-Like ATP = Adénosine TriPhosphate ATXN7 = ATaXiN-7BAF53 = Brahma related gene 1-Associated Factor 53kDa BER = réparation de l'ADN par excision de base (*Base Excision Repair*) BHC80 = BRAF HDAC2 Complex protein 80 kDa BPTF = Bromodomain and PHD finger-containing Transcription Factor BRCT = BReast Cancer-susceptibility protein-1 C-Terminal

- BRE = élément de reconnaissance au facteur de transcription TFIIB (*TFIIB Recognition*
- *Element*) BRE<sup>d</sup> = BRE en aval de la boîte TATA (*BRE downstream of the TATA box*)
- $BRE^{u} = BRE$  en amont de la boîte TATA (*BRE upstream of the TATA box*)

C/EBP = CCAAT/Enhancer Binding Protein

CAK = Cyclin-dependent Activating Kinase

CARM1 = Coactivator Associated Arginine Methyltransferase I

- CBF = CCAAT box binding Factor (aussi appelés NF-Y)
- CBP = *CREB*-Binding Protein

CDK = Kinase Dépendante des Cyclines (Cyclin-Dependent Kinase)

CENP-A = CENtromere Protein A

CHAPS = (3-[(3-CHolamidopropyl) dimethyl-Ammonio]-1-PropaneSulfonate)

CHCA = acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique

CHD1 = Chromodomain Helicase DNA-binding 1

ChIP = Chromatin ImmunoPrecipitation

CHRAC = *CHRomatin-Accessibility Complex* 

CHROMOdomain = CHRomatin Organisation Modifier domain

CIP = Calf Intestinal Phosphatase CKII = Casein Kinase II CoREST = CoREpreSsor element Transcription factor CPC = Chromosomal Passenger Complex CPSF = Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor CRB2 = CRumB 2 CSB = Cockayne Syndrome protein B CTD = domaine C-terminal (Carboxy-Terminal Domain) CTF = CCAAT box binding Transcription Factor (aussi appelés NF-I) CycH = Cycline H Da = Dalton DBD = domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain) DCE = Downstream Core Element

DBD – domaine de naison a l'ADN (DNA Binaing Domain) DCE = Downstream Core Element DDM = Decrease DNA Methylation 1 DHB = acide dihydroxybenzoïque DIC = Differential Interference Contrast Dlk/ZIP = DAP-like kinase/Zipper Interacting Protein DMEM = Dulbecco Modified Eagle's Medium DNA-PK = protéine kinase ADN-dépendante (DNA-dependent Protein Kinase) DNMT = DNA MethylTransferase DOT1L = Disrupter Of Telomere silencing protein 1-Like DPE = Dowstream Promoter Element DRIP = vitamin D Receptor-Interacting Proteins DSB = cassures double-brin (Double Strand Break) DSIF = DRB Sensitivity Inducing Factor DTT = DiThioThréitol

EDTA = acide Éthylène-Diamine-TétraAcétique EGF = facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor*) ELL = *Eleven-nineteen Lysine-rich Leukemia* ERCC1-XPF = *Excision Repair Cross Complementary group 1 – Xeroderma Pigmentosum F* EZH = *Enhancer of Zeste Homologue* 

FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting FACT = FAcilitates Chromatin Transcription FKBP25 = FK506 Binding Protein 25 FPR4 = FK506 binding PRotein 4 FRET = Fluorescence Resonance Energy Transfert

G1 = premier intervalle (*Gap 1*) G2 = deuxième intervalle (*Gap 2*) GCN5 = *General Control Nonrepressed 5* GNAT = *GCN5-N-AcétylTransférase-related* GTF = Facteurs Généraux de Transcription (*General Transcription Factor*)

h = heure H2A.Bbd = H2A.Barr body deficient H2BFWT = H2B histone Family member W Testis specific Haspin = Haploid germ cell-specific nuclear protein HAT = Histone-AcétylTransférase HBO1 = Histone acetyltransferase Binding to ORC1 HDAC = Histone-DéACétylases HDM = Histones-DéMéthylases HFD = repliement de type histone (Histone Fold Domain) HKMT = HMTs spécifiques des lysines HMT = Histone-MéthylTransférase HOX = HomeOboX HP1 = Heterochromatin Protein 1 HPLC = High Performance Liquid Chromatography HSP = protéine de choc thermique (Heat Shock Protein)

IEF = IsoÉlectroFocalisation IGR = région intergénique (*InterGenic Region*) INCENP = *INner CENtromer Protein* ING2 = *INhibitor of Growth protein 2* INO80 = *INOsitol 80* Inr = élément Initiateur IP = ImmunoPrécipitation IPG = *Immobilized PH gradient Gel* ISWI = *Imitation SWItch* 

JARID = Jumonji At-Rich Interactive Domain JHDM1 = JmjC-containing Histone Demethylase 1 JmjC = Jumonji C

kb = kilobase

L3MBTL1 = Lethal 3 Malignant Brain Tumor-Like protein 1 LID = Laser Induced Decomposition LSD1 = Lysine-Specific Demethylase 1

M = MitoseMALDI-TOF = Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinases MART = Mono-ADP-RibosylTransférase MAT1 = Ménage À Trois 1MBP = *Methyl-CpG-Binding Proteins* MBT = Malignant Brain Tumor Mda = MégaDalton MDC1 = Mediator of DNA-damage Checkpoint protein-1 me = méthylation me1 = monométhylation me2 = diméthylationme3 = triméthylation MED-1 = Multiple start site Element Downstream 1 min = minuteMLL = Mixed Lineage Leukemia protein MOF = Males-absent On the First protein MORF = *MORtality Factor* 

MOZ = MOnocyte leukemia Zinc finger protein MSK1/2 = Mitogen- and Stress-activated protein Kinase <sup>1</sup>/<sub>2</sub> MSL = Male Specific Lethal Mst1 = Mammalian sterile twenty kinase 1 MTE = Motif Ten Element MYST = MOZ, YBF2/SAS3, SAS2, TIP60

 $NAD^{+} = Nicotinamide Adenine Dinucleotide$  NAT = Negative Regulator of Activated Transcription N-CoR1 = Nuclear receptor CoRepressor 1 NCS = Newborn Calf Serum NELF = Negative ELongation Factor NER = réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair) NF-I = Nuclear Factor I (aussi appelés CTF) NF-Y = Nuclear Factor Y (aussi appelés CBF) NIMA = Never In Mitosis gene A NSD3 = Nuclear SET Domain containing protein NuA4 = Nucleosome Acetyltransferase of histone H4 NuRD = Nucleosome Remodeling and DeacetylatingNURF = NUcleosome Remodeling Factor

ORF = région transcrite (*Open Reading Frame*)

```
p = phosphorylation
p/v = poids sur volume (1% = 1 g pour 100 ml)
p53BP1 = p53 Binding Protein 1
PAD = PeptidylArginine-Déiminase
PARP = Poly(ADP-Ribose) Polymerase
pb = paire de base
PBS = Phosphate Buffered Saline
PC2 = Positive Cofator 2
PCAF = P300/CBP Associated Factor complex
PcG = groupe Polycomb (Polycomb Group)
PCV = Packed Cell Volume
PHD = Plant HomeoDomain
PHF = PHD Finger protein
pI = point Isoélectrique
PIC = Complexe de Pré-Initiation (Preinitiation Complex)
PIC = Protease Inhibitor Cocktail
PKA = Protéine Kinase A
PMSF = PhénylMéthylSulfonylFluoride
PP1 = Protein Phosphatase type 1
PRC2 = Polycomb Repressive Complex 2
PRDM = PR-Domain-containing Methyltransferase
PRMT = arginine-méthyltransférase de protéine (Protein aRginine MethylTransferase)
P-TEFb = Positive-Transcription Elongation Factor b
```

qsp = quantité suffisante pour

RAD6 = RADiation sensitive protein 6

Rb = *Retinoblastoma* rNTPs = riboNucléotides TriPhosphates RPB = RNA Polymerase BRSC = Remodeler of the Structure of the Chromatin RSF = Remodeling and Spacing Factor RT-PCR = Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction S = Synthèse d'ADNSAGA = Spt-Ada-Gcn5 Acetylase coactivator complex SAM = S-adénosine-méthionine SANT = SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIIB SAS = Something About Silencing protein SCA7 = SpinoCerebellar Ataxia type 7 SCC1 = Sister Chromatid Cohesion 1 SDS = dodécyl sulfate de sodium (pour *Sodium Dodecyl Sulfate*) SET = Su(var), Enhancer of zest, Trithorax SETDB1 = SET Domain Bifurcated 1 SETMAR = SET domain and MARiner transposase fusion gene-containing protein SFMBT = Scm-like with Four MBT domains protein SH2 = Src Homology region 2 SIRT = SIRTuine SMC = Structural Maintenance of Chromosomes SMN = Survival of Motor Neuron SMYD = SET and MYND domain containing protein snRNP = petite RiboNucleoProtéine nucléaire (small nuclear RiboNucleoProtein) spH2B = human SPerm specific H2B SPT = Suppressor of TySRC = Steroïd Receptor Coactivator STAGA = SPT3-TAF9-GCN5 containing complex Su(var)3-9 = Suppression of variagation 3-9SUMO = Small Ubiquitin-like MOdifier sumo = sumoylation SWI/SNF = mating-type SWItching/Sucrose Non Fermenting SWR1 = SWi2/Snf2 Related ATPase 1 TAF = facteur associé à TBP (*TBP Associated Factor*) TAP = TIP60 Associated Protein TBP = protéine de liaison à la boîte TATA (TATA Binding Protein) TD-60 = Telophase Disk of 60 kDaTEMED = N,N,N',N'-TÉtra-Méthyle-Éthylène-Diamine TFTC = *TBP*-*Free TAF*-*Containing complex* TIF1 = Transcription Intermediary Factor 1 TIP60 = Tat Interacting Protein 60kDa TLF = *TBP-Like Factor* (aussi appelé TRF2 ou TLP) TLP = TBP-Like Protein (aussi appelé TRF2 ou TLF) TRAP = Thyroid Hormone Receptor-Associated Protein TRF = facteur apparenté à TBP (*TBP-Related Factor*) TRRAP = Transformation/tRanscription domain-Associated Protein TSH2B = Testis Sperm specific H2B TSS = site d'initiation de la transcription (*Transcription Start Site*)

TTDA = TrichoThioDystrophy of complementation group A

UAS = séquence activatrice située en amont (*Upstream Activating Sequence*) ub = ubiquitination URS = séquence répressive située en amont (*Upstream Repressing Sequence*) UT = *Ubiquitously transcribed Tetratricopeptide repeat gene* UV = ultraviolet

v/v = volume sur volume (1% = 1 ml pour 100 ml) VIH = Virus de l'Immunodéficience Humaine

WB = Western Blot WD40 = Tryptophane-Aspartic-acid-repeat every 40 residues WDA = Will Decrease Acetylation WDR5 = WD40 Repeat protein 5

XCPE1 = X gene Core Promoter Element 1 XPB = Xeroderma Pigmentosum B XPD = Xeroderma Pigmentosum D

# INTRODUCTION

## I. La régulation de l'expression des gènes ou comment l'information génétique est modulée pour s'adapter aux besoins de la cellule

Chaque cellule d'un organisme (métazoaire) contient l'intégralité du patrimoine génétique. Pourtant, au cours des nombreuses étapes de la vie de cet organisme, chacune se verra attribuer un destin différent afin d'accomplir diverses fonctions telles que le maintien de l'homéostasie, la lutte contre les agents extérieurs, la reproduction, ou simplement la survie. Pour cela, les processus de division, de différenciation et de mort cellulaire doivent être finement régulés sous peine d'engendrer de graves troubles comme, par exemple, le développement d'une tumeur. En outre, une fois la cellule différenciée et ayant intégré un tissu, un nouveau contrôle sera nécessaire à l'établissement d'une collaboration efficace avec les cellules voisines, phénomène indispensable au tissu pour mener à bien sa fonction. Toutes les informations contenues sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) sous forme de gènes ne sont donc pas nécessaires à tout moment pour la cellule. Certains gènes seront exprimés dans toutes les cellules, on les appelle gènes de ménage, d'autres seront spécifiquement exprimés ou réprimés en fonction du type cellulaire et de l'environnement. Il s'agit donc pour la cellule de « choisir » les portions du génome qui doivent être exprimées à un moment donné et dans un contexte donné.

#### A. Le dogme central de la biologie moléculaire

C'est en 1958 que Francis Crick formula le dogme de la biologie moléculaire selon lequel l'ADN dirige sa propre réplication en ADN identique, ainsi que sa transcription en acide ribonucléique (ARN) pouvant, ou non, être traduit en protéines (Fig.1). Mais il s'agit en fait plus d'une théorie fondamentale que d'un dogme établi comme une vérité incontestable. En effet, les découvertes ultérieures de nouveaux processus n'ont cessé d'enrichir ce schéma de base. Ainsi, l'ARN pré-messager tout juste transcrit doit subir une étape de maturation donnant lieu à l'ARN messager (ARNm) pour pouvoir être traduit par les ribosomes. En outre, une fois la protéine synthétisée, celle-ci devra adopter une structure tridimensionnelle spécifique régie par les propriétés physico-chimiques de ses acides aminés et qui lui permettra d'être fonctionnelle. Un dernier exemple de la complexification de ce schéma est celui de la mise en évidence, chez les rétrovirus, d'une enzyme, la transcriptase inverse, capable de rétrotranscrire l'ARN viral en ADN (Fig.1). Si ces derniers mécanismes ne remettent pas en cause le postulat de la théorie fondamentale de la biologie, ils l'élargissent considérablement.



<u>Figure 1</u> : Représentation schématique de la théorie fondamentale de la biologie moléculaire. L'ADN dirige sa propre réplication en ADN identique, ainsi que sa transcription en ARN pouvant, ou non, être traduit en protéines.

#### 1. La réplication de l'ADN

L'ADN est répliqué au cours de la phase S du cycle cellulaire par des enzymes de la famille des ADN polymérases. A l'issue de la réplication, chaque molécule d'ADN nouvellement formée est constituée d'un brin parental qui aura servi de matrice pour la synthèse de son brin complémentaire : le brin néoformé. Il s'agit donc d'un phénomène semiconservatif. De plus, la réplication débute à partir d'une origine de réplication et progresse dans les deux sens à partir de ce point créant ainsi deux fourches de réplication. On parle alors de réplication bidirectionnelle de l'ADN (pour un livre (Pollard and Earnshaw, 2004)).

#### 2. La transcription de l'ADN en ARN

Tandis qu'il n'existe qu'une enzyme, l'ARN polymérase, chargée de transcrire tous les gènes chez les procaryotes, on en compte trois différentes chez les eucaryotes : l'ARN polymérase I (ARN Pol I), l'ARN polymérase II (ARN Pol II) et l'ARN polymérase III (ARN Pol II). Il existe cependant chez les plantes une quatrième enzyme, l'ARN polymérase IV, responsable de la synthèse des petits ARN interférents, ou ARNsi, engagés dans la défense et

dans la régulation de l'expression des gènes (pour une revue (Vaughn and Martienssen, 2005)).

L'ARN Pol I transcrit les gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) de grande taille 28S, 18S et 5,8S, directement impliqués dans la synthèse des protéines lors de la traduction. L'ARN Pol III assure la transcription des ARN de transfert (ARNt), qui transportent les acides aminés au ribosome lors de la synthèse protéique, de l'ARNr 5S et du petit ARN nucléaire U6 (ARNsnU6) jouant un rôle dans l'épissage lors de la maturation des ARN pré-messager évoquée plus loin dans ce chapitre. Enfin, l'ARN Pol II, associée à des facteurs de transcription, transcrit les gènes codant pour les autres petits ARN nucléaires (ARNsn), pour les petits ARN nucléolaires (ARNsno) qui permettent le ciblage précis de modifications chimiques nécessaires à la fonctionnalité des ARNr, et pour les petits ARN cytoplasmiques (ARNsc) qui interviennent dans la maturation des ARNt. Mais l'ARN Pol II est surtout chargée de transcrire les gènes codant pour les protéines : les ARN pré-messagers qui, après maturation, deviendront des ARN messagers (ARNm). La présente thèse ne concernera d'ailleurs que la transcription de ces gènes de classe II.

La transcription est divisée en 3 grandes phases distinctes mais dépendantes les unes des autres, à commencer par l'initiation où a lieu la synthèse des premières liaisons ribonucléiques. Vient ensuite l'élongation durant laquelle on assiste à l'allongement de la chaîne d'ARN. L'ARN Pol II parcourt le gène de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' et synthétise un ARN simple brin complémentaire à l'ADN matriciel. L'ARN est alors rapidement protégé de la dégradation en son extrémité 5' par l'ajout d'une guanosine qui sera plus tard méthylée. Ce « coiffage » de l'ARN constitue la première étape de la maturation de l'ARN pré-messager. La terminaison est la dernière phase de la transcription. Elle provoque la libération de l'ARN pré-messager et le départ de la machinerie de transcription de l'ADN (Buratowski, 1994). La maturation de l'ARN pré-messager se poursuit alors par la synthèse d'une chaîne de 100 à 200 adénosines monophosphates à son extrémité 3' par une enzyme spécialisée : la poly-A polymérase. Enfin, l'épissage constitue l'étape finale de la maturation de l'ARN pré-messager. Elle consiste en l'excision des régions non codantes, dites introns, qui séparent les régions codantes, ou exons. Ces réactions, assurés par le complexe d'épissage au sein du novau, pourront aboutir à l'obtention de divers ARN matures, et donc de divers protéines, à partir d'un même ARN pré-messager (Fig.2) (pour une revue (Graveley, 2001)). Ce phénomène, connu sous le nom d'épissage alternatif, constitue, comme il sera décrit plus tard, une étape potentielle dans la régulation de l'expression des gènes.



<u>Figure 2</u>: Représentation schématique du phénomène d'épissage alternatif. *Chaque gène est* composé de séquences codantes, les exons (E), et de séquences non codantes, les introns. Lors de l'épissage alternatif, les introns, et parfois certains exons, sont éliminés. Un seul gène peut alors coder pour plusieurs protéines.

#### 3. La traduction de l'ARNm en protéines

Les acteurs principaux de la traduction sont les ribosomes. Il s'agit de molécules ribonucléoprotéiques composées d'ARNr portant l'activité catalytique et de protéines ribosomiques. Chaque ribosome est constitué de deux sous-unités : une petite sous-unité, appelée aussi sous-unité 40S chez les eucaryotes, à travers laquelle passe l'ARNm, et une grande sous-unité, ou sous-unité 60S chez les eucaryotes, qui possède les activités catalytiques nécessaires à la synthèse de protéine.

Au cours de la traduction, le ribosome se déplace le long de l'ARNm et associe à chaque codon, séquence de trois nucléotides consécutifs, un ARNt lui correspondant. Ce dernier apporte ainsi le bon acide aminé qui sera relié au bon endroit de la chaîne peptidique. La chaîne d'acides aminés s'allonge donc suivant un ordre précis donné par les codons de l'ARNm. Le début et la fin de la traduction seront respectivement signalés par un codon initiateur et un codon stop au niveau de l'ARNm. Plusieurs ribosomes à la fois peuvent traduire un seul et même ARNm, formant ainsi un polysome (pour un livre (Pollard and Earnshaw, 2004)).

#### B. Les différents niveaux de régulation de l'expression des gènes

La régulation de l'expression des gènes de classe II peut avoir lieu à toutes les étapes décrites précédemment qui conduisent à l'obtention d'une protéine à partir d'un gène sur l'ADN (Fig.3). Ainsi, une cellule peut contrôler la production d'une protéine donnée en spécifiant quand et à quelle fréquence un gène correspondant doit être transcrit : c'est la régulation transcriptionnelle. Elle peut ensuite agir sur la maturation de l'ARN transcrit, notamment au niveau de l'épissage, puis sélectionner quels ARNm matures vont être exportés du noyau vers le cytosol tout en déterminant éventuellement où ils seront localisés. Une fois dans le cytoplasme, la cellule peut désigner quels ARNm seront traduits par les ribosomes et lesquels seront dégradés. Enfin, un dernier contrôle peut avoir lieu après la traduction par l'activation, la dégradation ou la compartimentalisation des protéines néosynthétisées : c'est la régulation post-traductionnelle.



<u>Figure 3</u>: Les différentes étapes de régulation de l'expression des gènes. L'ARNm est représenté coiffé et polyadénylé. Lors de la régulation post-traductionnelle, la protéine peut être activée, désactivée, dégradée ou compartimentée par le biais de divers processus décrit en I.B.2.c et sur la figure 4.

Pour la plupart des gènes, la régulation transcriptionnelle est la plus importante. En effet, en agissant à cette étape qui est la plus précoce, la cellule s'assure de ne pas synthétiser d'intermédiaires superflus.

#### 1. La régulation transcriptionnelle

La régulation de la transcription chez les eucaryotes repose sur deux processus. Le premier fait intervenir des facteurs de transcription impliqués dans l'initiation ou dans l'élongation de la transcription. Les facteurs généraux de transcription (GTFs pour *General Transcription Factors*) par exemple, nécessaires à l'initiation de la transcription par l'ARN Pol II (décrits en II.A.2 de ce manuscrit) peuvent être la cible de protéines régulatrices qui sont capables de stimuler ou diminuer leur association en complexe de pré-initiation (PIC pour *Preinitiation Complex*).

En outre, certaines de ces protéines régulatrices modifient localement le degré de compactage de l'ADN en chromatine. Les nombreux mécanismes de régulation qui découle de cette dynamique de condensation de la chromatine sont regroupés, avec d'autres, sous le terme d'épigénétique.

#### a) La régulation transcriptionnelle par les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription constituent des cibles de choix pour la régulation de la transcription. Leur fixation sur des sites spécifiques de l'ADN situés en amont ou en aval du gène à transcrire est rendue possible par la présence de motifs de liaison à l'ADN sur la protéine appelés DBD (pour *DNA Binding Domain*) tels que la glissière à leucine ou la structure en doigt de zinc pour n'en citer que deux. Cette fixation est nécessaire pour que la transcription puisse commencer. Certains facteurs interviennent dans la transcription de tous les gènes de classe II : ce sont les facteurs généraux de la transcription (GTFs) (détaillés en II.A.2 de ce manuscrit). D'autres, comme les récepteurs nucléaires, ne régulent l'expression que d'une catégorie de gènes. Tous les facteurs de transcription sont cependant soumis au contrôle de la cellule, mais par des mécanismes différents.

La fixation et l'assemblage des facteurs généraux de transcription au niveau d'un promoteur peuvent ainsi être modulés par la présence de protéines régulatrices fixées en amont ou en aval du gène. Ces protéines, appelées activateurs ou répresseurs en fonction, respectivement, de leur influence positive ou négative sur l'expression du gène régulé, peuvent agir à plusieurs milliers de paires de bases de la région promotrice du gène ciblé. Aussi, pour éviter les phénomènes de « débordement » de l'effet des protéines régulatrices sur les gènes voisins, les gènes sont souvent séparés par des séquences d'ADN appelées isolateurs, reconnues par des complexes protéiques jouant le rôle de barrières (pour une revue (Kuhn and Geyer, 2003)).

Les GTF sont également sujet à l'ajout de divers groupements chimiques au niveau de certains de leurs acides aminés. On appelle ce type de réaction une modification post-traductionnelle. De telles modifications peuvent alors modifier la rapidité d'assemblage du PIC ou l'activité catalytique du facteur concerné (voir partie II.B.2).

#### b) L'épigénétique

Conrad Waddington est le premier à avoir employé le terme épigénétique au début des années cinquante. Il désigne ainsi les changements phénotypiques qui ont lieu dans un organisme durant son développement sans qu'il n'y ait de modifications correspondantes de son génotype (Waddington, 1952). Depuis, la notion s'est affranchie de son carcan développemental pour regrouper plus largement les modifications transmissibles aux cellules filles et réversibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant pas de changements des séquences nucléotidiques. L'épigénétique recouvre aujourd'hui essentiellement les processus qui altèrent la structure chromatinienne, à l'exception du « gene silencing », tout en conservant sa notion d'héritabilité au cours de la division cellulaire. Ce type de régulation peut avoir lieu au niveau de l'ADN, de l'ARN ou de la protéine et constitue l'un des fondements de la diversité biologique. L'inactivation du chromosome X, qui permet de compenser le dosage des gènes entre individus mâles et femelles (pour une revue (Heard, 2004)), ou le « gene silencing », faisant intervenir les ARNsi utilisés notamment par certains organismes eucaryotes, principalement les plantes, comme moyen de défense contre les virus (pour une revue (Mello and Conte, 2004)), sont deux exemples parmi les nombreux mécanismes épigénétiques connus à ce jour. Mais l'un des phénomènes les plus étudié est la modification post-traductionnelle des histones, acteurs principaux de la compaction de l'ADN en chromatine. Il s'avère en effet que l'ajout de groupements chimiques sur ces protéines modifie, directement ou par recrutement de facteurs intermédiaires, le degré de compaction de la chromatine, rendant les gènes plus ou moins accessibles aux facteurs de transcription. Cette dernière thématique sera détaillée dans le chapitre III.C.

#### 2. La régulation post-transcriptionnelle

Au-delà de la transcription, la cellule bénéficie de nombreuses autres étapes pour réguler l'expression de ses gènes. L'épissage alternatif des ARNm évoqué précédemment (Fig.2), la régulation de la traduction ou encore la régulation post-traductionnelle de la fonction des protéines sont quelques uns des mécanismes destinés à contrôler le niveau de protéines actives au sein de la cellule.

#### a) L'épissage alternatif

Comme il a été brièvement décrit en I.A.2, au cours de sa maturation, l'ARN prémessager subit une étape d'épissage durant laquelle ses introns, et parfois quelques exons, sont excisés et les exons restant, ligaturés. La plupart du temps, lorsque les introns ne sont pas auto-épissables, ces réactions sont assurées par un ensemble de petits complexes ribonucléoprotéiques appelés snRNP (pour *small nuclear RiboNucleoProtein*). Chacun de ces complexes est composé d'un ARNsn et de plusieurs protéines. Associés à l'ARNm ils forment le spliceosome.

Il est aujourd'hui admis que près de 80 % des gènes humains subissent l'épissage alternatif. Grâce à ce mécanisme, une cellule va pouvoir, en fonction de ses besoins, générer différentes protéines à partir d'un même ARN transcrit (Fig.2) (pour une revue (Graveley, 2001)). Muratoglu et ses collaborateurs ont par exemple montré que le niveau des transcrits *dAda2a* et *dRpb4*, issus de l'épissage alternatif du gène *dAda2a/dRpb4*, n'était pas toujours identique mais variait au cours des différentes étapes du développement de la drosophile (Muratoglu et al., 2003). L'épissage alternatif peut également permettre la synthèse d'une protéine active ou non, ou encore de différentes versions d'une même protéine en fonction du type cellulaire.

L'épissage pourra être régulé négativement ou positivement, par une molécule régulatrice qui, respectivement, empêchera ou aidera le spliceosome à accéder à un site d'épissage particulier. La détermination du sexe chez la drosophile met en scène ce type de molécule tout au long d'une cascade d'évènements d'épissages soumis à la régulation (Baker, 1989).

#### b) La régulation de la traduction

Les ARNm, comme l'ADN, adoptent des structures tertiaires. La stabilité de ces structures peut changer en réponse à des signaux extracellulaires pour permettre ou non l'initiation de la traduction. La fixation de molécules régulatrices sur les transcrits vont les rendre plus ou moins stables et donc constituer un moyen pour contrôler leur traduction. C'est la stratégie employée par les eucaryotes pour ajuster le niveau des protéines impliquées dans le métabolisme du fer en fonction des ressources de l'environnement (Casey et al., 1988; Hentze et al., 1989) ou pour réguler la traduction de certains ARNm embryonnaires au cours du développement (pour une revue (Kuersten and Goodwin, 2003)).

En outre, de la même façon que certaines protéines, les ARNm sont parfois dotés de propriétés allostériques. Dans ce cas, la fixation d'une molécule régulatrice permet d'induire un changement de structure de l'ARNm rendant le site d'initiation de la traduction accessible ou non aux ribosomes. Ce phénomène a pu être constaté dans les mécanismes de réinitiation de la traduction chez les eucaryotes lors, par exemple, de la régulation de la production de certaines sous-unités ribosomiques ou encore du facteur de transcription ATF4 (pour une revue (Kozak, 2005)).

#### c) La régulation post-traductionnelle de la fonction des protéines

La protéine nouvellement synthétisée, tout juste issue de la traduction de l'ARNm, doit adopter une structure tridimensionnelle particulière pour être fonctionnelle. Le repliement de la protéine va de prime abord reposer sur l'ordre et les propriétés physico-chimiques des acides aminés qui la composent. Mais il arrive aussi que d'autres réactions chimiques telles que l'isomérisation cis ou trans de certains acides aminés, ou l'établissement ou la rupture de liaisons covalentes comme les ponts disulfures, interviennent dans ce processus de repliement. Enfin, la structure de la protéine peut dépendre de sa liaison à des protéines chaperonnes comme les protéines de choc thermique ou HSP (pour *Heat Shock Proteins*).

Cependant, même structurée, l'activité de la protéine peut toujours être soumis au contrôle de la cellule grâce à de nombreux dispositifs (Fig.4). La liaison d'un ligand, comme dans le cas des récepteurs nucléaires dits « classiques », est l'un de ces mécanismes (Bourguet et al., 2000).

La protéine peut également être modifiée post-traductionnellement par l'ajout de groupements chimiques. Ces modifications post-traductionnelles pourront servir à la

régulation de l'activité de la protéine, à son étiquetage pour qu'elle puisse être reconnue par des partenaires métaboliques ou par des systèmes de dégradation, à son ancrage dans la membrane, à sa localisation cellulaire ou encore à sa participation à des cascades de signalisation. Ce processus a d'ailleurs été observé dans de nombreuses cascades de signalisation comme celle de NF $\kappa$ B (pour une revue (Perkins, 2006)). Les modifications les plus communes sont les phosphorylations (ajout d'un groupement phosphate PO<sub>4</sub>), les acétylations (ajout d'un groupement acétyle COCH<sub>3</sub>), les méthylations (ajout d'un ou plusieurs groupements méthyles CH<sub>3</sub>) et les ubiquitinations (ajout d'une ou plusieurs ubiquitines).



<u>Figure 4</u> : Représentation schématique de quelques mécanismes de régulation de l'activité d'une protéine. *Chacun de ces mécanismes a lieu en réponse à des signaux extracellulaire transmis aux protéines régulatrices dans le cytoplasme. Tous ces mécanismes sont également réversibles et peuvent donc conduire à l'inactivation d'une protéine active. Plus de détails sur chaque processus apparaissent dans le texte.* 

De nombreuses protéines sont aussi activées suite à leur association à une ou plusieurs sous-unités. Elles forment ainsi un complexe voué à une fonction précise. C'est notamment le cas des kinases dépendantes des cyclines ou CDK (pour *Cyclin-Dependent Kinases*) qui doivent se lier à une cycline spécifique pour pouvoir user de leur activité catalytique (pour une revue (Pines, 1995)).

Le masquage du site actif de la protéine par une molécule inhibitrice est une autre stratégie employée par la cellule pour réguler l'activité de ses protéines. Dans ce cas, l'ajout, par exemple, d'une modification post-traductionnelle au niveau de l'inhibiteur peut induire son détachement de son partenaire. Un tel processus a été mis en évidence lors du cycle cellulaire au niveau du point de contrôle (ou checkpoint) en fin de phase G1. En effet, la protéine Rb (pour Retinoblastoma) inhibe le facteur de transcription E2F, indispensable pour la synthèse de protéines nécessaire au passage en phase S du cycle cellulaire. L'inhibition ne prend fin que lors de la phosphorylation de Rb qui libère alors E2F (pour une revue (Giacinti and Giordano, 2006)). Mais la molécule inhibitrice peut également servir à empêcher la protéine d'entrer dans le novau, étape nécessaire à la stimulation de son activité. A titre d'exemple, ce phénomène est retrouvé dans la cascade de signalisation de NFkB déjà évoqué plus haut. Dans la voie de signalisation dite canonique, la protéine inhibitrice IkB maintient le facteur de transcription NFkB dans le cytoplasme. Une fois phosphorylée par le complexe IKK, IKB est ubiquitiné puis dégradé par le protéasome, laissant NFKB libre de franchir la membrane nucléaire pour activer la transcription de ses gènes cibles (pour une revue (Gilmore, 2006)).

Enfin, le contrôle de l'activité d'une protéine peut se faire par protéolyse d'une protéine membranaire pour libérer une protéine activée. Ce processus, désigné par le terme de « *ectodomain shedding* » (littéralement perte de l'ectodomaine), affecte tout une variété de protéines transmembranaires impliquées notamment dans le développement ou l'immunité comme certains récepteurs aux facteurs de croissance, aux protéinases ou aux cytokines. Un exemple bien décrit dans la littérature est celui du récepteur tyrosine kinase ErbB-4, membre de la famille des récepteurs aux facteurs de croissance épidermiques (ou EGF pour *Epidermal Growth Factor*) (pour une revue (Carpenter, 2003)).

# II.La régulation de l'expression des gènes par les facteurs généraux de transcription

L'initiation de la transcription est une étape clef dans le contrôle de l'expression des gènes. Une machinerie complexe a en effet été mise en place afin de permettre à la cellule de réguler finement sa production de protéines en fonction de ses besoins. Les facteurs généraux de transcription en sont les principaux acteurs et peuvent être la cible de modifications pour les guider dans leurs fonctions.

#### A. La machinerie de base de la transcription

#### 1. Des séquences régulatrices au cœur de l'ADN

L'initiation de la transcription d'un gène repose notamment sur la fixation de facteurs au niveau d'une région appelée promoteur ainsi que sur la reconnaissance de séquences spécifiques par des éléments régulateurs.

#### a) Le promoteur minimal

Le promoteur minimal a été défini à l'origine comme le plus petit fragment d'ADN nécessaire et suffisant pour permettre un niveau basal d'initiation de la transcription par l'ARN Pol II in vitro sur une matrice d'ADN nue contenant un site d'initiation de la transcription (TSS pour *Transcription Start Site*) bien défini (désigné comme +1 ; les chiffres négatifs désignent les nucléotides en amont de celui-ci, les chiffres positifs ceux en aval) (pour revues (Sandelin et al., 2007; Smale and Kadonaga, 2003; Weis and Reinberg, 1992)). Suivant cette définition, le promoteur minimal ne serait constitué que de la boîte TATA et/ou de l'élément initiateur (Inr). Mais si l'on considère le promoteur minimal dans un contexte in vivo, il s'étend approximativement de 40 paires de bases (pb) en amont et en aval du TSS, et nécessite de nombreux autres éléments. On connaît notamment aujourd'hui les éléments de reconnaissance au facteur de transcription TFIIB (BRE pour TFIIB Recognition Element), la séquence DPE (pour *Dowstream Promoter Element*), le MTE (pour *Motif Ten Element*) et le DCE (pour Downstream Core Element) (pour une revue (Juven-Gershon et al., 2006)) (Fig.5). D'autres éléments qui ne seront pas abordés ici ont également été décrit tels que MED-1 (pour Multiple start site Element Downstream 1) (Ince and Scotto, 1995) ou XCPE1 (pour X gene Core Promoter Element 1) (Tokusumi et al., 2007).



<u>Figure 5</u>: Représentation schématique des éléments régulateurs de l'expression des gènes. Le promoteur du gène a été détaillé. Il contient le promoteur minimal et des séquences régulatrices proximales répressives URS (Upstream Repressing Sequence) et/ou activatrices UAS (Upstream Activating Sequence). Tous les éléments représentés au niveau du promoteur minimal n'apparaissent pas dans tous les promoteurs. Aucun n'est universel. On distingue la boîte TATA, l'élément BRE<sup>4</sup> (élément de réponse à TFIIB en amont de la boîte TATA), l'élément de réponse à TFIIB en aval de la boîte TATA), l'élément MTE (Motif Ten Element), l'élément DPE (Downstream Promoter Element) et l'élément DCE (Downstream Core Element). Sont également représentées au niveau de la chromatine les séquences régulatrices distales.

#### (i) La boîte TATA

La boîte TATA, également connu sous le nom de boîte Hogness après sa découverte en 1979, a été le premier élément du promoteur minimal des gènes codant pour les protéines à être identifié chez les eucaryotes (Breathnach and Chambon, 1981; Gannon et al., 1979). Chez les métazoaires, la boîte TATA, dont la séquence consensus est T-A-T-A-(A/T)-A-(A/T) se situe à une trentaine de paires de bases en amont du site d'initiation. Il apparaît que TBP (pour *TATA Binding Protein*) est la protéine prédominante de liaison à la boîte TATA, mais il est important de noter qu'il existe aussi d'autres protéines capables de lier la boîte TATA et très proches de TBP appelées TRFs (pour *TBP-Related Factors*) (pour une revue (Berk, 2000)). La reconnaissance de la boîte TATA par ces protéines permet alors le recrutement de la machinerie de base de la transcription au niveau du promoteur. De plus, TBP se fixant sur la boîte TATA de façon polaire, l'orientation de cette dernière semble influencer le sens de la transcription (O'Shea-Greenfield and Smale, 1992).

#### (ii) L'initiateur (Inr)

L'initiateur entoure le site d'initiation de la transcription et semble être l'élément du promoteur minimal le plus souvent présent. Il s'agit d'un motif riche en pyrimidine dont la séquence consensus dans les cellules de mammifères est  $(C/T)-(C/T)-A_{+1}-N-(T/A)-(C/T)-(C/T)$  (Lo and Smale, 1996), où l'adénine est le TSS. De nombreuses protéines semblent se fixer à l'initiateur. C'est le cas notamment des facteurs associés à TBP (TAF pour *TBP Associated Factor*) TAF1 et TAF2 qui contribuent au recrutement du facteur TFIID au niveau du promoteur (Chalkley and Verrijzer, 1999). Deux autres protéines TFII-I et YY-1 ainsi que l'ARN Pol II sont également capables de se lier à ce motif (Carcamo et al., 1991; Roy et al., 1991; Usheva and Shenk, 1994). Remplissant une fonction similaire à la boîte TATA, l'initiateur est aussi bien retrouvé dans les promoteurs minimaux contenant cet élément que dans ceux qui en sont dépourvus. Il permet donc notamment la transcription des gènes ne contenant pas de boîte TATA.

#### (iii) Les éléments de reconnaissance de TFIIB ou BRE

On compte aujourd'hui deux éléments de reconnaissance au facteur de transcription TFIIB qui flanquent la boîte TATA. L'un est situé en amont de celle-ci, il est appelé BRE<sup>u</sup> (pour *BRE upstream of the TATA box*), et l'autre en aval, BRE<sup>d</sup> (pour *BRE downstream of the TATA box*). BRE<sup>u</sup> est le premier à avoir été identifié. Il se trouve à environ 35 pb en amont du TSS et sa séquence consensus est (G/C)-(G/C)-(G/A)-C-G-C-C (tout de suite suivie par le premier 5'T de la boîte TATA) (Lagrange et al., 1998). Identifié récemment, BRE<sup>d</sup> est localisé à une vingtaine de paires de bases du TSS et affiche la séquence consensus (G/A)-T-(T/G/A)-(T/G)-(G/T)-(T/G) (où le premier nucléotide est immédiatement précédé de la dernière base de la boîte TATA) (Deng and Roberts, 2005). Ces deux éléments sont indépendants l'un de l'autre et, suivant le contexte, peuvent influencer positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle (Deng and Roberts, 2005; Evans et al., 2001).

#### (iv) L'élément DPE

L'élément DPE est situé précisément du nucléotide +28 au nucléotide +32 par rapport à l'adénine +1 de l'Inr dont il est dépendant. En effet, tous les promoteurs connus à ce jour contenant ce motif ont montré un espacement identique entre les éléments DPE et Inr (Kutach and Kadonaga, 2000). Sa séquence consensus est admise comme étant ( $A/G_{+28}$ )-G-(A/T)- (C/T)-(G/A/C). Enfin, il est essentiellement retrouvé dans les promoteurs dépourvus de boîte TATA sur lesquels il favorise le recrutement de TFIID par le biais des protéines TAF6 et TAF9 (Shao et al., 2005).

#### (v) L'élément MTE

L'analyse informatique de séquences de promoteurs minimaux chez la drosophile a révélé la présence de quatre motifs répartis autour du TSS. Ces motifs sont la boîte TATA (« motif 3 »), Inr (« motif 4 »), DPE (« motif 9 ») et une nouvelle séquence appelée motif 10 ou MTE (pour *Motif Ten Element*) (Ohler et al., 2002). L'élément MTE, conservé chez les mammifères, est retrouvé de la base +18 à la base +29 par rapport au TSS avec la séquence consensus C-(G/C)-A-(A/G)-C-(G/C)-(G/C)-A-A-C-G-(G/C). Le MTE présente des caractéristiques similaires au DPE. Il est essentiellement présent dans les promoteurs dépourvus de boîte TATA et il nécessite un espacement précis avec l'initiateur dont il est également dépendant. Cependant, si cet élément agit indépendamment du DPE et de la boîte TATA, il peut agir en synergie avec ces motifs. Enfin, il semblerait que le MTE joue un rôle dans la liaison du facteur TFIID au promoteur (Lim et al., 2004).

#### (vi) L'élément DCE

Identifié dans le gène humain de la  $\beta$ -globine, l'élément DCE s'étend du nucléotide +10 au nucléotide +45 (Lewis et al., 2000). Il est en fait constitué de trois régions, ou souséléments, situés de +13 à +15, de +22 à +24 et de +31 à +33. L'élément DCE a été retrouvé dans des promoteurs possédant une boîte TATA non consensuelle, de séquence C-A-T-A, et un élément initiateur avec lesquelles il opère en synergie. Néanmoins, le DCE apparaît aussi dans des promoteurs dépourvus de boîte TATA. Dans les deux cas, il semblerait contribuer à l'activité transcriptionnelle et à la liaison de TFIID.

Il n'existe pas d'élément du promoteur minimal qui soit présent au niveau de tous les gènes. La boîte TATA par exemple, qui a longtemps été considérée comme étant un caractère universel des promoteurs minimaux, n'apparaît en fait que dans moins de 10% des promoteurs de gène de classe II chez l'homme (FitzGerald et al., 2004). La présence ou l'absence de ces motifs va dicter les différentes propriétés d'un promoteur minimal donné. Ils seront en effet responsables de la liaison et du contrôle de l'assemblage du complexe de pré-initiation incluant l'ARN Pol II et les facteurs généraux de transcription. Ils définiront la

position du TSS et le sens de la transcription. Enfin, ils répondront aux protéines régulatrices se fixant sur les éléments régulateurs proximaux ou distaux du gène (pour une revue (Muller et al., 2007)). Ainsi, le promoteur minimal fait partie intégrante du système de régulation de l'expression des gènes employé par la cellule.

#### b) Les éléments de régulation

En complément du promoteur minimal, les gènes possèdent des séquences régulatrices qui leur sont propres et qui autorisent le contrôle de leur expression par des protéines régulatrices. Ces séquences permettent notamment d'adapter le niveau d'activité d'un gène aux besoins physiologiques et à l'état de différenciation des cellules.

Les éléments de régulation ont été classés en deux types, selon leur distance par rapport au site d'initiation de la transcription : les séquences régulatrices proximales et les séquences régulatrices distales.

#### (i) Les séquences régulatrices proximales

La région située immédiatement en amont du promoteur minimal (de la base -50 à la base -200 environ par rapport au TSS) comprend souvent de multiples sites de reconnaissance spécifiques de facteurs de transcription tels que Sp1, NF-I (pour *Nuclear Factor I*) ou NF-Y (pour *Nuclear Factor Y*). Selon la protéine qui reconnaît ces sites, les séquences proximales peuvent avoir un effet activateur, alors appelées UAS (pour *Upstream Activating Sequence*), ou répresseur, les URS (pour *Upstream Repressing Sequence*). Plusieurs motifs sont maintenant bien caractérisés comme les boîtes CCAAT, sur lesquelles se fixent les activateurs transcriptionnels C/EBP (pour *CCAAT/Enhancer Binding Protein*) (pour une revue (Ramji and Foka, 2002)), CTF (pour *CCAAT box binding Transcription Factor*, également appelés NF-I) (Jones et al., 1987) et CBF (pour *CCAAT box binding Factor*, également appelés NF-Y) (Dorn et al., 1987). Il existe également une région riche en GC, appelée îlots CpG, qui est notamment reconnue par l'activateur Sp1 et permet ainsi de recruter la machinerie de base de la transcription. Ce dernier motif est essentiellement présent au niveau des gènes de ménage, gènes transcrits dans toutes les cellules, et principalement dans les promoteurs dépourvus de boîte TATA et d'élément DPE (Blake et al., 1990; Brandeis et al., 1994).
### (ii) Les séquences régulatrices distales

Il existe, chez les eucaryotes, deux types d'éléments régulateurs distaux : les « enhancer », lorsqu'ils ont un rôle activateur, et les « silencer » lorsqu'ils répriment la transcription. Ces séquences peuvent être situées en amont ou en aval du site d'initiation, aussi bien au niveau des exons que des introns, et peuvent exercer leur influence sur des distances allant jusqu'à 80 kilobases (kb) du TSS (Jack et al., 1991). Ils sont généralement composés de copies multiples de séquences sur lesquelles se lient des protéines de régulations qui collaborent avec les facteurs liés au promoteur pour définir l'état actif ou inactif du gène. Cependant, les protéines régulatrices et les facteurs de transcription étant séparés de plusieurs kilobases, la cellule a du développer un mécanisme pour permettre leur interaction. Trois hypothèses ont été proposées. Selon le modèle appelé « looping », des facteurs liés à l'enhancer pourraient reconnaître une protéine fixée sur le promoteur, formant ainsi une boucle au niveau de l'ADN. Le modèle désigné sous le nom de « tracking » propose qu'un facteur lié à l'enhancer puisse parcourir l'ADN jusqu'à trouver le facteur de transcription. Le dernier modèle, qualifiée de « spreading/looping », suggère qu'un ensemble de facteurs puissent organiser l'ADN en une série de boucles afin de rapprocher promoteur et enhancer (pour une revue (Bondarenko et al., 2003)) (Fig.6).



<u>Figure 6</u>: Trois types de mécanismes proposés pour expliquer l'action des séquences régulatrices distales à distance, d'après (Bondarenko et al., 2003). Les flèches grises indiquent les directions employées par la protéine régulatrice pour parvenir à établir la communication avec les facteurs se liant au promoteur. La fixation d'une protéine au niveau du promoteur

n'est néanmoins pas toujours nécessaire pour l'action de la séquence régulatrice. En effet, les facteurs de transcription peuvent être d'abord recrutés par ces motifs de régulations avant de reconnaître le promoteur (voir paragraphe suivant). Modèle du « looping » : la protéine régulatrice se fixe directement au facteur de transcription lié au promoteur grâce à la courbure de la chromatine. Modèle du « tracking » : la protéine régulatrice scanne l'ADN jusqu'à rencontrer le facteur de transcription. Modèle du « spreading/looping » : la protéine régulatrice se lie directement ou via une protéine de liaison à une autre protéine régulatrice située en aval sur la chromatine. Ceci provoque une réaction en chaîne où les interactions protéine-protéine se succèdent, aidées encore une fois par la courbure de la chromatine.

Mais certains facteurs généraux de transcription, ainsi que l'ARN Pol II, ont également été retrouvés fixés au niveau de l'enhancer. Dans ce cas, le complexe de préinitiation se formerait en premier lieu sur la séquence régulatrice distale avant d'être amené à reconnaître le promoteur par un mécanisme de courbure de l'ADN par exemple (pour une revue (Szutorisz et al., 2005)).

D'autres processus que le contact direct entre protéines décrit ci-dessus peuvent avoir lieu pour permettre la régulation de la transcription par les enhancer ou les silencer (pour une revue (Blackwood and Kadonaga, 1998)). Ces séquences peuvent en effet être la cible de protéines dotées d'une activité enzymatique leur permettant de modifier covalemment diverses protéines telles que les facteurs de transcription, et de changer ainsi leurs propriétés. Ces mêmes modifications peuvent également avoir lieu au niveau des histones et altérer la structure de la chromatine, rendant certaines régions plus ou moins accessibles à d'autres cofacteurs (cette notion de dynamique de la structure chromatinienne sera développée dans le chapitre III de ce manuscrit). D'autres protéines sont également capable de modifier la mobilité des nucléosomes pour, ici encore, contrôler l'accessibilité de certains sites au niveau de l'ADN. Le niveau de torsion de la double hélice d'ADN peut aussi varier sous l'influence de protéines régulatrices se fixant aux séquences régulatrices distales. Enfin, les domaines de régulation pourraient induire la relocalisation du gène dans une région du noyau riche en facteurs déstabilisants pour la compaction de la chromatine, et entraîner l'activation de la transcription du gène (pour une revue (Akhtar and Gasser, 2007)).

Afin d'éviter que l'influence d'une séquence régulatrice distale ne s'étende au-delà du locus ou de l'ensemble de promoteurs qu'elle doit réguler, il existe entre les gènes des séquences d'ADN appelées isolateurs, reconnues par des complexes protéiques jouant le rôle de barrières (pour une revue (Kuhn and Geyer, 2003)).

# 2. Les principaux acteurs de l'initiation de la transcription et l'assemblage du complexe de préinitiation (PIC)

### a) L'ARN polymerase II (ARN Pol II)

L'ARN polymérase II constitue la sous-unité catalytique du complexe de pré-initiation (PIC) responsable de la synthèse de l'ARN. De par le rôle primordial de l'enzyme au sein de la cellule, la composition et la structure de l'ARN Pol II ont été relativement conservées entre les espèces. Il s'agit en fait d'un complexe multiprotéique d'environ 0,5 MDa composé de 12 sous-unités chez l'homme (Young, 1991). Nommées de RPB1 (pour *RNA Polymerase B 1*) pour la plus grande (220 kDa) à RPB12 pour la plus petite (10 kDa), cinq de ces douze sous-unités, RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 et RPB12, sont également partagées par les ARN polymérases I et III.

Plusieurs études génétiques et biochimiques ont permis d'attribuer des rôles aux sousunités de l'ARN Pol II. Les sous-unités RPB1 et RPB2 par exemple forment le centre catalytique de l'enzyme (Coulombe and Burton, 1999) tandis que RPB4 et RPB7 semblent pouvoir former un sous-complexe dissociable du reste de l'enzyme (Maillet et al., 1999). Mais c'est surtout la détermination de la structure cristallographique de l'ARN Pol II libre (Cramer et al., 2001) et en élongation (Gnatt et al., 2001) qui a permis de mieux comprendre le mécanisme de la transcription. Les différents domaines ou modules ainsi identifiés ont été renommés selon leur localisation ou leur fonction présumée (Fig.7). Une mâchoire supérieure (une partie de RPB1 et RPB9) et une mâchoire inférieure (RPB5) bordent l'entrée du sillon (RPB1) au fond duquel se retrouvent deux ions Mg<sup>2+</sup> qui indiquent l'emplacement du site actif. Les acides nucléiques prendraient place dans ce sillon où sont localisés la majorité des charges positives de l'enzyme. Près du site actif, une hélice de RPB1, l'hélice de pontage, traverse le sillon et rejoint RPB2. Cette hélice serait impliquée dans la translocation de l'enzyme le long de l'ADN lors de l'élongation. Près du site catalytique, se trouve un pore qui s'étend du fond du sillon jusqu'à l'arrière de l'enzyme. Celui-ci servirait à l'entrée des rNTPs (riboNucléotides TriPhosphates) vers le site actif. Les structures de la polymérase libre (Fig.7.A) et en association avec le duplex ADN-ARN (Fig.7.B) diffèrent principalement au niveau de la position d'une structure mobile appelée pince ou *clamp*, formée de parties de RPB1 et RPB2. La pince peut effectuer une rotation de 30° pour fermer le sillon et retenir la matrice d'ADN et le transcrit au sein du complexe transcriptionnel afin de permettre une élongation efficace.



<u>Figure 7</u>: Structure cristallographique de l'ARN polymérase II. A. *Enzyme libre à une résolution de 2,8 Å. Chaque module est représenté par une couleur (Cramer et al., 2001).* B. *Enzyme en élongation à une résolution de 3,3 Å. Des flèches indiquent les sites d'entrée et de sortie de l'ADN. Le code de couleur des domaines de l'enzyme est le même qu'en (A) (Gnatt et al., 2001).* 

L'une des caractéristiques importantes de l'ARN Pol II est également la répétition de l'heptapeptide Y-S-P-T-S-P-S qui constitue le domaine C-terminal (CTD pour *Carboxy-Terminal Domain*) de sa plus grande sous-unité. On compte ainsi 52 fois ce motif chez les mammifères. Affichant cinq cibles de phosphorylation, la tyrosine (Y), la thréonine (T) et les sérines (S), ce domaine peut être hautement phosphorylé par divers kinases, et en particulier

les kinases dépendantes des cyclines (CDK) (Palancade and Bensaude, 2003). Suivant son degré de phosphorylation, le domaine CTD pourra recruter de nombreux facteurs tels que les facteurs de maturation de l'ARN ou les facteurs d'élongation et de terminaison de la transcription, et ainsi contribuer au bon déroulement de la transcription (pour une revue (Meinhart et al., 2005)).

Mais l'ARN Pol II n'est pas capable de reconnaître seule le promoteur puis de démarrer la synthèse d'ARN. L'initiation de la transcription nécessite la présence de facteurs auxiliaires appelés facteurs généraux de la transcription.

#### b) Les facteurs généraux de la transcription (GTF)

Les facteurs généraux de la transcription (GTF) ont été appelés ainsi car ils semblent indispensables à la transcription de tous les gènes transcrits par l'ARN Pol II *in vitro* à partir promoteur AdMLP (pour *Adenovirus Major Late Promoter*). Au contraire, d'autres facteurs de transcription tels que les récepteurs nucléaires ne se fixent qu'à des sites spécifiques de certains gènes particuliers. Les GTFs sont au nombre de six dans les cellules eucaryotes : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH (Orphanides et al., 1996). Parmi eux, certains favorisent l'interaction entre l'ADN et la polymérase car ils reconnaissent des séquences consensus du promoteur, tandis que d'autres ouvrent la double hélice au site d'initiation. Tous opèrent sous la forme d'un complexe, dont l'assemblage est encore sujet à controverses, appelé complexe de pré-initiation (PIC).

#### (i) TFIID

TFIID est le premier facteur général de transcription à se fixer au niveau du promoteur pour permettre l'initiation de l'assemblage du PIC. Par ailleurs, sa sous-unité TBP fut le premier facteur du PIC à avoir été cloné en 1989 (Horikoshi et al., 1989). En plus de TBP, TFIID comprend en fait 14 autres sous-unités appelées TAF et classées de 1 à 15 en fonction, notamment, de leur poids moléculaire (Tableau 1) (Albright and Tjian, 2000; Tora, 2002). Sa structure tridimensionnelle a d'ailleurs été résolue par microscopie électronique et certaines de ses sous-unités immunolocalisées (Leurent et al., 2002; Leurent et al., 2004). TFIID présente ainsi trois lobes reliés notamment par les facteurs TAF1 et TAF5 (Fig.8 : hTFIID).

En outre, contrairement aux composants des autres GTFs qui ne sont codés que par des gènes à copie unique, les éléments de TFIID ont souvent des paralogues qui offrent à la

cellule la	possibilité	de moduler	la con	nposition	du	complexe	en	fonction	du	contexte	spatial
et dévelo	ppemental o	dans lequel e	lle se t	rouve.							

			C. elegans	(ce)		
Nouveau non	n H. sapiens (hs)	D. melanogaster (dm)	précédent nom	nouveau nom	S. cerevisiae (sc)	S. pombe (sp)
TAF1	TAF <sub>II</sub> 250	TAF <sub>II</sub> 230	taf-1 (W04A8.7)	taf-1	Taf145/130	TAF <sub>II</sub> 111
TAF2	$TAF_{II}$ 150	$TAF_{II}$ 150	taf-2 (Y37F11B.4)	taf-2	Taf150 or TSM1	(T38673)
TAF3	TAF <sub>II</sub> 140	TAF <sub>II</sub> 155 or BIP2	(C11G6.1)	taf-3	Taf47	
TAF4	TAF <sub>II</sub> 130/135	$TAF_{II}$ 110	taf-5 (R119.6)	taf-4	Taf48 or MPT1	(T50183)
TAF4b	TAF <sub>II</sub> 105					
TAF5	TAF <sub>II</sub> 100	TAF <sub>II</sub> 80	taf-4 (F30F8.8)	taf-5	Taf90	$TAF_{II}72$
TAF5b	_	_				$TAF_{II}73$
TAF5L	PAF65β	Cannonball				-
TAF6	TAF <sub>II</sub> 80	TAF <sub>II</sub> 60	taf-3.1 (W09B6.2)	taf-6.1	Taf60	(CAA20756)
TAF6L	PAF65a	(AAF52013)	taf-3.2 (Y37E11AL.8)	taf-6.2		
TAF7	TAF <sub>II</sub> 55	(AAF54162)	taf-8.1 (F54F7.1)	taf-7.1	Taf67	TAFn62/PTR6
TAF7L	TAF2Q	. ,	taf-8.2 (Y111B2A.16)	taf-7.2		<b>n</b> ,
TAF8	(BAB71460)	Prodos	(ZK1320.12)	taf-8	Taf65	(T40895)
TAF9	TAF <sub>11</sub> 32/31	$TAF_{II}40$	taf-10 (T12D8.7)	taf-9	Taf17	(\$62536)
TAF9L	TAF <sub>11</sub> 31L (AAG09711)					
TAF10	TAF <sub>11</sub> 30	TAF <sub>II</sub> 24	taf-11 (K03B4.3)	taf-10	Taf25	(T39928)
TAF10b		TAF <sub>u</sub> 16		,		. ,
TAF11	TAF <sub>n</sub> 28	ΤΑF <sub>π</sub> 30β	taf-7.1 (F48D6.1)	taf-11.1	Taf40	(CAA93543)
TAF11L	n		taf-7.2 (K10D3.3)	taf-11.2		,
TAF12	TAF <sub>11</sub> 20/15	$TAF_{II}30\alpha$	taf-9 (Y56A4.3)	taf-12	Taf61/68	(T37702)
TAF13	TAF <sub>n</sub> 18	(AAF53875)	taf-6 (C14A4.10)	taf-13	Taf19 or FUN81	(CAA19300)
TAF14		. ,		<i>.</i>	Taf30	, ,
TAF15	TAF <sub>II</sub> 68					
			B-TFIID			
BTAF1	TAF <sub>II</sub> 170/TAF-172	Hel89B	(F15D4.1)	btaf-1	Mot1	(T40642)

<u>Tableau 1</u>: Nouvelle nomenclature des TAFs associés à TFIID chez *H. sapiens* et de leurs orthologues connus chez d'autres modèles (Tora, 2002). *Notez que TAF9L est aujourd'hui appelé TAF9b (Frontini et al., 2005).* 

#### TBP (TATA Binding Protein) et ses homologues

Dotée d'un rôle crucial pour l'initiation de la transcription de nombreux gènes, TBP est l'une des protéines les mieux conservées au cours de l'évolution, et plus particulièrement sa partie carboxyterminale (Hernandez, 1993). Celle-ci lui confère une structure tridimensionnelle en forme de selle à cheval avec une face concave qui interagit avec l'ADN et une face convexe qui interagit avec les TAFs (Kim et al., 1993). TBP est la première protéine à se fixer à l'ADN lors de l'initiation de la transcription. Sa liaison sur la boîte TATA, au niveau du petit sillon de l'ADN, impose une très forte courbure de la double hélice, repliant significativement le grand sillon sur lui-même (Nikolov et al., 1995).

Longtemps considéré comme un facteur de transcription universel, la recherche d'homologues de TBP sur les bases de données a révélé l'existence de deux nouvelles familles de gène chez les métazoaires codant pour des facteurs apparentés à TBP. On compte ainsi aujourd'hui TLF (pour *TBP-Like Factor*), également appelé TRF2 (pour *TBP-Related Factor 2*) ou TLP (pour *TBP-Like Protein*) (pour une revue (Dantonel et al., 1999)), et un

second ensemble de gènes comprenant TRF1, spécifique de la drosophile, et TRF3 aussi appelé TBP2 (pour une revue (Davidson, 2003)). TLF n'est pas nécessaire au développement chez les mammifères, mais se révèle indispensable à la spermatogenèse (Martianov et al., 2002). TRF1 quant à lui est voué à deux rôles majeurs. Il assure d'une part l'expression d'une famille de gènes dont *Tudor* (Holmes and Tjian, 2000), et d'autre part semble directement impliqué dans l'initiation de la transcription par l'ARN Pol III chez la drosophile (Takada et al., 2000). Enfin, TBP2 diffère principalement de TBP dans son domaine N-terminal, domaine impliqué dans le processus de défense immunitaire du placenta (Hobbs et al., 2002). D'autre part, il semble être indispensable pour le développement des oocytes chez la souris (Gazdag et al., 2007).

S'il a été montré que TBP soit suffisant pour initier une transcription basale in vitro, il est cependant incapable de répondre à une activation de la transcription par des protéines régulatrices fixées sur les enhancer (Pugh and Tjian, 1990). Il nécessite pour cela la fixation des TAFs.

## Les TAFs (TBP Associated Factors)

Les TAFs sont les principaux partenaires de TBP. Sans eux, l'initiation de la transcription déclenchée par un activateur dans un système reconstitué est très limitée (Verrijzer and Tjian, 1996). Mais les TAF semblent également remplir d'autres fonctions telles que la modulation de la condensation de la chromatine ou le contrôle du cycle cellulaire.

En effet, la sous-unité TAF1, par exemple, catalyse les réactions d'acétylation et de phosphorylation notamment au niveau des histones (Maile et al., 2004; Mizzen et al., 1996). Or ce type de modification favorise généralement l'ouverture de la chromatine afin de rendre l'ADN accessible aux facteurs de transcription. Ces modifications ayant été observées dans des régions de chromatine transcriptionnellement active, TAF1 pourrait de cette façon activer la transcription. Mais TAF1 semble également pouvoir modifier les facteurs TFIIE et TFIIF (Imhof et al., 1997; O'Brien and Tjian, 1998), ce qui lui conférerait une fonction de relais du signal d'activation aux autres GTFs. Enfin, TAF1 est douée d'une activité de mono-ubiquitination envers l'histone H1 qui s'avère être associée à une activation de la transcription (Pham and Sauer, 2000).

Plusieurs TAFs ont aussi été impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (pour une revue (Davidson et al., 2005)). Ainsi, une mutation dans le gène de TAF1 provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (Sekiguchi et al., 1991). Des mutations au niveau de TAF2

provoquent un arrêt du cycle en G2/M (Martin et al., 1999). L'inactivation de TAF5 chez la levure conduit également à l'arrêt du cycle en G2/M (Apone et al., 1996) tandis que l'inactivation de TAF9 dans des cellules de poulet provoque l'arrêt du cycle cellulaire puis l'apoptose (Chen and Manley, 2000). Finalement, différentes mutations thermosensibles de TAF10 chez la levure ont montré un arrêt du cycle aux phases G1 ou G2/M (Kirschner et al., 2002). Ces derniers résultats ont plus tard été confirmés chez les mammifères (Metzger et al., 1999).

En outre, l'analyse de l'organisation moléculaire de TFIID a révélé que plus de la moitié des TAFs (9 sur 13 TAFs humains) contiennent un repliement de type histone et qu'ils s'assemblent en cinq paires selon ce même repliement (Tableau 2) (Hoffmann et al., 1996). Le repliement de type histone est un motif d'interaction fondamental impliqué dans l'hétérodimérisation des histones nucléosomiques, H4 et H3, H2A et H2B, ainsi que dans leur assemblage en octamère pour former les nucléosomes (Arents et al., 1991). Le motif minimum pour l'« *Histone Fold Domain* » (HFD) comprend trois hélices,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , séparées par deux boucles, L1 et L2. De plus, la découverte que certains hétérodimères pouvaient s'assembler en structures supérieures laisse envisager un assemblage des HFD-TAFs en structures de type nucléosomique au sein des différents lobes de TFIID (Tableau 2 et Fig.8) (Leurent et al., 2002).

Caractéristiques structurales	hTFIID (avec TBP)	hTFTC (sans TBP)	Implication dans le	
HAT et Bromodomaines	(avec TBI)	(3413 101)	Arrêt en G1/S	
HAT et Dromodomames	<u> </u>		Arrêt en G2/M	
HFD	TAF 2 TAF 3	TAF 3		
HFD (H2A)	TAF4	-		
	TAF 5	TAF 5L	Arrêt G2/M	
HFD (H4)	TAF 6	TAF 6L		
	TAF 7	-		
HFD	TAF 8	-		
HFD (H3)	TAF 9	TAF9		
HFD	<b>TAF 10</b>	<b>TAF 10</b>	Arrêt en G1/S	
HFD	<b>TAF 11</b>	-		
HFD (H2B)	<b>TAF12</b>	TAF12		
<b>HFD</b> ( <b>H4</b> )	<b>TAF 13</b>	-		
	TBP	-		
HAT, Bromodomaines, HFD	-	Protéines de la famille ADA		
HFD, Bromodomaines		Protéines de la famille SPT		
		Autres protéines		

<u>Tableau 2</u>: Composition biochimique des complexes hTFIID et hTFTC. Les caractéristiques structurales et implications dans le cycle cellulaire connues pour chaque sous-unité sont répertoriées. Les paires de TAFs contenant un HFD (Histone Fold Domain) sont associées à un code de couleur et les histones homologues sont entre parenthèses. HAT=Histone-acétyltransférase ; ADA=adaptator ; SPT=Suppressor of Ty.

De surcroît, il existe certains paralogues de TAFs, affichant une forte similarité aux TAFs « originaires », généralement exprimés spécifiquement selon le type cellulaire. Chez la drosophile, au moins cinq paralogues de TAFs ont ainsi été décrits comme étant spécifiques des cellules germinales mâles et nécessaires pour la spermatogenèse (Hiller et al., 2004). Chez les mammifères, l'expression de TAF7L est également spécifique des cellules germinales mâles (Pointud et al., 2003). TAF4b joue lui un rôle dans la fertilité mâle et femelle (Falender et al., 2005). TAF9b par contre montre un profil d'expression plus large et partage certaines de ses fonctions avec son paralogue TAF9 tout en se distinguant par les gènes qu'il régule (Frontini et al., 2005).

## Les différents complexes contenant des TAFs

La diversité des facteurs de type TBP ou TAF permet aux cellules eucaryotiques de former plusieurs sortes de complexes TFIID variant aussi bien dans leur composition que dans leur fonction (Fig.8) (Muller and Tora, 2004). Une cellule humaine peut par exemple contenir des complexes TFIID incluant ou non la sous-unité TAF10 et se distinguant par leurs propriétés fonctionnelles (Jacq et al., 1994). D'autres complexes sont spécifiques d'un type cellulaire. C'est le cas de TFIID comprenant la sous-unité TAF4b qui est retrouvé dans les lymphocytes B (Dikstein et al., 1996b), ou de TFIID contenant les sous-unités TAF1L et TAF7L, impliqué dans la spermatogenèse (Pointud et al., 2003). Un dernier exemple est celui d'un complexe TFIID, essentiellement présent dans les cellules apoptotiques, dans lequel la sous-unité TAF6 a été remplacée par son variant TAF68, résultant d'un épissage alternatif, et où la sous-unité TAF9 est absente (Bell et al., 2001).

Par ailleurs, les TAFs entrent aussi dans la composition d'autres complexes dépourvus de la protéine TBP et intervenant dans la régulation de l'expression des gènes. On recense ainsi les complexes SAGA chez la levure (pour *Spt-Ada-Gcn5 Acetylase coactivator complex*) (Grant et al., 1998), TFTC (pour *TBP-Free TAF-Containing complex*) (Tableau 1) (Wieczorek et al., 1998), PCAF (pour *P300/CREB-Binding Protein Associated Factor complex*) (Ogryzko et al., 1998) et STAGA (pour *SPT3-TAF9-GCN5 containing complex*) dans les cellules de mammifère (Martinez et al., 1998). Tous ces complexes contiennent des homologues de l'histone-acétyltransférase (HAT) GCN5 (pour *General Control Nonrepressed 5*), de même que des protéines de type SPT et ADA, la protéine de 400 kDa TRRAP (pour *Transformation/tRanscription domain-Associated Protein*) et, bien sûr, plusieurs TAFs. TFTC est structurellement similaire à TFIID (Brand et al., 1999; Timmers

and Tora, 2005), et, bien qu'il soit exempt de TBP, est capable de remplacer TFIID sur un promoteur contenant ou non la boîte TATA *in vitro* (Wieczorek et al., 1998). De plus, grâce à son activité HAT, TFTC facilite la réparation de lésions d'ADN par excision de nucléotides (Brand et al., 2001).



<u>Figure 8</u>: Représentation schématique de divers complexes TFIID, d'après (Muller and Tora, 2004). Des complexes TFIID sont retrouvés dans des tissus particuliers ainsi que dans des processus cellulaires déterminés (détaillés dans le texte). La flèche représente l'élément initiateur au niveau du promoteur.

La récente identification d'une nouvelle sous-unité ATXN7 (pour *ATaXiN-7*) au sein de TFTC (Helmlinger et al., 2004) confère à ce complexe un rôle supplémentaire. L'expansion de répétitions CAG dans le gène SCA7 (pour *SpinoCerebellar Ataxia type 7*) qui code pour ATXN7 conduit à une élongation d'une portion polyglutamine (polyQ) de la protéine. Cette mutation est la cause d'une maladie neurodégénérative héréditaire: l'ataxie spinocérébelleuse de type 7. Un symptôme caractéristique de cette forme de maladie est la baisse de l'acuité visuelle qui peut parfois aller jusqu'à la cécité. Aussi, dans un travail auquel j'ai collaboré, il a été démontré que la présence, au sein du complexe TFTC, d'une protéine ATXN7 contenant une expansion polyQ est responsable de la dérégulation du complexe (publication jointe à ce manuscrit en annexe ) (Helmlinger et al., 2006). Son recrutement est alors augmenté au niveau de gènes spécifiques des photorécepteurs, ce qui inhibe leur transcription et provoque une perte de fonction des photorécepteurs de la rétine chez la souris.

Cependant, de récentes données tendent à prouver que la préparation conduisant à l'obtention de TFTC contiendrait en fait un mélange de plusieurs complexes contenant TAF10 dont TFTC, STAGA, SMAT (pour *Small TAF complex*) (Demeny et al., 2007) et un « complexe à 7 TAFs » (ou 7 TAFs Complex) (Nagy and Tora, 2007).

# (ii) TFIIA

Parce qu'il n'est pas nécessaire pour l'assemblage du PIC mais qu'il s'y lie de façon stable, TFIIA est un facteur général de transcription particulier. Il est constitué de 3 sousunités chez l'homme ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) et sa liaison à TBP est mutuellement exclusive avec la fixation de protéines de régulation négative. En effet, TFIIA empêche l'action des facteurs TAF1 et MOT1, qui interfèrent dans la liaison de TBP à la boîte TATA chez la drosophile (Liu et al., 1998) ou en provoquent la dissociation chez la levure (Kokubo et al., 1998). Il chasse également le répresseur NC2 et le complexe NOT responsables de l'inactivation du complexe TBP/ADN et de l'interruption de l'assemblage du PIC. Tout ceci stabilise la liaison de TBP à l'ADN et rend TFIIA particulièrement important pour la transcription basale à partir de promoteurs contenant une boîte TATA non consensuelle (Pugh, 2000).

#### (iii) TFIIB

TFIIB a ceci en commun avec TFIID qu'il peut lier directement l'ADN grâce à son domaine N-terminal qui se fixe sur ses sites de reconnaissance : les motif BRE<sup>u</sup> et BRE<sup>d</sup> (si l'un d'eux est toutefois présent). Il est formé d'une seule sous-unité d'environ 35 kDa chez l'homme qui interagit par son extrémité C-terminale avec le complexe préformé ARN Pol II/TFIIF afin de permettre l'entrée de ces deux éléments essentiels dans le PIC. Tout comme TFIIA, TFIIB stabilise le complexe TBP/ADN en se liant à TBP, mais est aussi le premier élément du PIC à réellement orienter la transcription (pour une revue (Deng and Roberts, 2007)). Enfin, il a été démontré que TFIIB peut adopter deux conformations différentes influençant son rôle au sein du PIC et modulant sa réponse aux activateurs de transcription (Elsby and Roberts, 2004).

## (iv) TFIIE

Formé de deux sous-unités qui forment un hétérotétramère, TFIIE s'intègre au complexe de pré-initiation en reconnaissant l'ARN Pol II, TBP et TFIIF, juste en aval du TSS

(Zawel and Reinberg, 1993). Il est chargé d'y recruter à son tour TFIIH et de moduler l'activité kinase et hélicase de ce dernier (Martinez, 2002). TFIIE semble alors également requis pour l'ouverture de la double hélice au site d'initiation et le passage de l'ARN Pol II en « mode élongation » (Watanabe et al., 2003).

### (v) TFIIF

TFIIF est formé de deux sous-unités de 30 et 74 kDa : respectivement RAP30 et RAP74. Son rôle majeur est d'escorter l'ARN Pol II vers le site d'initiation et de la stabiliser grâce à sa capacité à se lier à l'ADN mais aussi aux facteurs TFIIB et TFIID déjà organisés sur le promoteur (Dubrovskaya et al., 1996). En outre, TFIIF contribuerait à réduire les interactions non-spécifiques de l'ARN Pol II avec l'ADN (Conaway and Conaway, 1993). TFIIF, en collaboration avec TFIIE et TFIIH, semble également impliqué dans l'étape de transition entre l'initiation et l'élongation et réduit la probabilité d'un arrêt prématuré de l'ARN Pol II (Dvir et al., 2001). De même, en restant associé à la polymérase, avec TFIIE et TFIIH, il favorise la ré-initiation de la transcription en évitant à la cellule de devoir former un nouveau PIC (Rani et al., 2004).

#### (vi) TFIIH

TFIIH comprend dix sous-unités divisées en deux sous-complexes : le complexe de base et le complexe CAK (pour *Cyclin-dependent Activating Kinase complex*). Le complexe de base est composé de l'hélicase ATP-dépendante XPB (pour *Xeroderma Pigmentosum B*), et des quatre facteurs p34, p52, p62 et p44. Le complexe CAK quant à lui englobe la kinase cycline-dépendante CDK7 (pour *Cyclin-Dependent Kinase 7*), la cycline H (CycH) et la protéine MAT1 (pour *Ménage À Trois 1*). L'hélicase ATP-dépendante XPD quant à elle lie le complexe de base au complexe CAK (pour une revue (Zurita and Merino, 2003)). Une dixième sous-unité nommée TTDA (pour *TrichoThioDystrophy of complementation group A*) ou p8, orthologue humain de la protéine TFB5 associée à TFIIH dans la levure, a récemment été identifiée (Giglia-Mari et al., 2004).

TFIIH est le dernier facteur à intégrer le complexe de pré-initiation. Ses deux hélicases XPB et XPD, aidées par TFIIE, lui offrent la capacité d'ouvrir la double hélice d'ADN au niveau du site d'initiation de la transcription. La kinase CDK7 associée à la cycline H aura pour fonction de phosphoryler la grande sous-unité RPB1 de l'ARN Pol II, une étape cruciale dans le départ du promoteur de la polymérase et le début de l'élongation (Zurita and Merino,

2003). En outre, TFIIH interagit également avec l'ARNsn U1 impliqué généralement dans l'épissage de l'ARN, mais favorisant ici la formation de la première liaison phosphodiester par l'ARN Pol II (Kwek et al., 2002). Enfin, TFIIH semble participer à la transcription par l'ARN Pol I, même si la nature exacte de son rôle dans ce cas reste encore à déterminer (Iben et al., 2002).

Cependant, TFIIH agit aussi dans la réparation des lésions de l'ADN par excision de nucléotides (NER pour *Nucleotide Excision Repair*) où seul le complexe de base de six sousunités s'avère nécessaire. Ainsi les hélicases XPB et XPD du complexe, préalablement recruté sur le site de la lésion par le facteur XPC-HR23B, permettent l'ouverture de la double hélice, indispensable à la fixation des protéines chargées de la réparation de l'ADN (Riedl et al., 2003). Contrairement aux autres sous-unités de TFIIH, p8 semble être spécifiquement associée à la réparation de l'ADN et n'intervient donc pas dans le mécanisme de transcription (Coin et al., 2006) (Giglia-Mari et al., 2006).

Lorsque ces protéines sont mutées, leur fonction rend TFIIH responsable de trois maladies génétiques chez l'homme : le xeroderma pigmentosum, le syndrome de Cockayne et la trichothiodystrophie. Il s'agit de pathologies sévères qui affectent la peau provoquant une photodermatose, c'est-à-dire des lésions pouvant dégénérer en tumeurs à cause de l'hyperphotosensibilité due aux troubles de la réparation de l'ADN soumis aux rayons ultraviolets (UV). Ce symptôme est aussi parfois associé à des problèmes neurologiques.

De plus, il a récemment été démontré que TFIIH est la cible du virus de la fièvre hémorragique de la vallée du Rift. Ce virus, en produisant une protéine NSs, empêche l'assemblage des sous-unités du complexe et abolit son activité transcriptionnelle afin d'échapper à la réponse de l'hôte (Le May et al., 2004).

La caractéristique principale de TFIIH est donc son aspect multifonctionnelle et plus particulièrement son implication versatile dans des processus complètement distincts.

#### c) L'assemblage du PIC

Le complexe de préinitiation final consiste en un important complexe nucléoprotéique composé de quelques 44 protéines distinctes avec une masse totale d'environ 2,2 MDa (pour une revue (Martinez, 2002)). Deux modèles distincts ont été proposés pour expliquer le mécanisme par lequel ce complexe se forme au niveau du promoteur : le modèle séquentiel et le modèle de l'holoenzyme. À ces deux théories opposées s'ajoute une troisième hypothèse qui tente de les combiner (Fig.9) (Lemon and Tjian, 2000).

#### (*i*) Le modèle séquentiel

Le premier modèle d'assemblage du PIC à avoir été proposé est basé sur les expériences conduisant à la formation d'un complexe de transcription actif *in vitro* (pour une revue (Buratowski, 1994)). Cette théorie suggère que chaque composant de la machinerie basale de la transcription soit ajouté un par un, dans un ordre précis, au niveau du promoteur. TFIID serait alors le premier élément à se fixer sur la matrice d'ADN au niveau de la séquence consensus TATA par sa sous-unité TBP (Fig.9**0**, gauche). Viendrait s'ajouter à ce complexe TFIID-promoteur le facteur TFIIA, puis TFIIB qui permettrait l'ancrage du PIC et l'orientation de la transcription vers le site d'initiation. L'ensemble TFIID-TFIIA-TFIIB (ou DAB) entraînerait ensuite le recrutement de l'ARN Pol II très vite suivie et stabilisée par TFIIF. Puis TFIIE viendrait, à son tour, s'associer au complexe minimal juste avant TFIIH, dernier élément du PIC (Fig.9**0**, gauche). Tous deux permettraient l'ouverture locale de l'ADN et la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II, évènements indispensables pour le passage d'un complexe d'initiation à un complexe d'élongation (Fig.9**0**).

Un tel mécanisme de recrutement des acteurs principaux de la transcription concorde avec le principe de régulation dynamique de l'expression des gènes. En effet, un assemblage par étape permettrait à la cellule d'adapter la composition de la machinerie basale de transcription en fonction des gènes à transcrire en réponse au milieu extérieur. De nombreux facteurs de transcription contenant des TAFs ont par exemple été observés comme étant spécifiquement recrutés lors de la transcription de gènes particuliers (phénomène évoqué en II.A.2.b.i) (Muller and Tora, 2004). De même, si l'on considère les nombreux complexes coactivateurs de la transcription (détaillés en II.A.2.d), aucun d'eux n'est présent de façon universelle dans la machinerie transcriptionnelle.

L'efficacité d'un tel mécanisme d'assemblage est cependant remise en cause lorsque l'on considère la profusion de ces co-facteurs additionnels interagissant avec la machinerie basale et requis pour la régulation de la transcription. Il semblerait effectivement fastidieux pour ces régulateurs de recruter et d'organiser un à un tous les partenaires du PIC dans une certaine limite de temps, et ce, sur chaque promoteur de la cellule. Il serait alors plus efficace pour la cellule de disposer d'une holoenzyme constituée de tous les composants du PIC prête à être réquisitionnée sur le promoteur et à initier la transcription.



<u>Figure 9</u>: Les différents modèles d'assemblage du PIC sur un promoteur contenant une boîte TATA. Les étapes sont décrites en détail dans le texte. L'ordre d'assemblage des GTFs dans le modèle séquentiel est indiqué à coté des flèches. TATA = boîte TATA, +1 = TSS.

# (ii) Le modèle de l'holoenzyme

Plusieurs observations rapportant l'existence de sous-groupes composés de l'ARN Pol II et de certains GTFs ainsi que de quelques co-régulateurs ont conduit à la formulation d'un deuxième modèle d'assemblage du PIC (Ossipow et al., 1995; Parvin et al., 1994). Il propose le recrutement ciblé d'un PIC pré-assemblé qualifié d'holoenzyme (Fig.9**0**, droite). Néanmoins, si cette théorie à l'avantage de reposer sur des données obtenues *in vivo*, elle souffre d'un manque de flexibilité de la composition du PIC, nécessaire à la régulation de l'expression des gènes. En outre, le modèle de l'holoenzyme ne concorde pas avec la démonstration que les complexes d'initiation et d'élongation diffèrent dans leur composition (Reines et al., 1999). Selon le postulat d'un pré-assemblage du PIC, et parce que les ARN polymérases eucaryotes sont processives, la cellule devrait alors recruter de nouvelles holoenzymes sur chaque promoteur pour chaque évènement de ré-initiation (pour une revue (Svejstrup, 2004)).

Aussi, il semblerait que le modèle idéal se situe entre le modèle séquentiel et celui de l'holoenzyme.

#### (iii) Le modèle actuel

Le modèle actuel combine les deux modèles détaillés précédemment. Il semble en effet que certains facteurs de base, mais pas tous, soient associés à l'ARN Pol II avant sa liaison sur le promoteur (pour une revue (Hampsey and Reinberg, 1999)). Ainsi, l'assemblage du PIC aurait lieu en deux étapes au moins, la première étant le recrutement de TFIID ou tout autre complexe contenant des TAFs au niveau du promoteur (Fig.9**0**, gauche) et la deuxième étant la fixation d'un sous-groupe de facteurs et, éventuellement, de co-régulateurs de transcription contenant l'ARN Pol II (Fig.9**2**, centre) (Ranish et al., 1999).

#### d) Le complexe Médiateur et les autres complexes co-activateurs

Alors que l'ARN Pol II et les GTFs sont suffisants pour activer la transcription *in vitro*, des facteurs supplémentaires sont nécessaires pour permettre l'expression des gènes en réponses aux protéines régulatrices fixées plus loin en amont ou en aval du TSS. Ces facteurs ont été regroupés en deux grands groupes : ceux qui interagissent avec l'ARN Pol II ou des composants de la machinerie basale de transcription (pour une revue (Myers and Kornberg, 2000)), et ceux qui affectent la chromatine en modifiant son degré de compaction (pour une revue (Kornberg and Lorch, 1999)). Le premier groupe est représenté par les complexes de type Médiateur chez les mammifères, tandis que le deuxième inclut notamment les ATPases (molécules qui dégradent l'Adénosine TriPhosphate, ATP) de type SWI/SNF (pour *mating-type SWItching/Sucrose Non Fermenting*), ISWI (pour *Imitation SWItch*) ou encore INO80

(pour *INOsitol 80*). Sont classés également dans cette dernière famille les complexes contenant des activités enzymatiques vouées à la modification d'histones telles que les activités histone-acétyltransférases (HAT) ou histone-déacétylases (HDAC). Ce type de complexes sera traité en III.C.2.a.

#### (i) Les complexes de type Médiateur

Le complexe Médiateur a été découvert pour la première fois en 1990 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'agit d'un complexe de poids moléculaire élevé composé de plus de vingt sous-unités réparties dans trois sous-domaines référencés comme les modules de « tête », du « milieu » et de « queue ». Un quatrième module, comprenant des kinases cyclinedépendantes, apparaît dans certains complexes et semble être impliqué dans la répression d'une variété de gènes (pour revues (Conaway et al., 2005) et (Malik and Roeder, 2005)).

À ce jour, plusieurs complexes de type Médiateur ont été isolés chez les mammifères. Le premier à avoir été décrit est, semble-t-il, la forme prédominante du complexe retrouvée dans les extraits nucléaires de cellules humaines. Les sous-unités de ce complexe ont été appelées TRAPs (pour *Thyroid Hormone Receptor-Associated Proteins*) en raison de leur association avec le récepteur aux hormones thyroïdiennes couplé à son ligand. On compte ensuite chez l'homme les complexes PC2 (pour *Positive Cofator 2*), DRIP (pour *vitamin D Receptor-Interacting Proteins*), NAT (pour *Negative Regulator of Activated Transcription*) ou encore ARC (pour *Activator-Recruited Complex*) pour ne citer qu'eux (pour revues (Conaway et al., 2005) et (Malik and Roeder, 2005)). La plupart de ces complexes, tout comme le Médiateur de levure, sont capables de stimuler fortement la transcription soumis à des activateurs *in vitro*.

Les complexes de type Médiateur agiraient sur la transcription en relayant l'information des protéines régulatrices fixées sur les enhancer ou silencer à la machinerie basale de la transcription organisée au niveau du promoteur. Dans ce sens, de nombreuses sous-unités, comme par exemple MED-1, ont montré pouvoir lier le domaine d'activation transcriptionnelle d'activateurs tels que les récepteurs nucléaires tandis que d'autres sont capables de s'attacher à plusieurs sous-unités de l'ARN Pol II dont le domaine CTD de RPB1 (Conaway et al., 2005; Malik and Roeder, 2005). En outre, le Médiateur de levure possède les kinases CDK8 et CDK11 qui peuvent phosphoryler notamment TFIIH et TFIID afin de moduler leurs activités. C'est d'ailleurs à travers la phosphorylation de TFIIH que le Médiateur révèle sa capacité antagoniste à réprimer la transcription (Akoulitchev et al., 2000).

Enfin, en raison de son absolue nécessité pour la transcription basale par l'ARN Pol II chez la levure, le Médiateur a récemment été proposé comme étant un facteur de transcription général, au même rang que l'ARN Pol II ou les autres GTFs (Takagi and Kornberg, 2006).

### (ii) Les co-activateurs ATP-dépendants remodelant la chromatine

D'autres complexes participent à la régulation de la transcription en réponse aux activateurs ou inhibiteurs. Ceux-ci utilisent l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP pour perturber ou réorganiser la structure de la chromatine (pour une revue (Lusser and Kadonaga, 2003)). Ils agissent alors en déstabilisant les contacts histones-ADN afin de repositionner les nucléosomes, de les transférer sur un autre brin d'ADN ou de faciliter l'accès à l'ADN nucléosomal pour les nucléases ; ou ils interviennent dans l'établissement de torsions superhélicales de l'ADN (pour une revue (Flaus and Owen-Hughes, 2001)).

Les histones sont les éléments de base de la chromatine qui, associés en nucléosomes, permettent la compaction de l'ADN. Au sein de la cellules, la chromatine existe principalement sous deux aspects : la chromatine condensée, appelée hétérochromatine, et la chromatine décondensée, ou euchromatine. Les histones peuvent également subir de nombreuses sortes de modifications post-traductionnelles qui altèreront leur fonction (ces derniers points seront traités en détail dans le chapitre III).

Bien qu'ils soient différents en composition comme en fonction, les complexes remodelant la chromatine partagent la présence d'une sous-unité appartenant à la famille des ATPases apparentées à Snf2. Ils peuvent néanmoins être subdivisés en plusieurs sous-familles selon les motifs structuraux qu'ils arborent au-delà de la région ATPase. Il en résulte huit sous-groupes chez les eucaryotes : les complexes de type SWI/SNF, ISWI, CHD1 (pour *Chromodomain Helicase DNA-binding 1*), INO80, p400, CSB (pour *Cockayne Syndrome protein B*), RAD54 et DDM (pour *Decrease DNA Methylation 1*) (Fig.10) (Sif, 2004).

Le complexe SWI/SNF, qui contient chez la levure l'ATPase Swi2/Snf2, est le plus étudié avec son poids moléculaire d'environ 2 MDa (pour une revue (Johnson et al., 2005)). Un paralogue de Swi2/Snf2, Sth2, a également été isolé comme faisant partie d'un complexe apparenté RSC (pour *Remodeler of the Structure of the Chromatin*) partageant plusieurs propriétés fonctionnelles avec SWI/SNF. Cette sous-unité ATPase est également conservée dans de nombreuses espèces dont l'homme où l'on retrouve ses homologues hBRM/hSNF2a et hBRM/hSNF2b au sein de complexes multiprotéiques (pour une revue (Martens and Winston, 2003)). S'il a été montré qu'il peut aussi jouer un rôle dans la répression de la

transcription, sa fonction principale est d'altérer la structure du nucléosome et d'augmenter l'accessibilité à l'ADN. Pour cela, SWI/SNF est recruté au niveau de la chromatine grâce à son association avec l'ARN Pol II ou certains récepteurs nucléaires, ou encore par le biais de son bromodomaine capable de reconnaître les histones H4 acétylés.



<u>Figure 10</u>: Représentation schématique des principaux complexes ATP-dépendant remodelant la chromatine, d'après (Sif, 2004). Les ATPases définissant les familles de complexes sont colorées en mauve (famille SWI/SNF), en rouge (famille ISWI et INO80), en orange (famille CHD) ou en blanc (famille p400). Les sous-unités conservées dans plusieurs complexes sont en rose foncé, les sous-unités spécifiques en rose clair. Les protéines liées à l'actine sont en vert, et les hélicases de type Rvb en bleu. En jaune apparaissent les sous-unités conservées chez la drosophile et chez l'homme.

Les complexes de la famille ISWI contiennent des homologues de l'ATPase de drosophile ISWI (pour une revue (Johnson et al., 2005)). Le premier complexe de ce type à avoir été purifié est le complexe NURF (pour *NUcleosome Remodeling Factor*). Ont suivi ensuite les autres complexes de drosophiles ACF (pour *ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor*) et CHRAC (pour *CHRomatin-Accessibility Complex*), ainsi que le complexe humain RSF (pour *Remodeling and Spacing Factor*). D'autres homologues de

ISWI ont depuis été découvert chez *Arabidopsis*, *Xenopus*, la levure, la souris et l'homme. Tous sont capables de réorganiser ou espacer les nucléosomes en les faisant par exemple glisser le long de l'ADN comme cela a été montré pour les complexes NURF et CHRAC. Contrairement aux protéines de la famille Swi2/Snf2, les membres de la famille ISWI n'ont pas de bromodomaine mais peuvent malgré tout lier les queues d'histones H4 grâce à leur domaine SANT (pour *SWI3*, *ADA2*, *N-CoR*, *TFIIIB*). De plus, les complexes ISWI différent des complexes SWI/SNF par leur taille, les complexes SWI/SNF étant bien plus grands, ainsi que par leurs mécanismes de remodelage de la chromatine, nécessitant des nucléosomes intactes, seuls points d'ancrages pour le moment observés pour les complexes ISWI au niveau de la chromatine. Outre leur rôle principal dans la régulation de la transcription par l'ARN Pol II, les complexes ISWI interviennent notamment dans la répression de la transcription par l'ARN Pol I, dans la réplication, dans la recombinaison ou encore la réparation (pour une revue (Mellor, 2006a)).

Les ATPases de la sous-famille CHD1 se distinguent par la présence de deux chromodomaines en leur partie N-terminale et de leur motif de liaison à l'ADN qui leur permet de se lier à la chromatine (pour une revue (Marfella et al., 2007)). Ces protéines ont été retrouvées dans des complexes de remodelage de la chromatine tels que SAGA chez la levure ou NuRD (pour *Nucleosome Remodeling and Deacetylating*) chez l'homme, qui possèdent aussi respectivement une activité HAT ou HDAC. En plus d'être important pour la régulation de la transcription et le développement, certaines protéines CHD sont impliquées dans des maladies humaines comme la dermatomyosite, caractérisée par l'inflammation des muscles et de la peau, ou quelques formes de cancer.

La protéine INO80 fait partie de deux grands complexes de remodelage de la chromatine de plus de dix sous-unités appelés INO80 et SWR1 (pour *SWi2/Snf2 Related ATPase 1*) (pour une revue (Bao and Shen, 2007)). Ces complexes sont caractérisés chez l'homme par la présence des protéines Tip49a et Tip49b, orthologues des sous-unités Rvb1 et Rvb2 des complexes de levure. La présence de ces deux protéines chez la levure, apparentées à l'hélicase bactérienne RuvB, confère aux complexes une activité ADN-hélicase qu'ils sont les seuls à posséder parmi les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants. Le complexe INO80 intervient dans la régulation de la transcription, mais aussi dans la réparation des cassures double-brin (DSB pour *Double Strand Break*) chez la levure grâce à son interaction avec le variant d'histone  $\gamma$ H2A.X (Morrison et al., 2004). Par ailleurs, il a été montré que le complexe SWR1 de levure contribue au remplacement de l'histone H2A par son variant H2A.Z au niveau de l'euchromatine (Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004).

Enfin, le complexe INO80 a récemment été observé comme interagissant avec la télomèrase Ast1p pour réguler la structure du télomère chez *Saccharomyces cerevisiae* (Yu et al., 2007).

L'ATPase p400, partagée notamment par les complexes p400 et TIP60 (pour *Tat Interacting Protein 60kDa*) chez les mammifères, est l'orthologue humain de l'ATPase DOMINO de la drosophile (Fuchs et al., 2001). Les complexes p400 et TIP60 ont également d'autres protéines en commun incluant c-Myc, TRRAP, TAP54 $\alpha$  et  $\beta$  (pour *TIP60 Associated Protein*), BAF53 (pour *Brahma Related Gene 1-Associated Factor 53kDa*) et la  $\beta$ -actine. Contrairement au complexe TIP60, le complexe p400 est cependant dépourvu de l'activité HAT.

CSB est une protéine de remodelage jouant un rôle dans la réparation par excision de nucléotide (Citterio et al., 2000) tandis que RAD54 fonctionne en coopération avec RAD51 pour remodeler la chromatine (Alexeev et al., 2003). Pour finir, la protéine d'*Arabidopsis thaliana* DDM1 est importante pour la maintenance de la méthylation de l'ADN est la stabilité du génome (Brzeski and Jerzmanowski, 2003).

#### 3. L'initiation de la transcription

Une fois le complexe de pré-initiation assemblé au niveau du promoteur, l'initiation proprement dite peut débuter. Grâce à ses activités hélicases, TFIIH catalyse l'ouverture de la double hélice d'ADN entre les positions -9 et +2 de part et d'autre du TSS pour former la bulle transcriptionnelle (Holstege et al., 1996). Ceci rendra possible l'appariement des ribonucléotides (rNTP) libres au brin matrice et l'élaboration de la première liaison phosphodiester aboutissant à la formation d'un diribonucléotide. Le PIC est ainsi stabilisé mais cela n'empêche pas l'avortement de nombreuses synthèses d'ARN. L'ARN Pol II peut s'arrêter à tout moment, relâcher l'ARN en formation, puis reculer sur la matrice d'ADN pour repositionner son centre catalytique au site d'initiation et entreprendre un nouveau cycle. La bulle de transcription reste très instable jusqu'à l'addition du quatrième rNTP (Holstege et al., 1997). Le complexe de transcription subit alors un changement de conformation qui conduit à la stabilisation du complexe ouvert. A ce stade, TFIIH n'est plus nécessaire au maintien de la bulle de transcription qui va s'étendre au fur et à mesure de l'allongement de l'ARN. La probabilité de synthèses avortées ne cesse alors de diminuer jusqu'à l'atteinte de la position +9. Entre cette position et le nucléotide +11, le complexe subit une nouvelle transition structurale importante. On assiste en effet au refermement de l'ADN entre les positions -9 et +2, empêchant le complexe de ré-initier la transcription. Pour cette raison, cette étape de

passage de l'initiation à l'élongation de la transcription est appelée « échappée du promoteur » (pour « *promoter escape »*) (Holstege et al., 1997). L'initiation de la transcription s'achève par la libération des facteurs d'initiation favorisée par la phosphorylation par TFIIH du domaine CTD de l'ARN Pol II, essentiellement au niveau de la sérine 5 (pour revue (Palancade and Bensaude, 2003)). Il est néanmoins important de noter que si TFIIF semble également quitter le PIC lorsque la bulle de transcription se trouve entre les sites +10 et +68 (Zawel et al., 1995), il joue aussi un rôle dans l'élongation de la transcription, ce qui suggère sa réassociation ultérieure au complexe (Yan et al., 1999). De plus, certains facteurs de transcription, plus particulièrement TFIID, TFIIH et TFIIE, peuvent être maintenu sur le promoteur par un activateur transcriptionnel et ainsi former un squelette « prêt à l'emploi » pour ré-initier la transcription (Yudkovsky et al., 2000).

### 4. L'élongation et la terminaison de la transcription

L'élongation de la transcription débute lors du recrutement des facteurs d'élongation aux côtés de l'ARN Pol II. Leur rôle est d'augmenter la vitesse catalytique de l'enzyme (pour une revue (Svejstrup, 2007)). Au fur et à mesure que la transcription progresse, la bulle s'étend en aval d'une paire de base de plus que la position du dernier rNTP ajouté. L'ARN Pol II oscille, à chaque ajout de nucléotide, entre une conformation active puis inactive, marquant ainsi une pause dans l'élongation du transcrit. Cette pause se traduit par un recul de l'enzyme de 2 à 4 nucléotides (Uptain et al., 1997). TFIIF, les Élongines et les protéines de la famille ELL (pour *Eleven-nineteen Lysine-rich Leukemia*) interagissent directement avec l'enzyme pour supprimer ces arrêts transitoires (pour une revue (Shilatifard et al., 2003)). Lorsque le recul de l'enzyme est trop important, de 7 à 14 nucléotides, cela entraîne un mauvais positionnement de l'extrémité 3' de l'ARN par rapport au site actif et rend la polymérase incapable de continuer la synthèse (Komissarova and Kashlev, 1997). Le facteur d'élongation TFIIS permet alors à l'ARN Pol II de reprendre l'élongation grâce à un mécanisme de clivage des dernières bases synthétisées qui conduit au réalignement l'extrémité 3' de l'ARN avec le centre catalytique de l'enzyme (Rudd et al., 1994).

Le facteur d'élongation P-TEFb (pour *Positive-Transcription Elongation Factor b*), constitué de la kinase cycline-dépendante CDK9 et de la cycline T1, favorise l'allongement des transcrits en phosphorylant le domaine CTD de l'ARN Pol II sur la sérine 2 (pour revue (Palancade and Bensaude, 2003)). En effet, la phosphorylation du domaine CTD de l'enzyme provoque la dissociation de deux facteurs négatifs d'élongation nommés DSIF (pour *DRB* 

*Sensitivity Inducing Factor*) et NELF (pour *Negative ELongation Factor*) qui, en l'absence de P-TEFb, se lient à l'enzyme pour s'opposer à sa progression (Yamaguchi et al., 2002).

L'empaquetage de l'ADN en chromatine introduit un niveau de complexité supérieur auquel la cellule doit savoir faire face pour parvenir à transcrire ses gènes. Des facteurs tels que Spt4/5, Spt6, FACT (pour *FAcilitates Chromatin Transcription*) ou Elongator sont chargés de permettre à l'ARN Pol II de continuer la synthèse d'ARN à travers les nucléosomes (pour une revue (Svejstrup, 2007)). FACT et Spt6 agissent en liant directement les histones H2A et H2B afin, probablement, de déstabiliser les nucléosomes et de les transférer hors du passage du complexe d'élongation. L'Elongator, quant à lui, semble remodeler la chromatine en usant de son activité HAT.

Les mécanismes de terminaison demeurent peu connus chez les eucaryotes. L'arrêt de l'élongation impliquerait la présence d'un site de polyadénylation fonctionnel (AAUAAA) ou d'un site de clivage cotranscriptionnel sur l'ARN. La reconnaissance de l'un de ces sites par CPSF (pour *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*) conduirait au clivage du transcrit couplé à sa polyadénylation par ce facteur, ce qui aurait pour effet de libérer l'ARN pré-messager du complexe d'élongation. La 5'-3' exonuclease Xm2 s'attacherait alors à l'extrémité 5' de l'ARN resté associé à l'ARN Pol II et poursuivrait la polymérase le long de l'ARN toujours en élongation jusqu'à ce qu'elle la rattrape et provoque la dissociation du complexe du brin d'ADN (pour une revue (Ares and Proudfoot, 2005)). Enfin, il apparaît que la structure chromatinienne dans la région de terminaison joue un rôle important et que certaines machineries de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes soient impliquées dans la terminaison (Alen et al., 2002).

# **B.** Les facteurs généraux de transcription et les modifications posttraductionnelles

Comme la plupart des protéines dans la cellule, les facteurs généraux de transcription peuvent subir diverses modifications chimiques après leur traduction. On appelle ce type d'altérations des modifications post-traductionnelles. Ces modifications relèvent de processus variés tels que l'ajout de groupements biochimiques fonctionnels sur un acide aminé, l'addition d'un groupement peptidique ou même de protéine, ou encore le changement de la nature chimique d'un acide aminé. D'autres modifications, comme l'établissement de ponts disulfures entre deux cystéines ou le clivage protéique d'un lien peptidique par une protéase, impliquent des changements structuraux au sein de la protéine. Ce dernier aspect ne sera cependant pas traité dans ce manuscrit.

Les modifications post-traductionnelles retrouvées le plus fréquemment au sein des protéines sont les phosphorylations (ajout d'un groupement phosphate PO<sub>4</sub>), les acétylations (ajout d'un groupement acétyle COCH<sub>3</sub>), les méthylations (ajout d'un ou plusieurs groupements méthyles CH<sub>3</sub>), les ubiquitinations (ajout d'une ou plusieurs ubiquitines, petite protéine de 76 acides aminés) et les sumoylations (ajout du *Small Ubiquitin-like MOdifier*, ou SUMO, petite protéine d'une centaine d'acides aminés). On assiste également parfois au couplage d'acides gras ou de glucides comme dans le cas de l'ADP-ribosylation (ajout d'un ADP-ribose) (pour une revue (Seo and Lee, 2004)).

Ces modifications vont généralement entraîner un changement de fonction de la protéine et donc constituer un mécanisme important pour la régulation de l'expression des gènes.

# 1. Quelques exemples de facteurs généraux de transcription pourvues de modification post-traductionnelles

Beaucoup de GTFs sont les cibles de modifications post-traductionnelles (Fig.11). Celles-ci sont parfois nécessaires pour stimuler une activité enzymatique d'un facteur ou pour contribuer au choix du gène à transcrire.

#### a) TFIIA

Des études réalisées chez la levure ont montré que la grande sous-unité TOA1 du facteur général de transcription TFIIA peut être phosphorylée sur ses sérines 220, 225 et 232 par la protéine CKII (pour *Casein Kinase II*) *in vitro* (Fig.11). Il a de plus été observé *in vivo* que cette phosphorylation est importante pour obtenir une association stable entre TFIIA et le complexe TBP/ADN et est corrélée avec un haut niveau de transcription (Solow et al., 1999).

Chez l'homme, le précurseur TFIIA $\alpha\beta$  de TFIIA est la cible d'un clivage protéolytique conduisant aux sous-unités TFIIA $\alpha$  et TFIIA $\beta$ . Or TFIIA $\beta$  semble être la cible d'ubiquitinations qui la conduiront vers le protéasome pour procéder à sa dégradation. Par ce mécanisme, la cellule peut contrôler le niveau de TFIIA afin d'adapter rapidement le processus de transcription (Hoiby et al., 2004). Enfin, chez l'homme à nouveau, TFIIA $\alpha\beta$  est la cible de phosphorylation *in vivo* au niveau de quatre résidus: S316, S321, S280 et S281. Encore une fois, la modification semble être nécessaire pour renforcer le contact entre TFIIA et TBP. En outre, il a été déterminé *in vitro* que c'est la sous-unité TAF1 de TFIID qui, par son domaine kinase N-terminal, phosphoryle le GTF (Solow et al., 2001).

#### b) TFIIB

Une protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PK pour *DNA-dependent Protein Kinase*) a été montrée capable de phosphoryler TFIIB mais aussi la protéine TBP in vitro (Fig.11). Si la modification n'affecte ni la liaison de TFIIB à l'ADN ni celle à TBP, elle semble stimuler la formation du complexe TBP-TFIIB-TFIIF-ARN Pol II sur le promoteur (Chibazakura et al., 1997). Néanmoins, il n'existe aucune preuve de l'existence d'une telle modification *in vivo*.

L'incubation d'un TFIIB recombinant humain purifié avec de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) radiomarqué a en outre révélé une activité autoacétyltransférase pH-dépendante pour le GTF. Lorsque le pH est augmenté, TFIIB peut en effet s'autoacétyler au niveau de sa lysine K238 *in vitro*, mais également *in vivo*, à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa. Les résultats obtenus ont aussi permis de démontrer que cette modification stabilise l'interaction entre TFIIB et TFIIF et active la transcription aussi bien *in vitro* que dans les cellules (Choi et al., 2004; Choi et al., 2003). Le niveau d'acétyl-CoA disponible dans la cellule pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation de la transcription.

#### c) TFIIE

En ce qui concerne le facteur TFIIE, des tests d'acétylation *in vitro* ont montré que les acétyltransférases PCAF, P300 et TAF1 pouvaient toutes les trois acétyler la sous-unité TFIIEβ du facteur recombinant humain TFIIE (Fig.11). Il s'avère que l'acétylation semble essentiellement toucher la lysine 52 de la sous-unité (Imhof et al., 1997). Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires pour vérifier l'existence de cette modification *in vivo* et son implication dans la régulation de la transcription.

Le facteur TFIIE peut également être phosphorylé au niveau de sa plus grande sousunité TFIIE par la protéine CKII *in vitro*, mais, ici encore, la fonction de cette phosphorylation reste obscure (Cabrejos et al., 2004).

#### d) TFIIF

Au cours de ces dernières années, il a été montré que le GTF TFIIF peut subir une grande variété de modifications post-traductionnelles (Fig.11). La plus étudiée d'entre elle est la phosphorylation de la grande sous-unité RAP74. Lorsqu'elle a été révélée, elle a tout de suite été attribué à l'activité enzymatique de la sous-unité CDK7 de TFIIH (Ohkuma and Roeder, 1994). En outre, elle est impliquée dans la liaison de TFIIF à l'ARN Pol II et régule donc positivement l'activité de ce facteur aussi bien durant l'initiation que durant l'élongation de la transcription (Kitajima et al., 1994).

D'autre part, la découverte de l'activité kinase de la sous-unité TAF1 de TFIID a permis d'isoler l'un de ses substrat : la sous-unité RAP74 (Dikstein et al., 1996a). Il est plus tard apparu, à l'aide de fractions de TFIID purifié obtenu à partir de cellules HeLa synchronisées, que cette phosphorylation était plus importante dans les cellules arrêtées en phase G2/S que dans celles arrêtées en G1 précoce (Yonaha et al., 1997). En accord avec ces données, des analyses complémentaires ont mis en évidence la nécessité de l'activité kinase de TAF1 pour la transcription du gène de la cycline A, requise pour la phase S du cycle cellulaire, et de celui de la kinase cycline-dependante CDC2 (aujourd'hui appelée CDK1), indispensable pour le déclenchement de la mitose (O'Brien and Tjian, 1998).

Enfin, trois sites de phosphorylation ont été identifiés aux positions 207-230, 271-283 et 335-344 de RAP74 comme étant autant de cibles pour les kinases CKII et TAF1. De même, les résidus S385 et T389 peuvent être phosphorylés par la sous-unité RAP74 elle-même, traduisant une activité d'autophosphorylation (Rossignol et al., 1999). Ce dernier résultat est cependant remis en question par des tests de phosphorylations *in vitro* qui ne montrent pas une telle activité (Cabrejos et al., 2004). Celle-ci peut alors provenir de l'intervention d'une kinase endogène au sein des cellules HeLa où les expériences ont été menées.

Les deux sous-unités de TFIIF, RAP74 et RAP30, peuvent être acétylées par les acétyltransférases PCAF et P300, mais très peu par TAF1, contrairement à TFIIE (Imhof et al., 1997). De plus, tout comme TFIIB, la sous-unité RAP30 est capable de s'autoacétyler *in vitro* lorsque le pH est augmenté (Choi et al., 2004). Néanmoins, le rôle de cette modification reste pour le moment inconnu.

TFIIF semble également pouvoir être sujet à la poly-ADP-ribosylation de ses deux sous-unités *in vitro*. Ce type de modification est le plus souvent catalysé par une enzyme PARP1 (pour *Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*) généralement en réponse à une cassure d'un brin de l'ADN. Aussi, la poly-ADP-ribosylation de TFIIF peut être physiologiquement

appropriée lors de la réparation de l'ADN par excision de base (ou BER pour *Base Excision Repair*) bien que ce facteur ne semble pas intervenir directement dans ce processus (Rawling and Alvarez-Gonzalez, 1997).

#### e) TFIIH

Si TFIIH est bien connu pour son activité kinase assurée par sa sous-unité CDK7 qui lui permet de phosphoryler l'ARN Pol II, il est aussi, de son côté, la cible de divers kinases (Fig.11). Il a d'ailleurs été montré que cette même sous-unité CDK7 ainsi que la sous-unité p62, peuvent être phosphorylées durant la mitose par la kinase mitotique CDC2 (ou CDK1) couplée à MPF (pour *M-phase-Promoting Factor*) et à la cycline B (Long et al., 1998). La phosphorylation sur la S164 et, à moindre quantité, sur la thréonine 170 (T170) de la boucle T de la kinase de TFIIH provoque l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la sous-unité et est donc requise pour la régulation de la transcription au cours du cycle cellulaire (Akoulitchev and Reinberg, 1998).

Plus récemment, ce fut au tour de la sous-unité hélicase XPB d'être définie comme substrat de la kinase CKII. Il a en effet pu être observé que la phosphorylation de la S751 de XPB régule l'activité NER de TFIIH sans pour autant influencer son activité transcriptionnelle. La modification de la sous-unité inhibe en fait l'incision en 5' de l'ADN endommagé, cruciale au mécanisme de réparation, par l'endonucléase ERCC1-XPF (pour *Excision Repair Cross Complementary group 1 – Xeroderma Pigmentosum F*) préalablement recruté par TFIIH. Cette inhibition pourrait être due à un changement de position de l'endonucléase au sein du complexe de réparation consécutivement à la phosphorylation de TFIIH, ou à la perte de l'effet activateur de l'extrémité C-terminale déphosphorylée de XPB sur l'activité enzymatique de ERCC1-XPF (Coin et al., 2004).

De toutes les modifications qui ont ainsi pu être observées sur ces GTFs, on retiendra plus particulièrement celles qui ont été confirmées *in vivo* telles que les phosphorylations de TFIIA et de TFIIF ou l'autoacétylation de TFIIB, toutes impliquées dans l'activation de la transcription, ainsi que la phosphorylation de TFIIH intervenant dans la régulation de la transcription au cours du cycle cellulaire ou dans le mécanisme de NER.



<u>Figure 11</u>: Représentation schématique des GTFs, excepté TFIID, et de leurs modifications post-traductionnelles. Les sous-unités qui composent les GTFs et les modifications qu'elles subissent sont détaillées dans le texte. Lorsqu'ils sont connus, les sites de modification sont indiqués à côté de la modification concernée. Dans TFIIF, la localisation de certains sites de phosphorylation n'est pas précise mais contenue dans une portion de la sous-unité. Dans le cas de TFIIA, le précurseur TFIIA $\alpha\beta$ , dont le clivage libère les sous-unités TFIIA $\alpha$  et TFIIA $\beta$ , a été représenté à part. Chaque modification est représentée par une couleur différente et désignée par une abréviation sur le drapeau. P = phosphorylation, Ac = acétylation, Ub = Ubiquitination, ADP-r = ADP-ribosylation.

#### 2. Les modifications post-traductionnelles de TFIID et TFTC

Le complexe multiprotéique TFIID est la cible de nombreuses modifications posttraductionnelles sur plusieurs de ses sous-unités (Fig.12). La phosphorylation de TBP semble être la mieux décrite à ce jour. Par ailleurs, divers TAFs, dont quelques uns sont partagés par les complexes TFIID et TFTC, ont également montré pouvoir être modifiés. Néanmoins, il n'existe que très peu d'études relatant l'existence de modifications touchant une sous-unité présente dans TFTC mais absente du complexe TFIID. En effet, seul GCN5 s'est avéré présenter l'une ou l'autre modification (Fig.12).

#### a) Les modifications au niveau de TBP

La sous-unité TBP s'est montrée pouvoir subir de nombreux évènements de phosphorylation au cours de ces dernières années. Mais bien que toutes ces réactions aient été

retrouvées sur la partie N-terminale de la sous-unité, elles ne sont pas les fruits d'une seule et même enzyme. Ainsi, la kinase CDK7 de TFIIH fut la première décrite comme étant responsable de la modification de TBP suite à des tests de phosphorylation *in vitro* (Ohkuma and Roeder, 1994). Plus tard, une autre enzyme allait dévoiler sa capacité à phosphoryler TBP *in vitro*. Il s'agit de la kinase DNA-PK, aussi responsable de la modification de TFIIB. Les résultats ont en outre révélés que cette phosphorylation concorde avec une activation de la transcription (Chibazakura et al., 1997). Enfin, il a été observé que CKII est capable de modifier la protéine TBP recombinante de levure *in vitro*. Cependant, cette même enzyme s'est montrée incapable de phosphoryler un TBP recombinant humain (Maldonado and Allende, 1999). *In vivo*, la phosphorylation de TBP a été associée à la mitose et conduit à une inhibition de la transcription dépendante des activateurs. La nature de la kinase dans ce cas est toutefois inconnue (Segil et al., 1996).

TBP est également la cible d'une tout autre modification. Des études réalisées à partir de protéines recombinantes humaines ont effectivement montré que la sous-unité peut être poly-ADP-ribosylée par l'enzyme PARP1. L'ajout d'ADP-ribose semble alors empêcher TBP de lier l'ADN et donc d'initier la formation d'un complexe de transcription actif (Oei et al., 1998). Toutefois, aucune preuve n'a jusqu'à maintenant été fournie quant à la présence de cette modification sur une protéine TBP endogène.

#### b) Les modifications au niveau des TAFs

Plusieurs études ont montré que certains TAFs sont sujets à des évènements de phosphorylation. Tout d'abord, il a été observé que la phosphorylation mitotique de TBP évoquée précédemment est accompagnée de la phosphorylation de TAF12, TAF9 et TAF6 *in vivo* (Segil et al., 1996). Si l'intégrité de TFIID ne semble pas être perturbée par ces modifications, le complexe phosphorylé est incapable de soutenir une transcription dépendante d'activateurs *in vitro*. Néanmoins aucune kinase impliquée dans la phosphorylation de TFIID ni aucune phosphatase responsable de sa déphosphorylation en phase G1 n'ont pu être identifiées. L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de TFIID en mitose paraît donc être indépendante de la condensation de la chromatine, et la phosphorylation du GTF pourrait même intervenir dans la formation des chromosomes.

Des tests de phosphorylation *in vitro* sur des complexes TFIID humains purifiés à partir d'extrait nucléaires de cellules HeLa ont révélé que trois polypeptides contenus dans TFIID pouvaient être phosphorylés par la kinase CKII (Maldonado and Allende, 1999). D'une

masse d'environ 55 kDa, 68 kDa et 95 kDa, ces protéines pourraient respectivement correspondre aux sous-unités TAF7, TAF6 et TAF5 bien qu'aucune identification formelle n'ait été obtenue. Mais CKII peut aussi phosphoryler la sous-unité TAF1 du complexe TFIID de levure sur deux sites distincts du bromodomaine de la protéine *in vitro* comme *in vivo* (Sawa et al., 2004). Cependant, aucune fonction n'a été attribuée à ces modifications.

Des TAF7 recombinants humains purifiés, produits dans des cellules d'insectes SF9 infectés par des baculovirus contenant le gène de la sous-unité, ont également été montrés phosphorylés lors d'autres tests de phosphorylation in vitro (Gegonne et al., 2006). Ces expériences faisaient cette fois intervenir la protéine recombinante TAF1 douée d'une activité kinase. Des études effectuées sur une série de mutants de délétion de TAF7 ont permis de localiser les sites de phosphorylation entre les résidus 103 et 203 mais aussi entre les acides aminés 204 et 349. De plus, les tests de phosphorylation ont révélé la capacité du TAF1 humain à s'autophosphoryler, contrairement au TAF1 de levure qui nécessite l'intervention de CKII. La phosphorylation de TAF1 est d'ailleurs la principale responsable de la perte de liaison constatée entre les sous-unités TAF1 et TAF7. Enfin, les mesures du niveau de phosphorylation des deux sous-unités à chaque étape d'assemblage du PIC ont démontré que toutes deux ne sont phosphorylées qu'après l'entrée de l'ARN Pol II dans le complexe, ce qui concorde avec le moment où TAF7 se détache de TFIID. Ce dernier évènement permet à TAF1 de retrouver son activité acétyltransférase nécessaire à l'initiation de la transcription. Il est ainsi proposé que TAF7, via sa phosphorylation et celle de TAF1, fonctionne comme un point de contrôle chargé d'empêcher l'initiation de la transcription tant que le complexe de préinitiation n'est pas complètement assemblé.

Sur toutes ces expériences, il est important de préciser que TAF9 et TAF12 sont également présents au sein du complexe TFTC. On peut donc supposer qu'ils puissent aussi y être phosphorylés.

Les sous-unités TAF5 et TAF12 humaines ont par ailleurs aussi montré pouvoir être sumoylées *in vitro*, à l'aide de protéines recombinantes humaines, mais aussi *in vivo*, dans des extraits nucléaires de cellules humaines surexprimant la protéine SUMO-1 (Boyer-Guittaut et al., 2005). Grâce à des mutations ponctuelles au niveau des sites accepteurs prédits par analyse de la séquence d'acides aminés, la localisation des résidus modifiés a pu être précisée. Il s'agit de la K14 pour TAF5 et de la K19 pour TAF12. Bien qu'il n'ait pas été trouvé de fonction pour la sumoylation de TAF12, celle de TAF5 interfère dans la liaison de TFIID au promoteur. Au cours de ces expériences, les protéines recombinantes humaines TAF1 et TBP

ont également montré pouvoir être sumoylées *in vitro*, mais les sites accepteurs de ces deux sous-unités deviennent inaccessibles lorsqu'elles se trouvent au sein du complexe TFIID.

Dans un contexte différent, le TAF4b humain, sous-unité spécifique de TFIID préférentiellement exprimée dans les cellules de granulosa de l'ovaire, est la cible de phosphorylations par la protéine kinase A (PKA) (Wu et al., 2005). Cette modification, faisant suite à l'augmentation du niveau intracellulaire d'AMP cyclique (pour Adénosine MonoPhosphate), participerait alors à la régulation de l'expression de divers gènes ovariens, responsables à leur tour du contrôle de fonctions variées comme la folliculogenèse ou la stéroïdogenèse.

La sous-unité TAF10, commune à TFIID et à TFTC, est à ce jour le seul TAF à avoir été montré méthylé in vivo. La méthyltransférase SET9 (aussi appelée SET7/9), jusque là connue pour son activité histone-méthyltransférase (HMT) sur la lysine 4 de l'histone H3, a en effet montré pouvoir monométhyler in vitro la sous unité TAF10 au sein d'un complexe TFIID recombinant (Kouskouti et al., 2004). De plus, la digestion partielle des produits de ces expériences, de leur purification et de leur séquençage, ont permis d'identifier la lysine 189 comme site de méthylation. Enfin, l'étude de complexes TFIID endogènes issues de cellules HeLa soumises à la méthylation par SET9 et l'utilisation d'un anticorps dirigé contre cette nouvelle modification ont révélé que celle-ci existe bel et bien dans la cellule vivante. L'effet de cette modification sur l'expression des gènes a aussi été investigué par l'analyse par RT-PCR (pour Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) d'ARN de cellules de souris sauvages ou mutantes pour le site de modification de TAF10. Les données obtenues ont divulgué un effet spécifique de la méthylation de TAF10 sur la transcription de certains gènes. Par ailleurs, la résolution de la structure de la méthyltransférase liée à un peptide TAF10 a permis de préciser le motif reconnu par l'enzyme et d'identifier de nouveaux substrats, parmi lesquels se trouve la sous-unité TAF7 méthylée sur sa lysine 5 par SET7/9 in vitro (Couture et al., 2006).

Pour finir, il a été montré, par western blot à partir de complexes TFIID purifiés de levures, que les sous-unités TAF1 et TAF5 de TFIID pouvaient être ubiquitinées *in vivo* probablement par les ubiquitine-ligases BUL1 et BRE5 (Auty et al., 2004).



<u>Figure 12</u>: Représentation schématique des complexes TFIID et TFTC et de leurs modifications post-traductionnelles. Les complexes ont été adaptés d'après (Muller and Tora, 2004). Les sous-unités qui composent les complexes et les modifications qu'elles subissent sont détaillées dans le texte. Lorsqu'ils sont connus, les sites de modification sont indiqués à côté de la modification concernée. Dans le cas du TFIID contenant TAF4b, seul la phosphorylation touchant cette sous-unité spécifique est représentée. Cependant, les autres TAFs de ce complexe étant communs avec ceux de hTFIID, il est probable qu'ils puissent subir les mêmes modifications De récentes données ont par ailleurs suggéré que TAF5 et TAF6 ne font pas partie du complexe (Nagy and Tora, 2007). Chaque modification est représentée par une couleur différente et désignée par une abréviation sur le drapeau. P =phosphorylation, Me = méthylation, Ub = Ubiquitination, SUMO = sumoylation, ADP-r = ADP-ribosylation.

# c) Les modifications au niveau de GCN5

GCN5 est une des sous-unités de TFTC qui possède une activité HAT. La première modification de cette protéine à avoir été mise en évidence est sa phosphorylation par la DNA-PK (Barlev et al., 1998). Il a été montré que cette réaction a lieu aussi bien *in vitro*, par des tests de phosphorylation effectués sur des protéines recombinantes, qu'*in vivo*, en utilisant des extraits nucléaires de cellules HeLa contenant ou ne contenant pas la kinase. En outre, l'évaluation de l'activité HAT des échantillons obtenus par ces deux méthodes a permis de lier la modification à une inhibition du pouvoir enzymatique de GCN5.

Une autre modification de GCN5 a récemment été mise en évidence dans le complexe SAGA de la levure. La lysine 25 a été identifiée comme le site principal de la sumoylation de la sous-unité *in vivo* (Sterner et al., 2006). Si dans un premier temps aucun rôle n'a pu être attribué à la modification que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, la fusion artificielle de SUMO sur la partie N-terminale de GCN5 engendre un niveau de transcription réduit du gène *trp3* codant pour une protéine nécessaire à la synthèse d'acides aminés à partir d'aminotriazole. La sumoylation pourrait donc être associée à une répression de la transcription.

# III.Le dynamisme de la structure chromatinienne : un mécanisme épigénétique de l'expression des gènes

Comme cela a été évoqué tout au long du chapitre précédent, la régulation de la transcription des gènes est étroitement liée avec le niveau de compaction de l'ADN (pour une revue (Li et al., 2007)).

La longueur de la molécule d'ADN étant plusieurs milliers de fois supérieure à celle du diamètre du noyau, les cellules ont développé un système de compactage où l'ADN est associé à des protéines structurales pour former la chromatine. Ce terme a été employé pour la première fois en 1882 par Walther Flemming, pionnier dans l'étude de la mitose, dans son livre *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (Substance cellulaire, Noyau et Division cellulaire) dans lequel il décrit une structure nucléaire au sein du noyau de cellules observées au microscope (Flemming, 1965).

Mais la chromatine n'est pas qu'un simple procédé d'empaquetage de l'ADN. Grâce aux nombreuses modifications post-traductionnelles des histones, ses composants protéiques majeurs, et aux variants d'histones, elle joue un rôle de premier plan dans la régulation de l'expression des gènes, par le biais notamment de la variation de son degré de condensation.

# A. La structure de la chromatine

D'une longueur de 2 mètres pour quelques 3 milliards de paires de bases, l'ADN humain illustre bien le gain en complexité et donc en longueur des acides nucléiques eucaryotes au cours de l'évolution. Pour pouvoir être contenu dans le noyau, la précieuse molécule doit donc être compactée.

Le premier niveau de repliement résulte de l'enroulement de l'ADN autour d'un cœur protéique pour constituer un nucléosome. La répétition de cette structure en nucléosome tout au long de l'ADN va donner à la chromatine un aspect de « collier de perles » d'une épaisseur de quelques 10 nm lorsqu'elle est observée au microscope électronique. Un tel processus raccourcit déjà d'environ sept fois l'ADN nu. Mais la chromatine n'existe que très rarement sous cette forme au sein de la cellule. Aussi, dans un second temps, le cordon de nucléosomes se replie en un filament plus court et plus épais adoptant une structure en hélice de 30 nm de diamètre. Cet état de la chromatine est appelée fibre de 30 nm et est environ 40 fois plus courte que l'ADN nu. Elle est à son tour repliée en une fibre de 100 à 300 nm de diamètre constituant vraisemblablement des domaines en boucles de 15000 à 100000 pb (Fig.13). Des

régions spécifiques de l'ADN pourraient fixer ces domaines en boucle aux protéines de la matrice nucléaire ou charpente chromosomique.



Représentation Figure 13 : schématique des différents niveaux de compaction de l'ADN, d'après (Hansen, 2002). Les différents niveaux compaction de l'ADN sont de représentés de la forme la moins condensée qui est l'ADN libre, en haut, à la forme la plus condensée qui est le chromosome en métaphase de la mitose, en bas. Le diamètre de la fibre chromatinienne est indiqué pour chaque étape. Pour des raisons de simplification, les queues *N*terminales des histones ne sont pas représentées ici.

## 1. Le nucléosome

Le nucléosome est l'unité de base fondamentale de la chromatine dans toutes les cellules eucaryotes, à l'exception des spermatozoïdes dans lesquelles ils sont remplacés par d'autres protéines de compaction : les protamines (pour une revue (Lewis et al., 2003)). Il est constitué d'ADN et de quatre paires de protéines appelées histones. On compte quatre types d'histones au cœur du nucléosome, H2A, H2B, H3 et H4, auxquels vient s'ajouter un histone *linker*, ou histone de jonction, H1 qui stabilise la structure des nucléosomes.

La structure cristallographique du nucléosome est aujourd'hui connue à une résolution de moins de 2 Å (Davey et al., 2002), mais ses caractéristiques majeures sont connues depuis 1997, date de la résolution de sa structure à 2,8 Å par l'équipe du Dr Richmond (Luger et al., 1997). La particule centrale du nucléosome se présente ainsi sous la forme d'un disque composé d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule l'ADN en une superhélice gauche. L'octamère comporte en fait un tétramère central, constitué de deux hétérodimères H3-H4 étroitement liés l'un à l'autre, flanqué de part et d'autre d'un hétérodimère H2A-H2B (Fig.14.<sup>①</sup>). 146 pb d'ADN, soit 1,75 tours, s'enroulent autour du cœur protéique (Fig.14.<sup>②</sup>). La partie d'ADN séparant deux nucléosomes, d'une longueur moyenne de 50 pb avec quelques variations et exceptions, est appelée ADN *linker* (ou ADN de jonction).

Les histones sont des protéines basiques riches en arginines et en lysines adoptant une structure typique au sein du nucléosome. Cette structure forme un « Z » constitué d'une longue hélice  $\alpha$  flanquée de deux hélices  $\alpha$  plus courtes. L'interaction entre les hélices centrales adjacentes permet de stabiliser les différentes paires de dimères (Fig.14.①).

Chaque histone possède également une « queue » flexible d'une trentaine d'acides aminés à l'extrémité N-terminale. Les queues d'histones se projettent en dehors de la surface cylindrique du cœur du nucléosome et à travers des « tunnels » du sillon mineur de l'ADN. Ce sont les régions les plus conservées des protéines déjà hautement conservées que sont les histones car elles remplissent deux fonctions fondamentales. Tout d'abord, elles favorisent les interactions entre nucléosomes et permettent ainsi la condensation des nucléosomes en fibres compactes de 30 nm. D'autre part, les modifications post-traductionnelles que peuvent subir ces queues d'histones participent à l'assemblage de la chromatine et, ultérieurement, à la régulation de l'accessibilité de l'ADN incorporé dans la chromatine aux facteurs de transcription, de réplication et de réparation (phénomène détaillé dans la partie III.C).

L'histone H1 est en contact avec l'ADN au niveau de son point d'entrée et de sortie du nucléosome (pour une revue (Woodcock et al., 2006)). Il clampe en quelque sorte l'ADN et stabilise ainsi le nucléosome qui sera alors moins mobile. De plus, l'histone H1 peut réduire l'activité transcriptionnelle de la chromatine en favorisant sa compaction.



<u>Figure 14</u>: Structure atomique d'un nucléosome résolue par cristallographie aux rayons X, d'après (Luger et al., 1997). ① *Décomposition de l'octamère d'histone composé d'un tétramère d'histones H3-H4, flanqué de part et d'autre d'un dimère H2A-H2B. Les queues Nterminales dépassent du cylindre formé par l'octamère d'histones.* ② *Structure d'un nucléosome sous deux angles de vue. Les couleurs des histones sont les mêmes qu'en D. La double hélice d'ADN fait 1,75 tours autour du cœur d'histones.*
## 2. La fibre de 30 nm

La chromatine sous forme de « collier de perles » s'enroule à son tour en une structure hélicale d'un diamètre de 30 nm. S'il est admis que les nucléosomes en forme de disques sont disposés de sorte que leurs côtés plats soient parallèles au grand axe du filament, la façon précise dont ils sont condensés au sein de la fibre reste à déterminer (pour une revue (Tremethick, 2007)). Deux principaux modèles ont été proposés pour la structure de la fibre de 30 nm (Fig.15). Selon le premier, les nucléosomes s'agenceraient en une structure hélicoïdale de type solénoïde à un site d'initiation. Deux nucléosomes consécutifs seraient alors l'un à côté de l'autre (Fig.15.A) (Robinson et al., 2006). Le deuxième modèle suggère que les nucléosomes consécutifs se feraient face de sorte que la fibre adopterait une structure hélicoïdale en zigzag à deux sites d'initiation (Fig.15.B) (Schalch et al., 2005). Cette dernière hypothèse semble être la plus probable à l'heure actuelle.



Figure 15 : Modèles d'organisation de la fibre chromatinienne de 30 nm, d'après (Robinson et al., 2006). Pour chaque modèle, une portion de chromatine contenant 22 nucléosomes (N) est représentée. Les positions des premiers (N1), deuxièmes (N2), troisièmes (N3) et septièmes (N7) nucléosomes sont indiquées pour les deux modèles. L'axe vertical de la fibre est matérialisé en blanc. A. Modèle de l'hélice en solénoïde à un site d'initiation proposé par Rhodes et ses collaborateurs (Robinson et al., 2006). L'hélice a un diamètre de 33 nm pour une hauteur d'environ 33 nm également. À chaque nouveau tour autour de l'axe, la couleur de l'ADN alterne entre le bleu et le mauve. B. Modèle de l'hélice en zigzag à deux sites d'initiation proposé par Richmond et ses collaborateurs (Schalch et al., 2005). Le diamètre de l'hélice est ici de 28,4 nm et sa hauteur d'environ 47 nm. À chaque nouveau tour autour de l'axe, ce qui correspond à chaque nouvelle paire de nucléosomes dans ce cas, la couleur de l'ADN alterne entre le bleu et le mauve.

Des données récentes ont montré que les acides aminés 14 à 19 de la queue de l'histone H4 sont essentiels pour permettre à la partie N-terminale d'établir des contacts spécifiques avec une parcelle acide située à la surface du dimère H2A-H2B d'un nucléosome adjacent (pour une revue (Tremethick, 2007)). Outre l'histone de jonction H1, ces éléments semblent donc contribuer à la formation de la fibre de 30 nm. Par ailleurs, l'acétylation de la lysine 16 de H4 ou le remplacement de l'histone H2A par certains de ses variants dont la parcelle acide est modifiée peuvent constituer des moyens de réguler cette interaction et donc la compaction de la chromatine de 10 nm en une structure supérieure.

## 3. Les niveaux supérieurs de compactage de l'ADN

La compaction de la chromatine au-delà de la fibre de 30 nm est un processus encore obscur aujourd'hui (pour une revue (Belmont, 2006)). Un premier modèle de repliement a été proposé suite à des observations au microscope électronique de chromosomes métaphasiques dépourvus d'histones (Paulson and Laemmli, 1977). Il propose que la fibre de 30 nm forme des boucles qui sont ancrées dans une charpente axiale formée par les complexes à protéines SMC (pour *Structural Maintenance of Chromosomes*) et la topoisomèrase II (Fig.16.<sup>2</sup>) (le rôle de ces protéines dans la condensation mitotique de la chromatine sera traité dans la partie IV.A). Cette hypothèse a été confirmée par de nombreuses expériences et a été étendue à la fibre chromatinienne en interphase (pour une revue (Belmont, 2002)).

Cependant, l'analyse au microscope électronique de la chromatine de cellules CHO en phase G1 a conduit au modèle d'agencement de la fibre chromatinienne sous la forme de fibre chromonème (Belmont and Bruce, 1994). Selon cette théorie, la fibre chromatinienne subirait une série de torsion hélicale hiérarchique, ne cessant d'augmenter l'épaisseur de la fibre résultante, mais réduisant considérablement sa longueur (Fig.16.<sup>①</sup>). De plus, cette dernière hypothèse concorde avec les résultats obtenus de l'étude au microscope électronique de la condensation des chromosomes au cours de la phase G2 du cycle cellulaire. Celle-ci fait apparaître une condensation en trois étapes, faisant à chaque fois intervenir un enroulement de la fibre la plus fine sur elle-même (Kireeva et al., 2004). Enfin, le modèle de la fibre chromonème permet d'expliquer les premiers niveaux de compaction de la chromatine qui ont lieu en début de mitose en l'absence de protéines de charpente du chromosome.

Si le modèle de la fibre chromonème semble donc être le favori à ce jour, les complexes SMC et la topoisomérase II sont néanmoins nécessaires au maintien de la structure

du chromosome en métaphase. Aussi, l'agencement de la fibre chromatinienne doit probablement faire intervenir les mécanismes décrits dans les deux modèles.



Figure 16: Modèles de repliement de la fibre de 30 nm, d'après (Muller et al., 2004). D Modèle de la fibre chromonème. La fibre de 30 nm subit ici une torsion hélicale qui donnera lieu à une nouvelle fibre plus épaisse pouvant à son tour s'enrouler en hélice, et ainsi de suite. Les lignes jaunes représentent les interactions entre fibres, comme, par exemple, entre protéines H1 qui pourraient stabiliser la structure. 2

Modèle des boucles organisées en « rosettes ». La fibre de chromatine forme dans ce cas des boucles qui s'agencent elles-mêmes en « rosettes » en se fixant notamment aux protéines de la charpente chromosomique représentées en jaune sur l'image.

## 4. Notions d'euchromatine et d'hétérochromatine

On distingue classiquement deux types de chromatine dans les cellules eucaryotes en fonction de critères structuraux et fonctionnels. L'euchromatine est une forme globalement décondensée de la chromatine. Elle correspond à des zones riches en gènes, où ceux-ci sont en outre actifs et donc transcrits. L'hétérochromatine est quant à elle constituée de régions d'ADN condensées pauvres en gènes, lesquels sont principalement inactifs. D'ordre général, les histones qu'elle contient apparaissent hypoacétylés et hyperméthylés par rapport à ceux de l'euchromatine (pour une revue (Huisinga et al., 2006)).

En 1928, l'hétérochromatine a d'abord été identifiée comme étant le matériel nucléaire caractérisé par son fort marquage à l'acétocarmine tout au long du cycle cellulaire (Heitz, 1928). Il s'agit en fait de l'hétérochromatine constitutive, qui inclut généralement les régions télomèriques et l'ADN satellite des centromères, deux domaines structuraux cruciaux pour la maintenance de chromosomes intacts et la bonne transmission de leur information génétique (pour une revue (Huisinga et al., 2006)). L'hétérochromatine constitutive n'est cependant plus considérée aujourd'hui comme une région inerte, et peut être le siège de gènes activement transcrits qui seraient impliqués dans le maintien de la structure hétérochromatinienne (pour une revue (Dimitri et al., 2005)).

Il existe également une autre forme d'hétérochromatine qualifiée de facultative car les séquences d'ADN qu'elle contient sont retrouvées dans l'hétérochromatine ou dans l'euchromatine selon le type de cellule et son état de différenciation. Le chromosome X constitue un exemple classique d'hétérochromatine facultative chez les mammifères. En effet, chez la femelle, un chromosome X choisi au hasard dans chaque cellule est inactivé à un stade précoce du développement avant l'implantation de l'embryon. La majorité des gènes de ce chromosome sont donc par la suite silencieux du point de vue de la transcription. Ainsi, les femelles possédant deux chromosomes X ont le même niveau d'expression de la plupart des gènes du chromosome X que les mâles qui ne possèdent qu'un seul de ces chromosomes (pour une revue (Heard and Disteche, 2006)).

En outre, il apparaît que les différences entre les niveaux de condensation et d'expression génique de l'euchromatine et de l'hétérochromatine résultent de modifications à la fois de l'ADN et des protéines associées.

## **B.** La méthylation de l'ADN

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN a lieu sur une cytosine presque exclusivement dans le contexte de dinucléotides CpG, et la plupart de ces CpG au sein du génome sont méthylés (pour une revue (Weber and Schubeler, 2007)). Ces dinucléotides sont répartis de façon non uniforme dans le génome. Ils sont ainsi généralement sous-représentés sauf au niveau de courtes régions, appelées îlots CpG, positionnées au niveau du promoteur et/ou du premier exon de plus de 60% des gènes humains.

Les profils de méthylation sont mis en place très tôt au cours du développement, par l'action concertée d'au moins trois enzymes désignées comme des méthyltransférases de l'ADN (DNMTs pour *DNA MethylTransferases*) : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b. L'inactivation des gènes de ces enzymes chez la souris a en effet montré qu'ils jouaient un rôle essentiel pour le développement normal de l'animal. DNMT3a et -3b sont responsable de la méthylation *de novo* puisqu'ils sont capables de cibler de nouveaux sites CpG non méthylés pour établir les profils de méthylation au cours du développement. D'autre part, DNMT1 est considérée comme une méthylase de maintenance, responsable de la transmission du profil de méthylation de la cellule mère aux cellules filles au cours de la réplication de l'ADN, en reconnaissant des substrats hémiméthylés (pour une revue (Weber and Schubeler, 2007)). Une quatrième méthyltransférase de l'ADN, DNMT2, ne montre qu'une faible activité méthyltransférase *in vitro* et ne semble que très peu impliquée dans la méthylation de l'ADN

*in vivo*. Cette même enzyme a par contre récemment montré pouvoir méthyler l'ARNt-Asp (pour acide aspartique) *in vivo* (Goll et al., 2006). Il existe enfin une protéine DNMT3L qui est apparentée aux DNMTs mais ne contient pas d'activité méthyltransférase intrinsèque. Elle s'associe en fait avec DNMT3a et -3b pour moduler leur activité catalytique (Suetake et al., 2004).

La méthylation de l'ADN est généralement associée à un état répressif de la chromatine et à une inhibition de l'activité du promoteur sur lequel elle prend place. Deux modèles de répression par la méthylation de l'ADN ont été proposés. Selon le premier, la méthylation de la cytosine peut empêcher la liaison de facteurs de transcription comme Sp1 sur leur séquence de reconnaissance au niveau du promoteur. Le deuxième scénario suggère que la méthylation de l'ADN affecte indirectement l'état de la chromatine grâce au recrutement de protéines se liant aux CpG méthylés : les MBPs (pour *Methyl-CpG-Binding Proteins*) (pour une revue (Klose and Bird, 2006)). Une caractéristique commune des MBPs est de pouvoir recruter, au niveau des CpG méthylés, des complexes ayant des activités de modifications post-traductionnelles des histones, notamment des HDACs ou des HMTs, qui entraînent une extinction transcriptionnelle.

La méthylation de l'ADN chez les mammifères est impliquée dans des fonctions cellulaires et des pathologies aussi variées que l'expression de gènes spécifiques à certains tissus, la différenciation cellulaire, l'empreinte parentale, l'inactivation du chromosome X, la régulation de la structure de la chromatine, la carcinogenèse ou encore le vieillissement (pour une revue (Razin and Kantor, 2005)). Elle a en outre montré être essentiel pour permettre un développement normal de l'organisme et pour la survie de cellules différenciées.

Si la plupart des gènes sont exprimés de façon bi-allélique, certaines régions chromosomiques portent des gènes dont l'expression est mono-allélique et dépend de l'origine parentale. Ces gènes, au nombre d'environ 75 aujourd'hui, sont marqués par une empreinte parentale qui détermine leur expression différentielle aussi bien au cours du développement embryonnaire que pendant la vie adulte. Les allèles qui font l'objet d'une empreinte génomique se caractérisent alors par un taux plus élevé de méthylation des îlots CpG de l'ADN sur une des deux copies parentales (pour une revue (Paoloni-Giacobino, 2007)).

Dans le cas de cellules cancéreuses, il a été observé une hyperméthylation de certains gènes, bien que le génome de ces cellules se trouve dans un contexte d'hypométhylation globale. L'hyperméthylation des CpG entraîne alors une extinction transcriptionnelle des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans certaines fonctions essentielles pour la cellule comme le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des dommages de l'ADN et l'apoptose (pour une revue (Esteller, 2007)).

## C. Les modifications post-traductionnelles des extrémités N-terminales des histones

Les extrémités aminoterminales et, dans une moindre mesure, carboxyterminales qui émergent à la surface du nucléosome sont les cibles privilégiées de nombreuses modifications post-traductionnelles. Quelques rares modifications ont néanmoins aussi été identifiées dans d'autres régions. Ces modifications sont ciblées sur des résidus précis pour chaque histone et sont catalysées, généralement de manière réversible, par des enzymes spécifiques. De surcrôît, seules ou en interagissant entre elles, les modifications des queues d'histones régulent le niveau d'expression des gènes en modulant, directement ou à l'aide de protéines associées, le taux de compaction de la chromatine. Diverses hypothèses qui seront détaillées plus loin ont d'ailleurs été formulées pour expliquer le mécanisme précis par lequel ces modifications altèrent l'activité transcriptionnelle de la chromatine. Enfin, la question de l'existence d'une structure des queues d'histones sera également abordée.

## 1. Les différents types de modification ayant lieu au niveau des histones

On compte aujourd'hui au moins neuf types de modifications différentes au niveau des histones et plusieurs sites ont pu être identifiés pour chaque classe (pour une revue (Kouzarides, 2007)). Ainsi, les modifications les plus étudiées à ce jour sont l'acétylation (ac), la méthylation (me), la phosphorylation (p), l'ubiquitination (ub) et l'ADP-ribosylation (ar), mais d'autres modifications ont également été décrites telles que la sumoylation, la déimination, la biotinylation ou l'isomérisation (Fig.17). De plus, de nouvelles approches technologiques comme l'utilisation de la spectrométrie de masse ne cessent d'accroître le nombre des modifications identifiées (Garcia et al., 2007b). Précisons que la nomenclature utilisée pour désigner la nature, la position et le degré de ces modifications respectera celle proposée par Turner (Turner, 2005).



<u>Figure 17</u>: Localisation des principales modifications post-traductionnelles des histones du cœur du nucléosome chez les mammifères, adaptée de (Margueron et al., 2005). *L'extrémité N-terminale de chaque histone a été détaillée de même que l'extrémité C-terminale des* histones H2A et H2B, tandis que le domaine du cœur de l'histone est représenté par le motif HFD. Sont répertoriées les modifications de type acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination et ADP-ribosylation ayant été identifiées in vivo. À chacune de ces modifications a été attribué un drapeau de couleur spécifique comme indiqué dans la légende. L'emplacement des acides aminés modifiés par rapport au premier résidu N-terminal est annoté en-dessous de chacun d'eux.

## a) L'acétylation

L'acétylation des histones consiste au transfert d'un groupement acétyle (COCH<sub>3</sub>) à partir d'une molécule d'acétyl-coenzyme A vers le groupement ɛ-aminé d'un résidu lysine (K). Elle est catalysée par les histone-acétyltransférases (HAT) tandis que la réaction inverse est l'œuvre des histone-déacétylases (HDAC) (ces enzymes seront détaillées en partie III.C.2.a) (pour une revue (Timmermann et al., 2001)). Le niveau d'acétylation est donc la résultante de l'activité de ces deux familles d'enzymes antagonistes et peut conduire, s'il est mal contrôlé, à divers pathologies comme le développement de tumeurs ou le syndrome du X fragile.

L'acétylation des histones est presque invariablement associée à l'activation de la transcription (Fig.18). La corrélation entre ces deux processus a été proposée pour la première fois il y a déjà plus de 40 ans (Allfrey et al., 1964) et de nombreuses fois confirmée depuis. De la même façon, les HDACs permettent souvent de passer d'une chromatine permissive pour la transcription à une chromatine réprimée (Verdone et al., 2005)).

Le mécanisme par lequel l'acétylation des histones contrôle l'expression des gènes peut reposer sur deux stratégies. La première est que l'addition du groupement acétyle sur une lysine de l'extrémité N-terminale neutralise la charge positive de la chaîne radicale de l'acide aminé, et ainsi affaiblie le contact avec la molécule d'ADN chargée négativement. La mobilité des nucléosomes en serait augmentée et les promoteurs deviendraient plus accessibles à la machinerie transcriptionnelle (Kingston and Narlikar, 1999). Une autre alternative est basée sur le recrutement de protéines capables de reconnaître spécifiquement les lysines acétylées (Yang, 2004). Ces deux mécanismes peuvent aussi agir de concert.

Si la plupart des sites d'acétylation caractérisés à ce jour siègent au sein de la queue Nterminale des histones, plus accessible à la modification, une lysine du domaine cœur de H3, K56, a récemment été retrouvée acétylée (Schneider et al., 2006; Xu et al., 2005) (Fig.17). La position de la lysine dans le nucléosome, en face du sillon majeur de l'ADN, en fait une candidate idéale pour déstabiliser les interactions entre l'histone et l'ADN lorsqu'elle est acétylée. En outre, H3K56ac joue également un rôle dans la réparation de l'ADN, la stabilité du génome et la réplication de l'ADN (Driscoll et al., 2007; Han et al., 2007; Maas et al., 2006).

Comme le montre le cas de H3K56ac, l'acétylation des histones est impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Ainsi, l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4 est également importante pour la réparation de l'ADN (Qin and Parthun, 2006). L'acétylation de H4K8 intervient dans l'initiation de la phase S du cycle cellulaire et donc la réplication de l'ADN (Doyon et al., 2006). Enfin, des expériences *in vitro* suggèrent un rôle pour H4K16ac dans la décondensation de la chromatine (Shogren-Knaak et al., 2006).

#### b) La méthylation

La méthylation des histones consiste en une réaction de transfert d'un groupement méthyle, apporté par une molécule de S-adénosine-méthionine (SAM), vers un résidu lysine ou arginine (R). En ce qui concerne les histones du cœur, H2A, H3 et H4 sont connus comme étant méthylés *in vivo* (Fig.17). Les méthylations sont catalysées par les histoneméthyltransférases (HMT) ou les arginine-méthyltransférases de protéines (PRMT pour *Protein aRginine MethylTransferase*) (Trievel, 2004) et enlevées par les histonesdéméthylases (HDM) (Shi and Whetstine, 2007) (la spécificité et l'action de ces enzymes seront discutées en III.C.2.b).

Si l'acétylation est clairement associée à l'activation transcriptionnelle et la déacétylation à la répression, le rôle de la méthylation semble en revanche plus complexe (Kouzarides, 2007). En effet, la méthylation des histones peut aussi bien aboutir à une activation qu'à une répression de l'expression des gènes. Ainsi, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est par exemple corrélée à une activation de la transcription, tandis que celle de la lysine 9 va de paire avec une répression de la transcription. De plus, la position de la modification au niveau du génome peut faire varier son influence sur l'expression des gènes. La méthylation de la lysine 36, de même probablement que celle de la lysine 9, aura alors un effet positif lorsqu'elle aura lieu dans la région codante alors qu'elle aura un effet négatif quand elle sera sur le promoteur (Fig.18). Un niveau de complexité supérieur s'ajoute encore lorsqu'on considère les différents degrés de méthylation que peuvent subir certains résidus, à savoir la monométhylation (me1), la diméthylation (me2) et la triméthylation (me3).

## (i) Un rôle d'activation de la transcription

Tandis que la méthylation des arginines est presque systématiquement associée à l'activation transcriptionnelle, à l'exception, dans certains cas, de H3R8me, H4R3me et/ou H2AR3me (pour une revue (Pal and Sif, 2007)), seuls trois sites de méthylation des lysines semblent avoir le même effet : H3K4, H3K36 et H3K79 (pour une revue (Martin and Zhang, 2005)) (Fig.17-18).

Contrairement à l'acétylation, la méthylation n'affecte pas la charge globale de l'acide aminé sur lequel elle a lieu. Elle peut toutefois ajouter du volume et de l'hydrophobicité qui peuvent réduire la stabilité du nucléosome sur la chromatine ou servir de plateforme pour la fixation d'autres protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (Lee et al., 2005a).

La méthylation de chacune de ces trois lysines de l'histone H3 semble être directement liée au mécanisme de la transcription. Deux d'entre elles, H3K4me et H3K36me, sont même plus particulièrement impliquées dans l'élongation puisque les enzymes qui les catalysent ont été montrées associées avec l'ARN Pol II (Krogan et al., 2003; Ng et al., 2003). Il semblerait cependant que H3K4me serait plutôt une marque du début de la transcription, alors que H3K36me serait plus spécifique de l'élongation proprement dite.

Bien que la lysine 4 puisse accueillir différent degré de méthylation, la diméthylation tout comme la triméthylation du résidu se trouvent enrichies sur les gènes actifs. Cependant, il apparaît qu'elles ne se chevauchent pas complètement. En effet, H3K4me2 est plutôt distribuée sur la partie codante des gènes transcrits tandis que H3K4me3 est plus spécifiquement localisée à l'extrémité 5' de ces mêmes gènes (Pokholok et al., 2005) (Fig.18). Des résultats antérieurs suggèrent en fait que H3K4me2 sert à distinguer les régions euchromatiques des régions hétérochromatiques alors que la triméthylation joue un rôle plus direct dans la régulation transcriptionnelle (Santos-Rosa et al., 2002).

Comparativement à la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, la fonction de la méthylation de la lysines 79 de ce même histone est mal connue. H3K79me1 et H3K79me2, comme H3K36me, sont présentes au niveau de l'euchromatine mais n'apparaissent pas sur l'ADNr hétérochromatique et les télomères. Il a été décrit chez la levure que H3K79me empêche la liaison des protéines Sir2 et Sir3 chargées de déacétyler les histones et d'aider à établir de l'hétérochromatine puis de la maintenir (van Leeuwen et al., 2002). Ainsi, la méthylation de la lysine 79 contribuerait à limiter l'expansion de l'hétérochromatine sur les gènes actifs.

Notons également le cas particulier de H3K9me2 et H3K9me3 qui, si elles sont le plus souvent associées à l'hétérochromatine, ont récemment été observées au niveau de gènes activement transcrits dans des cellules de mammifères et couplées à la protéine de l'hétérochromatine HP1 $\gamma$  (pour *Heterochromatin Protein 1\gamma*) (Vakoc et al., 2005). On peut alors supposer que l'effet de la méthylation de la lysine 9 est dépendant soit du gène où elle se trouve, soit de son emplacement, dans la région codante ou sur le promoteur, soit de sa combinaison avec d'autres modifications.

La méthylation des arginines quant à elle, notamment au niveau des sites H3R2, H3R17, H3R26 et H4R3, est impliquée dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription, sous l'effet des récepteurs nucléaires et autres activateurs qui recrutent les PRMTs au niveau du promoteur (pour une revue (Lee et al., 2005a)).

## (ii) Un rôle de répression de la transcription

À nouveau trois lysines peuvent être les cibles de méthylations cette fois-ci associées à la répression de la transcription : H3K9, H3K27 et H4K20 (Fig.17-18).

La méthylation de la lysine 9 est probablement la mieux définie à ce jour. Elle est importante pour la répression de gènes euchromatiques mais aussi pour l'élaboration de l'hétérochromatine constitutive. Cette répression implique notamment la liaison de protéines de type HP1 (pour *Heterochromatin Protein 1*) au niveau du promoteur (pour une revue (Hiragami and Festenstein, 2005)). La lysine 9 peut subir les trois degrés de méthylation, mais chacun d'eux n'est pas retrouvé au même endroit dans le génome. La mono- et la diméthylation semblent être restreintes à l'euchromatine chez les mammifères, tandis que la triméthylation semble être la forme la plus représentée au sein de l'hétérochromatine péricentrique (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003).

En outre, H3K9me2 mais aussi H3K27me3 marquent les gènes réprimés au cours du mécanisme épigénétique de l'empreinte parentale chez la souris (Fournier et al., 2002). Plus récemment, c'est la triméthylation de la lysine 20 de H4 associée à celle de H3K9 qui ont été observées au niveau des régions inactivées dans des cellules germinales mâles de souris. L'allèle non-méthylé, par contre, est alors diméthylé sur H3K4 et acétylé sur H3 (Delaval et al., 2007). Mais H3K9me2 et H3K27me3 se trouvent également impliquées dans l'inactivation du chromosome X. En effet, lors de ce processus, l'ARN non codant Xist, qui revêt entièrement le chromosome X inactif et coïncide avec une baisse de méthylation de la lysine 4 de H3, recrute le complexe PRC2 (pour *Polycomb Repressive Complex 2*) contenant l'enzyme EZH2 (pour *Enhancer of Zeste Homologue 2*) responsable de la méthylation des résidus H3K9 et H3K27 (Fang et al., 2004). L'hyperméthylation des deux sites n'a cependant lieu que dans la phase précoce de l'inactivation et faiblira dans les étapes ultérieures.

La méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 a deux points communs avec celle de la lysine 9. Tout d'abord, le résidu peut également accueillir différents degrés de méthylation distribués différemment dans la chromatine. Néanmoins, c'est ici la monométhylation qui est retrouvée dans l'hétérochromatine péricentrique, en compagnie de H3K9me3, alors que la triméthylation est caractéristique de l'hétérochromatine facultative, notamment au niveau du chromosome X inactif (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003). L'autre similarité est que les deux modifications forment des sites pour le recrutement de protéines effectrices spécifiques contenant des chromodomaines. En effet, au centre du processus de répression de la transcription par la méthylation de la lysine 27 se trouvent les protéines du groupe *Polycomb* (PcG pour *Polycomb Group*) dont les membres sont responsables de la méthylation mais également de sa reconnaissance au niveau de la chromatine (elles seront traitées en partie III.C.2.b.i) (pour une revue (Ringrose and Paro, 2004)). L'un des rôles principaux de la méthylation de K27 via les protéines PcG, et plus particulièrement sa forme triméthylée, est

en fait de réguler l'expression des gènes homéotiques. Les gènes homéotiques codent pour des facteurs de transcription qui caractérisent l'identité des tissues embryonnaires. La répression de ces gènes par le biais de la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 réduit l'expression des gènes à homéoboîtes HOX (pour *HomeOboX*) à des types de cellules spécifiques dans l'embryon en développement (pour une revue (Ringrose and Paro, 2004)).

Tout comme la formation de l'hétérochromatine dictée par la méthylation de la lysine 9 qui est un mécanisme bien conservé au long de l'évolution, la méthylation de H4K20 longtemps restreinte aux métazoaires a été récemment observée chez la levure (Garcia et al., 2007a). La méthylation de H4K20 est associée au chromocentre et aux bras euchromatiques des chromosomes polytènes de la drosophile. Cependant, le marquage de l'euchromatine ne coïncide pas avec celui de H3K4me2, ce qui suggère un rôle de H4K20me dans les régions réprimées de l'euchromatine (Nishioka et al., 2002). La triméthylation de la lysine 20 nécessitant la triméthylation préalable de H3K9, on la retrouve aussi dans l'hétérochromatine constitutive péricentrique (Schotta et al., 2004). La mono- et la diméthylation sont quant à elles localisées dans les gènes réprimés au sein de l'euchromatine (pour une revue (Martin and Zhang, 2005)).

La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, bien qu'elle soit clairement impliquée dans l'activation de la transcription comme il a été mentionné précédemment, paraît également intervenir dans des mécanismes de répression. L'enzyme SET1 qui catalyse cette réaction semble effectivement participer à l'inactivation de la transcription de certains gènes chez *S. cerevisiae* (Briggs et al., 2001).

D'autre part, des expériences de mutations de l'enzyme SET2, responsable de la méthylation de H3K36, ou de la lysine 36 de H3 ont montré que H3K36me pouvait induire une répression du gène (Landry et al., 2003). Il a alors été proposé que cet effet négatif résulterait de sa localisation sur le promoteur tandis qu'elle serait plus généralement associée à l'activation transcriptionnelle lorsqu'elle se trouve dans la région codante (Xiao et al., 2003) (Fig.18). D'une façon plus indirecte, H3K36me3 peut induire une condensation de la chromatine en recrutant, par l'intermédiaire d'une autre protéine, une déacétylase sur la région codante du gène. Ce mécanisme a en fait lieu suite au passage de l'ARN Pol II pour éviter une initiation inappropriée de la transcription à partir de sites d'initiation cryptiques au sein de la région codante (Carrozza et al., 2005; Keogh et al., 2005).

Comme il a été relevé précédemment, la méthylation de deux voire trois arginines, H3R8, H4R3 et/ou H2AR3, a montré avoir un effet de répression sur l'expression de certains

gènes codant pour des protéines de régulation du cycle cellulaire et sur la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs (Pal and Sif, 2007)).

Enfin, un résidu a également été observé méthylé sur l'extrémité N-terminale de l'histone de jonction H1 : H1K26 (Daujat et al., 2005). Néanmoins, si elle semble capable de lier les protéines HP1 et L3MBTL1 (pour *Lethal 3 Malignant Brain Tumor-Like protein 1*) (Trojer et al., 2007), sa fonction précise reste encore à déterminer.



<u>Figure 18</u>: Profil de distribution de certaines modifications d'histone à travers le génome dans le contexte de la régulation de l'expression des gènes, d'après (Li et al., 2007)). La distribution des histones et leurs modifications sont réparties le long d'un gène arbitraire divisé en trois zones principales : la région intergénique en 5' (5'IGR pour Intergenic Region), la région transcrite (ORF pour Open Reading Frame) et la région intergénique en 3' (3'IGR). Les courbes représentent les différents profils obtenus par des analyses à l'échelle génomique. Les rectangles signifient que les données ne sont basées que sur un nombre d'études limité. A l'exception des méthylations de H3K9 et H3K27, la plupart des données ont été obtenues chez la levure. Le degré de la méthylation et de l'ubiquitination est indiqué après la désignation de la modification. me = méthylation, ac = acétylation, ub = ubiquitination, sumo = sumoylation.

## (iii) Les autres rôles de la méthylation des histones

Outre la régulation de la transcription, la méthylation des histones intervient également dans d'autres processus.

La monométhylation et la diméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 agissent par exemple comme un point de contrôle du cycle cellulaire (ou *checkpoint*) lors d'une lésion de l'ADN chez la levure puisqu'elles recrutent alors la protéine CRB2 (pour *CRumB 2*) qui signale l'arrêt en phase G2/M afin que l'ADN puisse être réparé (Botuyan et al., 2006). Chez les mammifères, le mécanisme semble être le même, mais il apparaît aussi que p53BP1 (pour *p53 Binding Protein 1*), l'homologue humain de CRB2, reconnaîtrait en plus H3K79me (Huyen et al., 2004).

Du point de vue du développement des organismes, il a été décrit précédemment que la méthylation de certains résidus des queues d'histones joue un rôle dans le dispositif d'empreinte parentale. Mais la méthylation des histones est également connue pour permettre la distinction des pronoyaux mâles et femelles après la fertilisation et l'établissement de la pluripotence des cellules au cours de l'embryogenèse (pour une revue (Morgan et al., 2005)). Dernièrement, il a par exemple été démontré que le niveau de méthylation sur H4R26 varie entre les blastomères d'un même embryon au stade 4 cellules. Les cellules exposant une plus forte méthylation sont destinées à former les cellules pluripotentes de la masse cellulaire interne, alors que celles affichant une méthylation minimale sont plutôt vouées à rejoindre le trophectoderme mural (Torres-Padilla et al., 2007).

## c) La phosphorylation

La phosphorylation, catalysée par des kinases et enlevée par des phosphatases (enzymes qui seront détaillées dans la partie III.C.2.c), consiste en une réaction de transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP vers un résidu sérine (S) ou thréonine (T). Aucun phénomène de phosphorylation de résidus tyrosines (Y) n'a encore été mis en évidence dans le cas des histones, et seul un évènement au niveau d'une histidine (H) est connu à ce jour.

Presque la moitié des sites connus de phosphorylation des histones se trouvent sur H3 et apparaissent essentiellement au stade mitotique du cycle cellulaire (pour revues (Crosio et al., 2002; Houben et al., 2007)). Chez les mammifères, on répertorie en effet quatre résidus pouvant être phosphorylés sur cette histone, T3, S10, T11 et S28, et six sites sur les autres histones du cœur : H2AS1, H2AT120, H2BS14, H2BT119, H4S1 et H4H18 (Fig.17). De son côté, l'histone H1 et ses variants peuvent aussi subir diverses réactions de phosphorylation sur différents sites propres à chaque isoforme de H1 (pour une revue (Rundquist and Lindner, 2006)). Néanmoins, s'il semble que le plus souvent la phosphorylation des sérines de l'histone de jonction est associée à l'interphase et celle des thréonines à la mitose, la fonction précise de ces modifications reste encore floue. Enfin, certains variants d'histones tels que CENP-A (pour *CENtromere Protein A*) ou H2A.X peuvent également être la cible de kinases.

La phosphorylation de H3S10 est la mieux décrite jusqu'à présent. Son intérêt réside dans le fait qu'elle semble avoir deux rôles opposés en fonction de la phase du cycle cellulaire durant laquelle elle a lieu (Prigent and Dimitrov, 2003). En interphase, H3S10p régule de façon positive l'expression des gènes, alors qu'en mitose, où elle apparaît en bien plus grande proportion, elle semble être associée à la condensation de la chromatine. La phosphorylation de l'histone H3 parait donc pouvoir induire l'activation de la transcription, tout comme sa répression suivant le moment où elle a lieu.

Le rôle de la phosphorylation en mitose étant très étudié et d'un intérêt particulier pour la compréhension de mon travail, elle sera traitée à part dans la partie IV de ce manuscrit où est décrite la condensation mitotique de l'ADN. Seules ses fonctions dans l'activation transcriptionnelle et dans d'autres processus tels que la réparation de l'ADN ou l'apoptose seront présentées dans cette partie.

## (i) Un rôle d'activation de la transcription

Quand elle a lieu en interphase, au contraire de son action en mitose ou en méiose, la phosphorylation de l'histone H3 n'affecte pas l'intégralité du génome mais uniquement une partie des gènes. Ainsi cette modification est par exemple retrouvée sur le gène *fos* lorsque celui-ci est activé par des mitogènes (Sassone-Corsi et al., 1999; Thomson et al., 1999) ou encore au niveau des promoteurs régulés par NFκB durant la réponse inflammatoire déclenchée par les cytokines (Yamamoto et al., 2003). Chez la levure, il a même été clairement démontré que H3S10p n'est pas nécessaire pour la transcription à partir de tous les promoteurs mais peut jouer un rôle spécifique pour certains d'entre eux (Lo et al., 2005).

Notons que la phosphorylation de H3S28, contrairement à celle de H3S10, n'a été observée qu'une fois hors de son contexte mitotique, au sein d'une cascade de signalisation

déclenchée par une exposition aux rayons UVB (Zhong et al., 2001). Autrement, elle semble être strictement reliée à la mitose.

Une autre phosphorylation, mal connue, a lieu sur l'histidine 18 de l'histone H4. Bien que sa fonction précise soit encore ignorée, l'activité histidine kinase associée à cette modification précède tout juste la synthèse d'ADN lors de la régénération du foie chez les mammifères, ce qui suggère un rôle dans la cascade de signalisations conduisant à la prolifération cellulaire (Tan et al., 2004).

## (ii) Les autres rôles de la phosphorylation des histones

La phosphorylation de H3S10 a également été liée au phénomène d'apoptose. Puisque, comme il sera développé plus loin, H3S10p accompagne la condensation des chromosomes, un mécanisme similaire pourrait avoir lieu pendant l'apoptose. Expérimentalement, la corrélation entre la phosphorylation de H3S10 et la condensation des chromosomes apoptotiques varie en fonction de l'agent utilisé pour induire la mort cellulaire programmée (Prigent and Dimitrov, 2003). La question du rôle de la phosphorylation dans ce processus reste alors encore en suspend.

D'autres phosphorylations d'histones sont impliquées dans l'apoptose. Chez la levure par exemple, la phosphorylation de l'histone H2B sur sa sérine 10 régule l'apoptose induite par le peroxyde (Ahn et al., 2006). Cette lysine n'étant pas présente dans l'histone de mammifère, une fonction analogue pourrait être assurée dans ce cas par H2BS14p (Cheung et al., 2003). Par ailleurs, la phosphorylation du variant d'histone H2A.X sur sa sérine 139 a montré être requise pour la fragmentation de l'ADN lors de la mort cellulaire programmée chez les mammifères (Lu et al., 2006). Ceci est d'autant plus surprenant que cette même modification est davantage connue pour son rôle dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (pour une revue (Fillingham et al., 2006)). Dans ce contexte, l'histone est appelé  $\gamma$ H2A.X.

H4S1p assure deux rôles distincts chez la levure. Comme H2AS129p, l'homologue de  $\gamma$ H2A.X, H4S1p intervient dans la réparation des lésions de l'ADN chez *Saccharomyces cerevisiae* (Cheung et al., 2005). En outre, la modification de l'histone H4 s'avère réguler la sporulation dans ce même organisme (Krishnamoorthy et al., 2006). Chez les métazoaires, H4S1p est présent durant la spermatogenèse où elle apparaît spécifique de la méiose (Wendt and Shilatifard, 2006), ou bien avec H2AS1p et les phosphorylations de H3 en mitose dans les autres cellules (Barber et al., 2004). Ainsi, la phosphorylation de la sérine 1 de l'histone H4

pourrait être une ancienne modification d'histone conservée à travers l'évolution pour marquer le génome et induire la compaction de l'ADN nécessaire à la gamétogenèse.

Enfin, la phosphorylation des résidus H2AT120 et H2BT119 s'est révélée marquer la chromatine méiotique n'étant pas appariée et réprimée dans les cellules germinales mâles, incluant le corps XY où se trouve les chromosomes sexuels transcriptionnellement inactifs (Baarends et al., 2007). Il semblerait donc que ces modifications soient impliquées dans la répression de l'expression génique au niveau du corps XY durant la spermatogenèse.

## d) L'ubiquitination

L'ubiquitination consiste en une réaction de ligation d'une ou plusieurs protéines ubiquitines sur un résidu lysine grâce à l'action d'une ubiquitinase ou ubiquitine-ligase. La réaction inverse est assurée par une enzyme à activité déubiquitinase. L'ubiquitine est une petite protéine présente dans toutes les cellules eucaryotes et dont la fonction principale est de marquer les autres protéines pour leur destruction. Toutefois, dans le cas des histones, elle n'a jamais été impliquée dans un processus protéolytique. Elle est composée de 76 acides aminés hautement conservés parmi les espèces eucaryotes, pour une masse moléculaire totale d'environ 8,5 kDa.

Cette très grande modification a été retrouvée sur les histones H2A au niveau de la lysine 119 et H2B, sur la lysine 120 chez l'homme ou sur la lysine 123 chez la levure (pour une revue (Shilatifard, 2006)) (Fig.17). Tandis que H2AK119ub est associé à la répression transcriptionnelle, H2BK120ub contribue à l'activation de la transcription (Fig.18). Le mécanisme par lequel l'ubiquitination régule l'expression des gènes n'est pas connu à ce jour. Elle pourrait agir en recrutant d'autres facteurs ou garder la chromatine ouverte simplement grâce à sa grande taille.

Dernièrement, les histones H3 et H4 ont montré pouvoir également être ubiquitinés et interviennent alors dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides après des irradiations aux ultraviolets (Wang et al., 2006). Ils pourraient en fait servir au recrutement de la protéine XPC sur le site endommagé. De même, H2AK119ub est aussi retrouvée dans ce type de réparation (Bergink et al., 2006).

#### e) L'ADP-ribosylation

L'ADP-ribosylation consiste au transfert d'une ou plusieurs molécules d'ADP-ribose, apportées par le donneur NAD<sup>+</sup> (pour *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*), vers des résidus acides glutamiques (E) ou arginines dans le cas des histones (pour une revue (Hassa et al., 2006)). Les protéines peuvent être mono- ou poly-ADP-ribosylées par des enzymes à activité mono-ADP-ribosyltransférase (MART) ou poly-ADP-ribosyltransférase (PARP) respectivement, tandis que la modification est enlevée par des ADP-ribosylhydrolases spécifiques (pour une revue (Faraone-Mennella, 2005)).

De nombreux sites de mono-ADP-ribosylation ont été isolés sur les différentes isoformes de l'histone de jonction H1 mais aussi sur l'histone H2B. Si bien qu'on recense les résidus E2, E15, E114, E115, E117 et R33 sur H1 et E2 sur H2B comme candidats à la mono-ADP-ribosylation (Fig.17). Les autres histones du cœur du nucléosome ont aussi montré pouvoir être modifiés, mais aucun site précis n'a pu être déterminé (Hassa et al., 2006).

L'ADP-ribosylation des histones a souvent été liée à l'activation de la transcription en modifiant notamment le degré de compaction de la chromatine. Mais elle a aussi été associée dans de nombreuses études à la réparation de l'ADN ainsi qu'à l'apoptose (Hassa et al., 2006).

#### f) Les autres modifications touchant les histones

La sumoylation, la biotinylation, la déimination ou encore l'isomérisation de proline sont autant de modifications post-traductionnelles que les histones peuvent également subir.

La sumoylation est une réaction proche de celle de l'ubiquitination décrite précédemment. Il s'agit de l'addition d'une protéine SUMO (pour *Small Ubiquitin-like MOdifier*) sur une lysine par une enzyme à activité SUMO-ligase, tandis que l'intervention d'une protéase spécifique de SUMO pourra l'enlever. Aucune enzyme capable de désumoyler un histone n'a cependant été identifiée à ce jour. Les protéines SUMO contiennent une centaine d'acides aminés pour une masse d'environ 12 kDa. La protéine SUMO-1 humaine, comme ses homologues chez la souris et le rat, possède par exemple 101 résidus et affiche un poids moléculaire de 11,6 kDa. Quatre autres isoformes existent cependant chez l'homme (pour une revue (Gill, 2005)).

Cette modification a été observée sur les quatre histones du cœur et des sites précis ont été identifiés sur les histones H2A, H2B et H4 de levure (Nathan et al., 2006). Le variant d'histone H2A.Z semble également pouvoir être sumoylé mais à un niveau bien plus restreint. La sumoylation s'oppose à l'acétylation et à l'ubiquitination qui ont lieu sur les mêmes résidus lysines et se retrouve ainsi liée à la répression de la transcription (Fig.18) (pour une revue (Iniguez-Lluhi, 2006)).

La biotinylation consiste à ajouter une molécule de biotine, connue également sous le nom de vitamine H ou B<sub>7</sub>, au niveau de la queue d'histone sur les acides aminés lysines. La réaction est menée par des protéines à activités biotinyl-histone-transférase telles que la biotinidase ou l'holocarboxylase-synthétase chez l'homme (pour une revue (Kothapalli et al., 2005)). De récentes données ont d'ailleurs suggéré que la biotinidase pourrait également être responsable de la débiotinylation des histones. Les histones H2A, H3 et H4 ont tous montré pouvoir être biotinylés *in vivo*, et plusieurs sites ont même pu être identifiés par des expériences de biotinylation *in vitro*. On compte ainsi les résidus K9, K13, K125, K127 et K129 sur l'histone H2A, les deux premiers résidus étant aussi partagés par le variant H2A.X (Chew et al., 2006); K4, K9 et K18 sur l'histone H3 (Kobza et al., 2005); et enfin K8 et K12 sur l'histone H4 (Camporeale et al., 2004). En ce qui concerne la fonction de cette modification, la biotinylation de la lysine 12 de l'histone H4 intervient dans les processus de répression de la transcription en marquant l'hétérochromatine péricentromérique, dans la réparation de l'ADN et dans la condensation mitotique de la chromatine (pour une revue (Hassan and Zempleni, 2006)).

La déimination, consistant en une réaction de citrullination, est le terme utilisé pour désigner la conversion d'une arginine en une citrulline au sein de la protéine (Fig.19). Cette réaction est exécutée par des peptidylarginine-déiminases (PAD), notamment PAD4 chez l'homme sur les arginines des histones H3 et H4 (Arita et al., 2006; Cuthbert et al., 2004). Bien que le passage d'une citrulline à une arginine n'ait pas encore été décrit jusqu'à présent, l'aspect cyclique de la déimination au niveau de certains promoteurs laisse penser que cette réaction inverse est possible (Bannister and Kouzarides, 2005). S'il est généralement admis que la citrullination est capable de contrer l'effet activateur de la méthylation des arginines, le moyen par lequel elle y parvient reste sujet à controverse (Thompson and Fast, 2006). Deux mécanismes sont en effet proposés, soit la déimination a lieu préférentiellement sur les arginines méthylées et convertit alors l'ancienne modification (Wang et al., 2004), soit la réaction future (Raijmakers et al., 2007).



<u>Figure 19</u>: Représentation en structures semi-développées de la conversion chimique d'une arginine en citrulline, connue sous le nom de déimination ou citrullination. PAD = peptidylarginine-déiminase. L'atome d'azote, en vert, est échangé avec l'atome d'oxygène, en rouge, sur la chaîne radicale de l'acide aminé.

La proline (P) existe soit en conformation *cis* soit en conformation *trans*. L'isomérisation de la proline consiste donc à passer d'un état à l'autre à l'aide d'une prolineisomérase. Une telle enzyme, FPR4 (pour *FK506 binding PRotein 4*), a récemment été identifiée chez la levure comme étant capable d'isomériser les prolines P30 et P38 de l'histone H3 chez la levure (Nelson et al., 2006). La réaction sur H3P38 étant impliquée dans la régulation de la méthylation de H3K36, elle interviendrait indirectement dans la régulation de l'expression génique. Notons qu'un homologue de FPR4 existe également chez la souris sous le nom de FKBP25 (pour *FK506 Binding Protein 25*) mais que son activité sur l'histone H3 reste à être explorée.

## 2. Les protéines et complexes capables de modifier les histones

L'identification des enzymes responsables des modifications post-traductionnelles des histones et des complexes auxquels elles appartiennent a fait l'objet de nombreuses études au cours de ces dix dernières années. De telles enzymes ont pu être identifiées pour toutes les modifications décrites dans la partie précédente, à savoir l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination (Shilatifard, 2006), l'ADP-ribosylation (Faraone-Mennella, 2005), la sumoylation (Nathan et al., 2006), la biotinylation (Kothapalli et al., 2005), la déimination (Arita et al., 2006) et l'isomérisation de proline (Nelson et al., 2006). Toutefois, seules les protéines impliquées dans la régulation des acétylations, des méthylations et des phosphorylations seront traitées ici.

## a) Les protéines et complexes à activité HAT ou HDAC

Le niveau d'acétylation des queues d'histones est régulé par deux types d'enzymes : celles qui ajoutent la modification, appelées histone-acétyltransférases (HAT), et celles qui les enlèvent, les histone-déacétylases (HDAC) (Timmermann et al., 2001). Ces protéines sont d'ailleurs elles-mêmes régulées que ce soit du point de vue de leur quantité dans la cellule, de leur activité enzymatique ou de leur disponibilité pour interagir avec des facteurs de transcription spécifiques (Legube and Trouche, 2003).

## (i) Les histone-acétyltransférases (HAT)

Les HATs font partie des premières enzymes capables de modifier les histones à avoir été identifiées et caractérisées d'un aspect fonctionnel. Elles catalysent l'acétylation du groupement ε-amine de lysines spécifiques au niveau des histones, mais aussi dans les facteurs de transcription et autres protéines nucléaires, pour réguler toute une variété de processus. Les HATs ont été regroupées phylogénétiquement en plusieurs catégories, chacune d'elles arborant des affinités distinctes pour des lysines spécifiques. On distingue ainsi les familles GNAT (pour *GCN5-N-AcétylTransférase-related*), CBP/P300, MYST (pour *MOZ*, *YBF2/SAS3, SAS2, TIP60*), TAF1, SRC ou encore ATF-2 (pour revues (Couture and Trievel, 2006; Marmorstein, 2001)).

La famille GNAT semble être le groupe comprenant les acétyltransférases les mieux connues (pour une revue (Verdone et al., 2005)). Chez les mammifères, cette classe est représentée par deux protéines fortement apparentées : GCN5 et PCAF. Les deux protéines peuvent interagir avec CBP/P300, faire partie du même complexe HAT dans la cellule, et sont toutes deux impliquées dans la régulation transcriptionnelle et le contrôle du cycle cellulaire. Elles fonctionnent en fait comme des coactivateurs/adaptateurs pour une partie des activateurs transcriptionnels et contiennent un bromodomaine en partie C-terminale qui est connu pour être un motif de liaison aux lysines acétylées (Yang, 2004). GCN5 est bien conservée à travers les espèces et sa fonction d'acétylation de la queue de l'histone H3, et à moindre mesure de celle de H4, est particulièrement avérée. PCAF quant à lui acétyle aussi bien les queues d'histones que d'autres protéines impliquées dans la transcription telles que les protéines p53, MyoD, la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou encore les facteurs généraux de transcription TFIIE et TFIIF (pour une revue (Poux and Marmorstein, 2003)).

Ces mêmes protéines, en plus des quatre histones du cœur du nucléosome, peuvent également être acétylées par CBP/P300 (pour une revue (Verdone et al., 2005)). Les protéines CBP et P300 sont des coactivateurs globaux de la transcription qui contiennent, en plus d'un bromodomaine, trois domaines riches en cystéines et en histidines pour leur permettre d'interagir avec d'autres protéines. Elles sont souvent évoquées comme une seule et même entité en raison de leur homologie structurale et fonctionnelle. Les enzymes CBP et P300 ont montré jouer un rôle dans de nombreux phénomènes cellulaires comme le contrôle du cycle cellulaire (Ait-Si-Ali et al., 2000), la différenciation et l'apoptose (Goodman and Smolik, 2000). De plus, elles stimulent la transcription de gènes spécifiques en s'associant à de nombreux facteurs de transcription se liant au promoteur tels que CREB, des récepteurs nucléaires aux hormones ou des activateurs oncoprotéiques.

La famille MYST tient son nom d'une partie des membres qui la composent : MOZ, YBF2/SAS3, SAS2, TIP60 (Utley and Cote, 2003). D'autres enzymes ont depuis été classées dans ce groupe, incluant la protéine de levure Esa1, la protéine MOF (pour Males-absent On the First protein) chez la drosophile, et les protéines humaines HBO1 (pour Histone acetyltransferase Binding to ORC1) et MORF (pour MORtality Factor). La plupart de ces protéines possèdent un chromodomaine sur leur extrémité N-terminale ainsi qu'un motif en doigt de zinc au sein de leur domaine HAT. Bien qu'ils contiennent des régions similaires en séquence, les membres de la famille MYST interviennent dans une grande variété de fonctions biologiques (Verdone et al., 2005). SAS2 et SAS3 (pour Something About Silencing protein) sont par exemple des régulateurs positifs de la répression transcriptionnelle alors que TIP60 participe à l'activation de la transcription de gènes spécifiques grâce à l'acétylation locale des histones, notamment H4. La translocation de MOZ (pour MOnocyte leukemia Zinc *finger protein*) sur CBP ou sur TIF2 est en partie responsable de la leucémie monocytaire. Un dernier exemple est celui de MOF qui joue un rôle dans le phénomène de « compensation du dosage » chez la drosophile, un processus visant à obtenir chez le mâle comme chez la femelle un même niveau d'expression des gênes situés sur les chromosomes sexuels.

TAF1 est l'une des sous-unités du facteur général de transcription TFIID (décrit en II.A.2.b.i). Outre son domaine HAT, elle arbore une grande diversité d'activité dont deux domaines kinases à chaque extrémité de la protéine, une activité ubiquitine-ligase et un double bromodomaine qui colocalise avec le domaine kinase de l'extrémité C-terminale. Ce double bromodomaine confère à la protéine une affinité particulière pour les queues d'histone H4 doublement acétylées. Par ailleurs, il a été montré que l'activité HAT de TAF1 est

importante pour l'activation de la transcription de certains gènes (pour une revue (Wassarman and Sauer, 2001)).

La protéine ATF2 est le seul activateur transcriptionnel se liant à une séquence spécifique de l'ADN qui a révélé une activité HAT (Kawasaki et al., 2000). Elle contient également un domaine d'activation transcriptionnel en son extrémité N-terminale et une glissière à leucine en région C-terminale lui permettant de se lier à l'ADN. Il a aussi récemment été observé qu'ATF2 peut interagir avec les domaines HATs de CBP et de P300 (Karanam et al., 2007).

La famille SRC (pour *Steroïd Receptor Coactivator*) est constituée de protéines qui s'associent avec les récepteurs nucléaires, notamment les récepteurs aux hormones stéroïdiennes, lorsque ces derniers ont lié leur ligand. Elles peuvent alors activer la transcription via l'acétylation des histones et le recrutement de facteurs supplémentaires comme CBP/P300 (pour une revue (Leo and Chen, 2000)).

La plupart de ces HAT se trouvent au sein de complexes multiprotéiques *in vivo* (Ogryzko, 2001). L'association d'autres protéines à l'enzyme augmente son activité catalytique et modifie ou élargie sa spécificité de substrat. De nombreux complexes chez l'homme contiennent ainsi la protéine GCN5 et beaucoup d'homologues des composants du complexe de levure SAGA (Grant et al., 1998). On compte en effet les complexes PCAF (Ogryzko et al., 1998), TFTC (Wieczorek et al., 1998) et STAGA (Martinez et al., 1998). Ces trois complexes renferment également des sous-unités TAFs et le cofacteur transcriptionnel TRRAP. Un dernier complexe comprenant aussi des sous-unités TAFs est le complexe TFIID dont la sous-unité catalytique est TAF1. Ce dernier complexe est détaillé en II.A.2.b.i.

Au moins trois autres complexes ont été identifiés chez l'homme. Il s'agit des complexes TIP60, TFIIIC et HBO1. Grâce à ses activités ATPase et ADN hélicase de même que sa capacité à lier l'ADN, TIP60 est impliqué dans divers processus dont la réparation des dommages de l'ADN et l'apoptose (Ikura et al., 2000). Il contient également la sous-unité TRRAP et semble être l'homologue du complexe NuA4 de levure (pour *Nucleosome Acetyltransferase of histone H4*). D'autre part, le facteur de transcription TFIIIC, dont la sous-unité catalytique est la protéine TFIIIC90, intervient notamment dans la régulation de la transcription des gènes de classe III (Dumay-Odelot et al., 2007), tandis que le complexe HBO1 pourrait être impliqué dans la réplication de l'ADN et dans la régulation de la transcription lors de certaines phases du cycle cellulaire (Burke et al., 2001; Zong et al., 2005). Enfin, chez la drosophile, MOF a été retrouvé au sein du complexe MSL (pour *Male Specific Lethal*) pour réguler la compensation de dosage (Hilfiker et al., 1997).

93

## (ii) Les histone-déacétylases (HDAC)

Les HDACs ont été divisées en trois groupes majeurs chez les mammifères : la classe I, qui contient les enzymes apparentées à la protéine RPD3 de levure, la classe II, avec les enzymes homologues de HDA1 de levure, et la classe III, représentée par les enzymes de la famille sirtuine, homologues de la protéine Sir2 de levure (Thiagalingam et al., 2003). Une quatrième classe constituée par la protéine HDAC11 a récemment été ajoutée. Alors que les enzymes des classes I, II et IV sont dépendantes du zinc, celles de la classe III dépendent de la molécule NAD<sup>+</sup>. De la même façon que les HATs qui sont recrutées sur des promoteurs spécifiques par des activateurs et des coactivateurs, les HDACs interagissent avec des répresseurs et des corépresseurs. En outre, plusieurs études ont montré l'importance des HDACs dans la régulation du cycle cellulaire et l'expression des gènes ainsi que leur implication dans certaines formes de cancer, si bien que l'utilisation d'inhibiteurs d'HDACs est une stratégie de traitement en plein développement (Timmermann et al., 2001).

La première classe des HDACs comprend les enzymes HDAC1, 2, 3 et 8 localisées dans le noyau. Les HDAC1 et 2 sont les mieux caractérisées. Elles sont souvent retrouvées au sein de trois complexes multiprotéiques : Sin3, Mi2/NuRD et CoREST (pour *CoREpreSsor element Transcription factor*) (pour une revue (Thiagalingam et al., 2003)). HDAC3 quant à elle est connue pour faire partie du complexe répresseur N-CoR1 (pour *Nuclear receptor CoRepressor 1*).

La classe II regroupe les enzymes HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10 qui sont retrouvées aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme (pour une revue (Yang and Gregoire, 2005)). Leur activité est d'ailleurs régulée par leur localisation cellulaire. En marge des autres membres de cette famille, HDAC6 possède deux domaines déacétylases et, chez l'homme, un domaine *SE14-repeat* constitué de huit répétitions consécutives d'un peptide de 14 acides aminés. Ce dernier domaine est important pour la localisation cytoplasmique de l'enzyme.

La troisième classe d'enzymes est composée des enzymes SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 (pour *SIRTuine*). Elles ont montré jouer un rôle dans divers phénomènes tels que la réparation de l'ADN ou le vieillissement (pour une revue (Buck et al., 2004)).

Bien qu'elle montre certaines homologies avec les enzymes de la classe I et II, la protéine HDAC11 ne s'associe pas avec les complexes SIN3 ou N-CoR. Au lieu de cela, l'enzyme semble être présente dans un complexe en compagnie de HDAC6. Aussi, à cause de ses caractéristiques qui la situent à la charnière des classes I et II, une nouvelle classe d'enzyme, la quatrième, a été attribuée à HDAC11 (Gao et al., 2002).

## b) Les protéines et complexes à activité HMT ou HDM

Comme il a été mentionné précédemment, la méthylation des histones peut avoir lieu sur deux types de résidus : les lysines et les arginines. Les enzymes histoneméthyltransférases (HMT) qui catalysent cette réaction diffèrent donc notamment en fonction de l'acide aminé qu'elles vont cibler (pour une revue (Lee et al., 2005a)). De plus, si des protéines histone-déméthylases (HDM) capables d'enlever la méthylation au niveau des lysines ont bien été trouvées, aucune n'a encore été isolée pour la déméthylation des arginines, à l'exception des peptidylarginine-déiminases (PAD) qui ne font que convertir l'arginine en citrulline (Shi and Whetstine, 2007).

## (i) Les histone-méthyltransférases (HMT)

## Les HMTs spécifiques des lysines (HKMT)

Toutes les HMTs spécifiques des lysines (HKMT), à l'exception de DOT1L, partagent un domaine SET (pour *Su(var), Enhancer of zest, Trithorax*) responsable de la catalyse et de la liaison du cofacteur S-adenosyl-L-methionine. Les HMTs ajoutent alors un, deux ou trois méthyles sur le groupement ɛ-amine des résidus lysines, générant respectivement une lysine mono-, di- ou triméthylée. Les homologues mammifères de la protéine Su(var)3-9 (pour *Suppression of variagation 3-9*) de drosophile, Suv39h1 et Suv39h2, on été les premières HKMTs à être caractérisées. Elles sont chargées de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Rea et al., 2000). Depuis, de nombreuses autres HKMTs à domaine SET ont été identifiées et classées dans différentes familles en fonction de leur séquence et de leurs propriétés structurales. On compte ainsi sept familles de HKMTs à domaine SET auxquelles s'ajoute DOT1L (pour *Disrupter Of Telomere silencing protein 1-Like*), unique représentant chez l'homme des HKMTs dépourvues de domaine SET (Fig.20) (pour une revue (Volkel and Angrand, 2007)).



<u>Figure 20</u> : Caractéristiques structurales des HKMTs contenant un domaine SET regroupées en sept familles, adaptée de (Volkel and Angrand, 2007). *Les familles et leurs membres sont détaillés dans le texte*.

La famille de protéines SET1 comprend chez l'homme les HKMTs MLL, MLL4, MLL2, MLL3 (pour *Mixed Lineage Leukemia protein*), SET1 et SET1L (Fig.20). Elles ont en commun la présence d'un domaine SET en extrémité C-terminale suivi d'une région Post-SET contenant trois cystéines conservées essentielles pour l'activité de l'enzyme. De surcroît, il a été montré que les protéines de ce groupe méthylent spécifiquement le résidu H3K4, le plus souvent associé à l'euchromatine active (Fig.21) (Yokoyama et al., 2004).

Le domaine SET des protéines de la famille SUV39 est également localisé dans la partie C-terminale de la protéine, mais il est ici flanqué des régions Pre-SET et Post-SET encore une fois nécessaires à l'activité catalytique de l'enzyme (Fig.20) (Rea et al., 2000). Toutes les HKMTs de cette famille ciblent spécifiquement H3K9, sauf G9a qui parvient aussi à méthyler H3K27 *in vitro* (Tachibana et al., 2001) et SETMAR (pour *SET domain and MARiner transposase fusion gene-containing protein*) qui peut modifier H3K36 et, à moindre mesure, H3K4 (Fig.21) (Lee et al., 2005c). Il est intéressant de noter que certaines de ces protéines possèdent des domaines leur permettant de reconnaître d'autres modifications au

sein de la chromatine. SUV39H1 et SUV39H2 pourraient par exemple interagir avec d'autres lysines méthylées grâce à leur chromodomaine (Fischle et al., 2003b), de même que SETDB1 (pour *SET Domain Bifurcated 1*) par le biais de son domaine Tudor (Huyen et al., 2004).

La famille SET2 contient les protéines NSD1, NSD2, NSD3 (pour *Nuclear SET Domain containing protein*), ASH1L (pour *Absent Small and Homeotic disks protein 1-Like*), SETD2/HYPB et SET2L (Fig.20). Toutes possèdent le domaine SET flanqué cette fois par les motifs AWS et Post-SET. Les membres de ce groupe ne montrent pas une aussi grande spécificité de substrat que les HKMTs des autres classes. Il s'avère en effet qu'ils peuvent souvent méthyler plusieurs résidus à la surface du nucléosome (Fig.21) (pour une revue (Volkel and Angrand, 2007)).

La famille EZH (pour *Enhancer of Zeste Homologues*) contient les deux protéines homologues de la HKMT « *Enhancer of zeste*» de drosophile : EZH1 et EZH2 (Fig.20). Ces enzymes, dépourvues de domaine Post-SET, sont fortement associées à la répression puisqu'elles modifient les sites H3K27 et H1K26 (Fig.21) (Kuzmichev et al., 2004).

La famille SMYD (pour *SET and MYND domain containing protein*) forme un groupe de cinq protéines arborant un motif en doigt de zinc de type MYND leur permettant de lier l'ADN (Fig.20). SMYD3 a ainsi montré qu'il peut se lier spécifiquement à l'ADN tandis qu'il méthyle spécifiquement la lysine 4 de l'histone H3 (Fig.21) (Hamamoto et al., 2004). La fonction des autres HKMTs de cette famille est cependant mal connue.

La famille PRDM (pour *PR-Domain-containing Methyltransferase*) est une vaste famille de protéines homogènes partageant des caractéristiques similaires (Fig.20). Toutes possèdent un domaine PR en N-terminale important pour leur activité catalytique et considéré comme une sous-classe du domaine SET. Elles partagent également, à l'exception de PRDM11, des motifs en doigt de zinc de type *Kruppel* qui suggèrent une capacité de liaison à l'ADN. D'un point de vue fonctionnel, toutes les protéines ne semblent pas méthyler le même résidu même si elles ne ciblent souvent qu'un seul acide aminé. En outre, les HKMTs de cette famille ont fréquemment été associées à la répression des gènes, la suppression de tumeurs et la carcinogenèse (pour une revue (Volkel and Angrand, 2007)).

D'autres HKMTs ne possédant pas de domaines particuliers en amont ou en aval du domaine SET ont été regroupées au sein d'un dernier groupe hétérogène (Fig.20). On retrouve notamment dans cette famille la méthyltransférase SET7/9 qui a été montrée capable de méthyler H3K4 (Fig.21) mais aussi TAF10 comme il a été décrit dans le chapitre précédent (en II.B.2.b) (Kouskouti et al., 2004).

DOT1L enfin est une protéine conservée au cours de l'évolution, dépourvue de domaine SET, qui méthyle spécifiquement la lysine 79 dans le domaine cœur de l'histone H3 (Fig.21) (Feng et al., 2002).

## Les HMTs spécifiques des arginines (PRMT)

**HMTs** spécifiques des arginines (PRMTs pour Les Protein aRginine MethylTransferasse) ont été conservées tout au long de l'évolution de la levure à l'homme. Elles ont été classées en trois groupes selon la nature de la méthylation qu'elles introduisent. Les PRMTs de type I catalysent la monométhylation ou la diméthylation asymétrique au niveau des azotes « périphériques », ou  $\omega$ -N, des groupements guanidio des résidus arginines. Les PRMTs de type II catalysent sur ces mêmes atomes la monométhylation et la diméthylation symétrique. Quant aux PRMT de type III, elles catalysent une réaction de monométhylation au niveau de l'azote « interne », ou δ-N, du groupement guanidium des arginines. Aucun membre n'a cependant encore été caractérisé pour cette famille. Onze PRMTs ont été identifiées chez l'homme à ce jour, dont 6 peuvent méthyler les histones : PRMT1, 4, 5, 7, 8 et 9 (Pal and Sif, 2007).

Les premières protéines à avoir été découvertes font partie des PRMTs de type I. En ce qui concerne la méthylation des histones, on y retrouve les enzymes PRMT1, PRMT4, aussi connu sous le nom de CARM1 (pour *Coactivator Associated Arginine Methyltransferase I*), et PRMT8 (pour une revue (Pal and Sif, 2007)). PRMT1 méthyle divers substrats au niveau de régions RGG (où R est une arginine et G une glycine) et active la transcription en réponse à des coactivateurs de la famille des récepteurs nucléaires notamment en méthylant l'histone H4 sur son arginine 3 (Barrero and Malik, 2006). De son côté, pour activer la transcription, CARM1 s'est révélée pouvoir méthyler l'histone H3 aussi bien sur ses résidus N-terminaux H3R2, H3R17 et H3R26, que sur ses arginines en C-terminale H3R128, H3R129, H3R131 et H3R134 (Schurter et al., 2001). D'autres études ont également démontré que CARM1 modifie certains coactivateurs tels que P300. Le rôle de PRMT8 reste quant à lui encore à déterminer. Néanmoins, son expression exclusive dans le cerveau et sa localisation au niveau de la membrane plasmique en font une PRMT unique (Lee et al., 2005b).

Le deuxième type de PRMTs regroupe les enzymes PRMT5, PRMT7 et PRMT9. PRMT5 a ceci d'intéressant que c'est pour le moment la seule PRMT à induire une répression de la transcription. En effet, en méthylant par exemple les résidus H3R8 et H4R3 des promoteurs de gènes spécifiques comme celui de la cycline E, PRMT5 réprime leur expression. Mais la protéine intervient aussi dans de nombreux autres processus tels que l'élongation de la transcription ou encore l'épissage de l'ARN (Le Guezennec et al., 2006). Par ailleurs, PRMT7 a la faculté de méthyler l'arginine 3 de l'histone H4 et contribue de cette façon au mécanisme d'empreinte parentale dans les cellules germinales embryonnaires mâles (Jelinic et al., 2006). Quant à PRMT9, si sa fonction biologique est indéterminée, il est capable de méthyler les histones H2A et H4 *in vitro* (Cook et al., 2006).



<u>Figure 21</u> : Spécificités de site et de degré de méthylation des histone-méthyltransférases (HMTs) et histone-déméthylases (HDMs), adaptée de (Shi and Whetstine, 2007). Seules les protéines agissant sur des résidus lysines sont répertoriées. Chaque famille d'enzyme est représentée par une couleur particulière. Les HMTs sont signalées à gauche et les HMDs à droite. Le degré de méthylation/déméthylation est indiqué par les flèches. Les HMTs avec une flèche grise n'ont pas été analysées du point de vue de leur degré de méthylation. Les flèches en pointillés indiquent une faible occurrence pour les réactions de méthylation ou de déméthylation. Plus de détails figurent dans le texte.

## (ii) Les histone-déméthylases (HDM)

Des études récentes ont permis de mettre à jour des enzymes capables d'enlever la méthylation de certains résidus lysines des histones : les histones-déméthylases (HDM). Aucune protéine opérant le même type de réaction sur les résidus arginines n'a cependant été découverte à ce jour.

La première HDM à avoir été identifié est la protéine LSD1 (pour *Lysine-Specific Demethylase 1*) (Shi et al., 2004). Il a été observé que cette enzyme déméthyle spécifiquement les résidus H3K4me1 et H3K4me2 par une réaction d'oxydation du groupement amine rendue possible grâce à une molécule de flavine présente au sein de la protéine (Fig.21). Pour ce faire, LSD1 doit néanmoins interagir avec les protéines CoREST et BHC80 (pour *BRAF HDAC2 Complex protein 80 kDa*) (Shi et al., 2005). De plus, lorsqu'elle s'associe avec le récepteur aux androgènes, sa spécificité est changée pour les acides aminés H3K9me1 et H3K9me2 pour lui permettre d'activer la transcription des gènes en réponse aux androgènes (Metzger et al., 2005). Par ailleurs, en plus des interactions entre protéines, les modifications environnantes affectent l'activité de LSD1. En effet, il a été montré que l'acétylation de la lysine 9 sur la même queue d'histone H3 augmente de presque six fois son activité, alors que la phosphorylation de la S10 l'abolit complètement (Forneris et al., 2005).

La découverte de LSD1 a orienté les recherches en quête d'autres HMDs vers les protéines nucléaires douées d'une activité dioxygénase envers les groupements méthyles de résidus lysines. C'est ainsi que les enzymes contenant le domaine *Jumonji C* (JmjC) ont été proposées comme candidats pour le rôle d'histone-déméthylases (Trewick et al., 2005). Ces protéines, qui nécessitent un atome de fer pour leur activité catalytique, sont au nombre d'une trentaine dans le génome humain et peuvent être organisées en six familles distinctes selon les homologies et l'organisation des domaines (Fig.21) (Volkel and Angrand, 2007).

La famille JHDM1 (pour *JmjC-containing Histone Demethylase 1*) comprend deux protéines apparentées qui déméthylent spécifiquement les résidus H3K36me1 et H3K36me2 (Fig.21) (Tsukada et al., 2006).

Trois enzymes appartiennent à la famille JHDM2 parmi lesquelles la protéine JHDM2A a montré pouvoir déméthyler H3K9me1 et H3K9me2 (Fig.21) (Yamane et al., 2006). En outre, les membres de ce groupe ont tendance à s'associer avec des récepteurs nucléaires aux hormones.

La famille JHDM3 est composée de quatre enzymes auxquelles vient s'ajouter une protéine potentielle. Les quatre HDM caractérisées agissent soit sur H3K9me2 ou -3, soit sur

H3K36me2 ou -3 (Fig.21). JMJD2A est de plus impliquée dans la répression transcriptionnelle, notamment par le recrutement de déacétylases et du co-répresseur N-CoR (Whetstine et al., 2006).

Des trois dernières classes de protéines à domaines JmjC, seule la famille UT (pour *Ubiquitously transcribed Tetratricopeptide repeat gene*) a pour le moment été associée à une activité histone-déméthylase. Il s'avère en effet que les protéines JMJD3 et UTX assurent la déméthylation de H3K27me2 ou -3 (Lan et al., 2007). Les deux autres groupes sont la famille JARID (pour *Jumonji At-Rich Interactive Domain*) qui contient 5 membres qui possèdent tous un domaine de liaison à l'ADN et/ou d'association à la chromatine, et la famille PHF (pour *PHD Finger protein*) dont les deux représentants arborent un motif en doigt de zinc de type PHD (pour *Plant HomeoDomain*) suggérant une fonction au niveau de la chromatine (pour une revue (Volkel and Angrand, 2007)).

L'absence, pour le moment, d'enzymes capables d'enlever les groupements méthyles sur les lysines H3K79 et H4K20 laisse entrevoir l'existence d'autres HDM qui restent à découvrir (Fig.21) (pour une revue (Shi and Whetstine, 2007)).

#### c) Les protéines et complexes à activité kinase ou phosphatase

La phosphorylation des histones, et plus particulièrement de la queue d'histone H3, est particulièrement dynamique au cours du cycle cellulaire. Cette fine régulation du niveau de phosphorylation est assurée par les protéines à activité kinase, qui ajoutent un phosphate provenant d'une molécule d'ATP à une sérine ou une thréonine (pour une revue (Houben et al., 2007)), et par les protéines à activité phosphatase, qui enlèvent la modification (pour une revue (Nowak and Corces, 2004)). Ces enzymes ne sont en général pas spécifiques des histones et peuvent phosphoryler ou déphosphoryler d'autres protéines. Toutefois, nous ne nous intéresserons ici qu'à leur activité catalytique ciblant les histones.

#### (i) Les kinases

Les kinases modifiant les histones qui sont les plus étudiées sont les enzymes de la famille des kinases Aurora, des protéines conservées de la levure à l'homme, en passant par *C. elegans* et *D. melanogaster*. Aussi, chez l'homme notamment, Aurora A et Aurora B ont montré pouvoir phosphoryler H3 aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Crosio et al., 2002). Bien que toutes deux soient essentiellement présentes pendant la mitose, leur localisation est totalement exclusive. De plus, Aurora B est particulièrement intéressant de par son efficacité accrue

durant cette phase du cycle cellulaire et son éventuelle implication dans la condensation de la chromatine et la ségrégation des chromosomes. Ce point étant sujet à controverse, il sera abordé dans la partie discussion de ce manuscrit.

Aurora B peut ainsi phosphoryler la S10 de l'histone H3, mais également H3S28 (Goto et al., 2002) ou le variant d'histone CENP-A sur son résidu S7 (Zeitlin et al., 2001). En outre, cette kinase s'avère en fait être la sous-unité catalytique d'un complexe incluant les protéines INCENP (pour *INner CENtromer Protein*), survivine et boréaline : le complexe passager du chromosome (CPC pour *Chromosomal Passenger Complex*) (pour une revue (Vader et al., 2006)). Ce complexe, localisé au niveau du centromère pendant la prométaphase et la métaphase, est important pour l'alignement des chromosomes et la cytocinèse. Il a récemment été montré que la kinase Aurora C peut remplacer Aurora B dans ce complexe et permettre à son tour la phosphorylation de H3 (Li et al., 2004).

La kinase NIMA (pour *Never In Mitosis gene A*) est une autre kinase requise pour la phosphorylation mitotique de H3S10 et la condensation chromosomique chez *Aspergillus nidulans* (De Souza et al., 2000). L'homme compte au moins onze kinases de type NIMA dont l'homologue NEK6 de la protéine de plante qui pourrait également cibler l'histone H3 (Hashimoto et al., 2002).

JIL-1 est quant à elle la kinase de drosophile impliquée dans la phosphorylation de H3S10 en interphase (pour une revue (Johansen and Johansen, 2006)). Elle est donc associée à l'activation de la transcription. Chez les mammifères, la phosphorylation de H3S10 ou H3S28 en interphase est notamment catalysée par des MAP kinases (pour *Mitogen-Activated Protein kinases*) telles que MSK1/2 (pour *Mitogen- and Stress-activated protein Kinase 1/2*) en réponse au stress (pour une revue (Clayton and Mahadevan, 2003)). D'autre part, la kinase Cot chez l'homme, a dernièrement été révélée comme jouant un rôle dans la transformation cellulaire par le biais de la stimulation de la transcription du gène *c-fos* suite à la phosphorylation de H3S10 (Choi et al., 2007).

D'autres kinases ont été isolées dans le cadre de la phosphorylation d'autres résidus de l'histone H3. On recense ainsi chez les mammifères la kinase Haspin (pour *Haploid germ cell-specific nuclear protein*) qui cible le résidu H3T3 en mitose (Dai et al., 2006) ; l'enzyme Dlk/ZIP (pour *DAP-like kinase/Zipper Interacting Protein*) qui semble phosphoryler l'histone H3 également en mitose sur sa thréonine 11 (Preuss et al., 2003) ; et la Mst1 (pour *Mammalian sterile twenty kinase 1*) qui modifie dans les cellules apoptotiques l'histone H2B sur sa sérine 14 (Cheung et al., 2003).

## (ii) Les phosphatases

L'importante variation du niveau de phosphorylation des histones au cours du cycle cellulaire suggère l'intervention de phosphatases. Il s'avère en effet qu'il existe, notamment pour la régulation de la phosphorylation en mitose, des paires kinases-phosphatases qui agissent conjointement pour maintenir un état de phosphorylation adéquat au niveau des nucléosomes (pour une revue (Nowak and Corces, 2004)). Plusieurs études ont révélés l'implication de deux enzymes majeures dans cette régulation.

La phosphatase PP1 (pour *Protein Phosphatase type 1*) a ainsi été montrée associée à la kinase Aurora B pour déphosphoryler l'histone H3 dès la fin de la mitose (Murnion et al., 2001). Les deux enzymes antagonistes semblent de plus former un complexe afin de pouvoir agir plus efficacement dans cette phase cruciale du cycle cellulaire qu'est la mitose (Sugiyama et al., 2002). Cette même étude rapporte également l'association de la phosphatase PP2A avec la kinase mitotique. Cette phosphatase étant plus souvent responsable de la régulation de l'activité des protéines kinases (Millward et al., 1999), et la kinase Aurora B pouvant s'autophosphoryler sur son résidu T232 (Yasui et al., 2004), PP2A agit probablement sur la kinase elle-même plutôt que sur les histones dans ce cas de figure. D'autre part, il a récemment été observé que l'intervention des phosphatases PP1 et PP2A est également importante pour le bon déroulement de la méiose dans des oocytes de souris (Swain et al., 2007).

La phosphatase PP2A semble en fait davantage liée au contrôle du niveau de phosphorylation dans un contexte de régulation de la transcription en interphase. Il a ainsi été montré chez la drosophile que la transcription des gènes de réponse au choc thermique, les gènes *heat-shock*, est accompagnée de la phosphorylation de H3 sur S10 tandis que cette modification disparaît du reste du génome. Or des expériences de mutations ou d'inhibition de PP2A laissent supposer que cette déphosphorylation massive est l'œuvre de la phosphatase (Nowak et al., 2003).

Enfin, la phosphatase PP2C $\gamma$  a dernièrement été impliquée dans la déphosphorylation de H2B de même que celle de H2A.X, dans le processus de passage du point de contrôle instauré suite à un endommagement de l'ADN (Kimura et al., 2006).

## 3. Les protéines capables de lier les modifications d'histones

Les modifications post-traductionnelles peuvent remplir leur fonction par leur seule présence sur les histones ou par l'intervention de protéines intermédiaires qu'elles recrutent au niveau de la chromatine. Une grande partie de ces modifications constituent ainsi des sites de liaison pour une variété de protéines. Pour ce fixer de la sorte à la chromatine, les protéines en question possèdent des domaines spécifiques capables de reconnaître un type de modification précis. De tels domaines ont été isolés pour la plupart des modifications touchant les histones y compris l'ubiquitination (de Napoles et al., 2004), la sumoylation (Shiio and Eisenman, 2003) ou encore l'ADP-ribosylation (Karras et al., 2005). Toutefois, comme dans la partie précédente, seules les interactions impliquant l'acétylation, la méthylation ou la phosphorylation des nucléosomes seront traitées ici (pour une revue (Seet et al., 2006)).

## a) Les domaines de liaison aux acétylations et quelques exemples de protéines en étant pourvues

L'acétylation d'un résidu lysine crée un site d'ancrage pour un domaine protéique appelé bromodomaine (Jeanmougin et al., 1997; Yang, 2004). Ce module tire son nom de la première protéine dans laquelle il a été découvert : la protéine de drosophile Brahma (Tamkun et al., 1992). Il a ensuite été retrouvé dans plusieurs protéines associées à la chromatine et la plupart des HATs (pour une revue (de la Cruz et al., 2005)).

De nombreuses études ont conduit à l'identification de diverses fonctions pour le bromodomaine (pour une revue (Yang, 2004)). Tout d'abord, le module étant présent dans une grande partie des HATs, à savoir chez l'homme les protéines de la famille GNAT, celles du groupe CBP/P300, et en deux exemplaires dans TAF1, il intervient dans la régulation de l'expression génique par le biais de l'acétylation de la chromatine (de la Cruz et al., 2005). Il a par exemple été révélé chez S.cerevisiae que le bromodomaine de GCN5 est nécessaire pour l'association du complexe SAGA avec la chromatine acétylée et le remodelage de la chromatine qui s'en suit (Hassan et al., 2002).

Une autre fonction importante du bromodomaine est de lier l'activité des complexes ATP-dépendants de remodelage de la chromatine à l'acétylation de lysines spécifiques. Dans le cas du gène humain *IFN-\beta*, le complexe SWI/SNF, grâce à ces enzymes contenant un bromodomaine BRM et BRG1, est recruté sur le promoteur où il reconnaît H4K8ac et induit le remodelage de la chromatine. Ceci permet à son tour la liaison de TFIID aux lysines

acétylées 9 et 14 de l'histone H3 via le double bromodomaine de sa sous-unité TAF1 (Agalioti et al., 2002).

Par ailleurs, la reconnaissance sélective des sites acétylés des queues d'histones par les bromodomaines a récemment été établie *in vivo* par des expériences de FRET (pour *Fluorescence Resonance Energy Transfert*). Pour exemple, il a ainsi été démontré que TAF1 peut reconnaître tous les histones à l'exception de H2A, tandis que PCAF ne semble reconnaître que les histones du cœur H3 et H4 (Kanno et al., 2004).

Enfin, il apparaît que les bromodomaines sont aussi présents au sein de certaines HMTs telles que MLL chez l'homme (Caldas et al., 1998). Or la méthylation de H3K4 par cette enzyme est stimulée *in vitro* par un peptide H3 acétylé et permet l'activation de l'expression de gène *Hox*. Le bromodomaine de MLL semble donc lui permettre de remplir pleinement son rôle d'activateur transcriptionnel (Milne et al., 2002).

# b) Les domaines de liaison aux méthylations et quelques exemples de protéines en étant pourvues

Contrairement au bromodomaine qui est l'unique représentant des domaines de reconnaissance des lysines acétylées, plusieurs types de domaines ont montrés être impliqués dans la fixation des protéines aux lysines méthylées (pour une revue (Volkel and Angrand, 2007)). On distingue alors le chromodomaine (pour *CHRomatin Organisation MOdifier*), la répétition WD40 (pour *Tryptophane-Aspartic-acid-repeat every 40 residues*), le domaine Tudor, le domaine MBT (pour *Malignant Brain Tumor*), et le doigt de zinc de type PHD.

### (i) Le chromodomaine

Le chromodomaine est le premier à avoir été découvert chez la drosophile au sein des protéines HP1 et Polycomb (Paro and Hogness, 1991). HP1 est depuis l'une des protéines se liant à la chromatine les plus étudiée. Les trois isoformes de cette protéine chez l'homme, HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$ , et HP1 $\gamma$ , sont ainsi toutes capables de lier le site H3K9 diméthylé ou triméthylé (Nielsen et al., 2001). Cependant, tandis que HP1 $\alpha$  se montre spécifique de l'hétérochromatine constitutive, HP1 $\beta$  et surtout HP1 $\gamma$  apparaissent aussi dans l'euchromatine. Le rôle principal des protéines HP1, quelle que soit leur isoforme, consiste en l'élaboration de l'hétérochromatine par l'intermédiaire d'autres protéines auxquelles elles s'associent comme les protéines de la famille TIF1 (pour *Transcription Intermediary Factor* 

*I*) (Nielsen et al., 1999). Néanmoins, elles ont aussi montré assurer de nombreuses autres fonctions (pour une revue (Hiragami and Festenstein, 2005)).

De façon similaire aux protéines HP1, la protéine à chromodomaine Polycomb lie spécifiquement les résidus H3K27 méthylés et y recrute d'autres protéines afin de réprimer les gènes qu'il contrôle (Muller et al., 2002).

Une autre protéine contenant deux chromodomaines a montré faire partie du complexe SAGA de levure : la protéine CHD1. Grâce à ses deux motifs, CHD1 reconnaît la lysine K4 méthylée de l'histone H3 et favorise le recrutement de SAGA de même que son activité HAT au niveau du promoteur (Flanagan et al., 2005).

## (ii) La répétition WD40

La protéine WDR5 (pour *WD40 Repeat protein 5*), appartenant à un complexe incluant l'histone méthyltransférase MLL, peut également lier le site H3K4 méthylé (Wysocka et al., 2005). Cependant, à la différence de CHD1, l'interaction se fait ici grâce à un domaine constitué de répétitions WD40. Il s'agit d'un motif contenant environ sept régions d'une quarantaine d'acides aminés qui se terminent généralement par les résidus tryptophane (W) et acide aspartique (D) et adopte une structure circulaire de type  $\beta$ -propulseur (ou  $\beta$ -propeller). WDR5 se fixe alors préférentiellement à H3K4me2 et s'avère nécessaire pour maintenir le niveau global de triméthylation sur ce même acide aminé, probablement à travers le recrutement de l'activité méthyltransférase de MLL (Dou et al., 2005).

En outre, il a récemment été démontré qu'une nouvelle sous-unité du complexe dSAGA de drosophile, nommée WDA (pour *Will Decrease Acetylation*), possède également un domaine WD40 et pourrait intervenir dans l'acétylation de H3 durant le développement (Guelman et al., 2006).

#### (iii) Le domaine Tudor

Le domaine de type Tudor est l'unique domaine actuellement connu pour la reconnaissance des arginines méthylées à la surface des histones (Kim et al., 2006). En effet, il permet par exemple à la protéine SMN (pour *Survival of Motor Neuron*) dans laquelle il figure, protéine apparaissant mutée dans l'atrophie spinal musculaire, de se lier à une arginine diméthylée symétriquement au sein du nucléosome (Friesen et al., 2001).

D'autre part, le domaine Tudor se révèle aussi être un motif de liaison de lysines méthylées. On le retrouve dans la protéine 53BP1 où il offre la capacité de reconnaître les
sites de lésions de l'ADN en s'associant aux résidus H3K79 méthylés devenus accessibles (Huyen et al., 2004). Il est aussi présent en deux exemplaires dans l'histone déméthylase JMJD2A dans laquelle il permet de lier les modifications H3K4me3 et H4K20me2/3 (Huang et al., 2006).

#### (iv) Le domaine MBT

Le domaine MBT manifeste plus d'affinité pour les lysines monométhylées. Néanmoins, s'il confère à la protéine L3MBT1L la faculté de reconnaître H4K20me1 et H1bK26me1, il peut aussi lier les formes diméthylés de ces résidus. Par ce mécanisme, la chromatine est en quelque sorte « scellée » et l'expression génique réprimée (Trojer et al., 2007). Un autre répresseur transcriptionnel, la protéine humaine SFMBT (pour *Scm-like with Four MBT domains protein*), arbore quatre domaines MBT en tandem requis pour sa liaison à la queue d'histone H3 et sa fonction de répression (Wu et al., 2007).

#### (v) Le doigt de zinc de type PHD

Enfin, le dernier motif de reconnaissance des lysines méthylées, et non des moindres, est le doigt de zinc de type PHD (pour une revue (Mellor, 2006b)). Ce domaine peut aussi bien promouvoir l'expression des gènes que leur répression par le biais de son interaction avec des H3K4me3. Il a en effet été montré que la présence du motif au sein de la protéine BPTF (pour *Bromodomain and PHD finger-containing Transcription Factor*), une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant NURF, est associée à la réorganisation chromatinienne (Wysocka et al., 2006), tandis que dans la protéine suppresseur de tumeur ING2 (pour *INhibitor of Growth protein 2*), il est impliqué dans la répression de la transcription en collaboration avec un complexe mSin3-HDAC1 (Li et al., 2006).

# c) Les domaines de liaison aux phosphorylations et quelques exemples de protéines en étant pourvues

Bien que le domaine SH2 (pour *Src Homology region 2*) de liaison aux acides aminés phosphorylés fut l'un des premiers motifs de reconnaissance de résidus modifiés à avoir été caractérisé, peu de protéines à ce jour sont connues pour leur interaction avec des lysines ou thréonines phosphorylées à la surface des histones (pour une revue (Seet et al., 2006)). On compte ainsi uniquement deux types de protéines dans ce cas : la protéine 14-3-3, qui peut se

fixer à la sérine 10 phosphorylée par son domaine SH2 (Macdonald et al., 2005), et la protéine MDC1 (pour *Mediator of DNA-damage Checkpoint protein-1*) qui se lie à  $\gamma$ H2A.X139p par son domaine tandem BRCT (pour *BReast Cancer-susceptibility protein-1 C-Terminal*) suite à l'endommagement de l'ADN. Dans cette dernière interaction, MDC1 va servir à recruter les facteurs nécessaires pour la réparation de la cassure double-brin sur le site de la lésion (Stucki et al., 2005).

#### 4. Le dialogue entre les modifications d'histones

La grande abondance de modifications sur les queues d'histones a mené à l'hypothèse de leur interdépendance aujourd'hui vérifiée et admise. De nombreuses études durant ces cinq dernières années ont en effet montré qu'une modification donnée pouvait à son tour influencer positivement ou négativement la modification d'un autre résidu présent sur le même histone, ou sur un histone différent (Margueron et al., 2005). Les divers types de modifications pouvant avoir lieu sur les résidus lysines laissent déjà entrevoir la possibilité de compétition entre ces modifications vis-à-vis d'un même acide aminé. Mais l'addition de nouveaux groupements au côté de modifications déjà présentes sur la queue d'histone peut également favoriser, ou au contraire empêcher, la liaison d'une protéine sur son site de reconnaissance. Le meilleur exemple est celui de la phosphorylation de H3S10 qui interfère dans la liaison de la protéine HP1, quelle que soit son isoforme, sur H3K9me3 comme il sera décrit en III.C.5.c (Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2005).

#### a) Les influences entre modifications d'histones en CIS

La plupart des études ayant révélés des influences entre modifications d'une même queue d'histone ont porté sur l'extrémité N-terminale de l'histone H3. Le premier cas avéré d'une telle interdépendance entre modifications a été découvert suite à des expériences menées sur les protéines recombinantes à activité HAT GCN5, PCAF et P300 (Clements et al., 2003). Il apparaît en effet que H3S10p favorise la reconnaissance de la queue d'histone H3 par ce type d'HAT, et stimule ainsi l'acétylation de l'histone en H3K14 (Fig.22).

Dans un contexte mitotique, H3S10p a pendant longtemps été considérée comme étant incompatible avec la méthylation de la lysine 9 (Rea et al., 2000). Cette constatation fut à l'origine d'un modèle proposant que la séquence d'acides aminés autour de H3K9 et H3S10 formait un commutateur binaire, où une phosphorylation de la sérine ferait disparaître d'une

façon ou d'une autre la méthylation de K9 pour déstabiliser les protéines de type HP1 et autoriser la condensation des chromosomes (Fischle et al., 2003a). Cependant, plusieurs études, incluant celle présentée dans ce manuscrit de thèse, ont depuis prouvées que la phosphorylation de H3S10 et la méthylation de H3K9 peuvent avoir lieu sur la même queue d'histone (Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2005; Mateescu et al., 2004). La méthylation persiste donc tout au long de la mitose, malgré la phosphorylation qui provoque le départ de HP1 $\alpha$ , - $\beta$ , ou  $\gamma$ .

D'autre part, l'influence de la méthylation de certaines lysines de H3 sur son acétylation a été constatée à plusieurs reprises. Ainsi, la méthylation de H3K4 par l'histoneméthyltransférase SET7 facilite l'acétylation de H3 mais aussi de H4 par P300 tandis que la méthylation de H3K9 l'inhibe (Fig.22) (Taverna et al., 2007; Wang et al., 2001a).

Méthylation et acétylation pouvant tous deux avoir lieu sur des résidus lysines, il arrive parfois que l'on assiste à des phénomènes d'alternance entre ces deux résidus pour parvenir à une fine régulation de l'expression des gènes. C'est le cas par exemple chez les mammifères sur le promoteur du gène codant pour la dihydrofolate-réductase dont la transcription est dépendante du facteur E2F (Nicolas et al., 2003). Il a ainsi été observé que le promoteur est fortement méthylé sur ses histones H3 au niveau de la lysine 9 en phase G0, phase durant laquelle le gène est réprimé, puis la méthylation cède progressivement la place à l'acétylation qui atteint son taux maximum en phase G1/S, lorsque le gène peut être transcrit. La balance entre la méthylation et l'acétylation de H3K9 sur le promoteur définit donc le niveau d'expression du gène en fonction du cycle cellulaire.

La diméthylation des résidus arginines H3R2, H3R8 et H3R17 a, pour sa part, montré augmenter la biotinylation de H3K4, H3K9 et H3K18 respectivement, tandis que la phosphorylation de H3S10 abolit la biotinylation de H3K9 (Kobza et al., 2005). De surcroît, comme il a été évoqué précédemment, la méthylation des arginines est régulée, directement ou indirectement, par la déimination (Thompson and Fast, 2006).

L'isomérisation de H3P38 interfère quant à elle dans la méthylation de H3K36 par la méthyltransférase SET2 (Nelson et al., 2006).

En ce qui concerne l'histone H4, la méthylation de son résidu R3 par PRMT1 est sévèrement altérée par l'acétylation de la queue d'histone, alors que, étonnamment, H4K8ac et H4K12ac sont plus élevées après la méthylation de R3 (Wang et al., 2001b). De même les modifications H4K20me et H4K16ac semblent s'inhiber l'une l'autre (Fig.22) (Nishioka et al., 2002).

Au niveau de l'histone H2B, il a été démontré chez la levure que la déacétylation de la lysine 11 par la HDAC HOS3 est nécessaire pour permettre la phosphorylation de la S10 par la kinase STE20 qui conduit à la mort cellulaire (Ahn et al., 2006).

Un dernier exemple est celui de la sumoylation des lysines des histones H2A, H2B et H4, associée à la répression de la transcription, puisqu'elle entre en compétition avec d'autres modifications pouvant toucher ces lysines et ayant un effet activateur sur la régulation de la transcription telles que l'acétylation ou l'ubiquitination (Iniguez-Lluhi, 2006).



<u>Figure 22</u>: Représentation des principaux évènements d'interdépendance entre modifications d'histones en CIS et en TRANS chez les mammifères, adaptée de (Margueron et al., 2005). L'extrémité N-terminale de chaque histone a été détaillée de même que l'extrémité C-terminale des histones H2A et H2B, tandis que le domaine du cœur de l'histone est représenté par le motif HFD (pour Histone Fold Domain). Sont répertoriées les modifications de type acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination et ADP-ribosylation ayant été identifiées in vivo. A chacune de ces modifications a été attribué un drapeau de couleur spécifique comme indiqué dans la légende. L'emplacement des acides aminés modifiés par rapport au premier résidu N-terminal est annoté en-dessous de chacun d'eux. Les influences positives sont représentées par des flèches au-dessus des queues d'histones et portant la couleur de l'histone d'où elles proviennent. Les influences négatives, quant à elles, sont représentées par des flèches en pointillés en dessous des queues d'histones et portant aussi la couleur de l'histone d'où elles proviennent.

#### b) Les influences entre modifications d'histones en TRANS

Le cas le plus étudié de dialogue entre deux modifications siégeant sur deux histones différents est celui de la régulation de la méthylation des lysines 4 et 79 de H3 par l'ubiquitination de H2BK123 chez la levure. Il apparaît en effet que l'ubiquitination de H2BK123 par RAD6 (pour *RADiation sensitive protein 6*) est importante au moins pour la triméthylation de H3K4 *in vivo*, la question de sa nécessité pour les autres degrés de méthylation étant plus controversée (Shukla et al., 2006). Une interdépendance équivalente pourrait avoir lieu chez l'homme (Fig.22) (Kim et al., 2005).

Dans un autre registre, de la même façon qu'elle favorise l'acétylation de H3, la méthylation de H3K4 par SET7 facilite l'acétylation de l'histone H4 par P300. De plus, ici aussi, la méthylation de H3K9 altère les évènements d'acétylation sur H4 (Fig.22) (Taverna et al., 2007; Wang et al., 2001a).

# 5. Le « code histone » et autres hypothèses sur le mécanisme de régulation de l'expression des gènes par les modifications d'histones

Au cours des années, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer comment l'expression des gènes peut être régulée par les modifications d'histones. Chacune d'elle tente à chaque fois d'intégrer les dernières données publiées dans le domaine et gagne ainsi en complexité.

#### a) L'hypothèse « électrostatique »

Pendant longtemps, l'hypothèse majeure concernant le mode d'action des modifications d'histones sur la régulation des processus cellulaires liés à l'ADN, hypothèse que l'on peut qualifier d'« électrostatique », s'appuyait principalement sur des travaux d'acétylation des histones au cours de l'activation transcriptionnelle.

Il semblerait que les queues des histones H3 et H4 soient en contact avec l'ADN nucléosomal (Baneres et al., 1997) ou l'ADN de jonction (Arya and Schlick, 2006). Cette interaction est assurée par l'attirance électrostatique existant entre les résidus lysines de ces queues, chargés positivement à pH cellulaire, et l'ADN chargé négativement. L'acétylation de ces résidus basiques, neutralisant leur charge, affaiblirait ces interactions. Il a ainsi été montré que l'acétylation de la queue de l'histone H4 réduit son affinité in vitro pour l'ADN (Hong et

al., 1993) et qu'elle inhibe la formation de la fibre compacte de 30nm (Shogren-Knaak et al., 2006). L'ADN deviendrait alors accessible aux facteurs de transcription (Lee et al., 1993).

Cependant, il s'avère que la méthylation des lysines n'altère pas leur charge et ne pourrait donc vraisemblablement pas agir sur le remodelage de la chromatine par un effet électrostatique. De plus, l'abondance des modifications potentielles, ainsi que la complexité des liens d'interdépendance, laissent supposer que les mécanismes moléculaires régulant l'état de compaction de la chromatine sont plus complexes que ceux proposés par l'hypothèse « électrostatique ».

#### b) L'hypothèse du « code histone »

Une hypothèse alternative, l'hypothèse du « code histone », propose que les modifications d'histones, en fonction de leur nature et du résidu sur lequel elles ont lieu, soient des sites de liaisons pour des protéines spécifiques entraînant un effet positif ou négatif sur l'expression des gènes (Strahl and Allis, 2000; Turner, 2000). Chaque modification d'histones ne véhiculerait alors qu'une unique réponse cellulaire (Henikoff, 2005). Le code histone serait en quelque sorte un simple code binaire, similaire à celui des ordinateurs se basant sur la permutation des 0 et des 1.

Toutefois, certaines modifications post-traductionnelles auxquelles il avait été attribué une action positive sur l'expression génique semblent aujourd'hui aussi bien recruter des activateurs que des inhibiteurs de la transcription. C'est le cas notamment des lysines méthylées H3K4 et H3K36 (Keogh et al., 2005; Shi et al., 2006).

#### c) L'hypothèse du « langage de la chromatine »

Plutôt que sur un simple code, il semblerait que le mécanisme de régulation transcriptionnelle repose sur un langage sophistiqué et nuancé de la chromatine où les modifications doivent être considérées dans un contexte génomique (Berger, 2007). Chaque marque ne trouverait alors sa signification qu'une fois qu'elle serait associée aux autres pour former une unité de régulation, de la même façon que les mots n'ont de sens qu'au sein d'une phrase.

Cette hypothèse est confortée par tous les résultats rapportant l'association de plusieurs modifications au sein d'un processus de régulation de la transcription ou de remodelage de la chromatine. C'est le cas par exemple du « commutateur binaire »

méthyl/phospho où H3K9me2 ou -3 et H3S10p contrôlent la fixation de HP1 sur la queue d'histone (Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2005). Un tel dispositif a également été mis en évidence au niveau de l'histone H1.4 entre les résidus K26 et S27 (Daujat et al., 2005). Un autre exemple est celui de l'observation de « domaines bivalents » dans les cellules de mammifères dans lesquels H3K4me3 et H3K27me3, deux modifications aux effets d'ordinaire opposés sur la transcription, collaborent pour réguler l'expression de gènes au cours de la différenciation (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006).

#### 6. Et la structure des queues d'histones dans tout ça ?

L'état structuré des queues d'histone reste également un sujet très controversé. S'il a longtemps été admis qu'elles sont totalement flexibles et dépourvues de toute conformation (Zheng and Hayes, 2003), il a néanmoins aussi été suggéré, suite à des expériences de dichroïsme circulaire, que les queues N-terminales des histones H3 et H4 peuvent adopter une structure en hélice  $\alpha$  lorsqu'elle se lie à l'ADN, alors que la conformation des queues des histones H2A et H2B est le plus souvent arbitraire (Baneres et al., 1997). En outre, de récentes données obtenues par simulation de dynamique moléculaire sur ordinateur vont également dans le sens de l'existence d'une interaction entre la queue d'histone H3 et l'ADN de jonction (La Penna et al., 2006)

Ces deux théories ne sont cependant pas nécessairement incompatibles. Il serait en effet envisageable, et certaines expériences l'ont prouvé, que les queues d'histones soient globalement flexibles, mais puissent adopter une conformation particulière, lors de certains processus cellulaires, sous l'effet d'une protéine ou de modifications post-traductionnelles. Cette hypothèse sera discutée dans la partie « Discussion – Perspectives » de la présente thèse.

#### **D.** Les variants d'histones

Au-delà des modifications post-traductionnelles que peuvent subir les histones, leur nature même est une donnée épigénétique dont le rôle est majeur pour le dynamisme de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes. En effet, chaque histone de la particule cœur, sauf H4, existe dans la cellule sous plusieurs formes protéiques, qui ont des homologies de séquences variables et sont codées par des gènes différents. L'ensemble de ces formes pour

chaque histone est regroupé sous le terme de « variants d'histones » (Fig.23) (pour une revue (Pusarla and Bhargava, 2005)).

Ces variants d'histones peuvent se distinguer des histones « conventionnels » par des différences subtiles, on les appelle alors histones majeurs, ou par des altérations significatives qui change la nature de l'histone de façon drastique et, probablement, modifie l'arrangement de la chromatine. Ces derniers variants portent le nom d'histones de remplacement. Les histones majeurs voient leur expression augmenter au cours de la phase S du cycle cellulaire, afin de répondre au besoin massif en histones nécessaires à l'assemblage en chromatine de l'ADN en cours de réplication. De leur côté, les histones de remplacement, minoritairement représentés, sont exprimés également en dehors de la phase S et peuvent être incorporés dans la chromatine indépendamment de la synthèse d'ADN (Wu et al., 1982).

Par ailleurs, de telles différences de séquences, accompagnées de l'intervention de protéines chaperonnes spécifiques chargées de déposer les variants d'histones sur leurs sites, leur confèrent des fonctions uniques et des localisations particulières au sein de la cellule. Aussi, les variants d'histones disposent de la capacité d'altérer l'organisation du nucléosome par des changements structuraux et des différences de charges provenant de la séquence des variants elle-même ou de l'effet des modifications post-traductionnelles qu'ils subissent (pour une revue (Bernstein and Hake, 2006)).

#### 1. Les variants de l'histone H2A

Les variants de l'histone H2A sont les plus nombreux et les plus diversifiés des variants d'histones identifiés à ce jour. On recense en effet deux formes de H2A majeures, H2A.1 et H2A.2 qui ne se différencient qu'au niveau de quelques acides aminés, et cinq ou six variants de remplacement, selon que les isoformes issues de l'épissage alternatif du variant macroH2A1 soient prises en compte ou non : H2A.X, H2A.Z, macroH2A1.1, macroH2A1.2, macroH2A2 et H2A.Bbd (Fig.23) (pour une revue (Perche et al., 2003)).

H2A.X est conservé dans tous les organismes où il a été étudié. Chez les mammifères, H2A.X est très similaire au H2A canonique. Il possède néanmoins une sérine spécifique à son extrémité carboxyterminale, S139, qui est phosphorylée en réponse aux cassures double-brin de l'ADN (Fig.23). Cette forme phosphorylée, qui joue un rôle important dans le processus de réparation de ces lésions, est répertoriée sous le nom de  $\gamma$ H2A.X (pour une revue (Fillingham et al., 2006)). Il a en outre été rapporté que ce même variant phosphorylé intervient dans le processus de l'apoptose où il est important pour la fragmentation de l'ADN (Lu et al., 2006). De son côté, le rôle du variant H2A.Z est bien plus énigmatique. Si certaines études démontrent qu'il est important pour l'activation de la transcription, il semble plutôt engagé dans la répression de l'expression des gènes chez les mammifères (pour une revue (Guillemette and Gaudreau, 2006)). Des expériences d'immunofluorescence et d'ARN interférence ont dévoilé une co-localisation de H2A.Z avec les protéines HP1 $\alpha$  au niveau de l'hétérochromatine des bras des chromosomes et un rôle pour le variant dans la ségrégation chromosomique (Rangasamy et al., 2004). L'effet de l'incorporation de H2A.Z dans le nucléosome est tout aussi controversé. Certaines études suggèrent que les nucléosomes contenant H2A.Z exhibent de plus faibles interactions intra- et intermoléculaires que ceux possédant H2A, entraînant une mobilité accrue de la sous-unité chromatinienne (Ramaswamy et al., 2005), tandis que d'autres plaident pour une augmentation de la stabilité du nucléosome lorsque l'histone conventionnel est remplacé par son variant (Thambirajah et al., 2006). De récentes données conduisent à l'hypothèse que de telles divergences dans les résultats pourraient être dues à la monoubiquitination qui peut avoir lieu sur H2A.Z et qui pourrait l'orienter vers l'une ou l'autre fonction (Sarcinella et al., 2007).

Le variant d'histone macroH2A est un variant spécifique des vertébrés qui consiste en un domaine de type H2A fusionné à une grande région C-terminale non-histone appelée macrodomaine et qui compte pour environ deux tiers de la protéine (Pehrson and Fried, 1992). Chez les mammifères, on recense trois formes différentes de macroH2A : macroH2A1.1, macroH2A1.2 et macroH2A2. macroH2A1 et macroH2A2 sont les produits de la transcription de deux gènes différents tandis que macroH2A1.1 et macroH2A1.2 sont issues de l'épissage alternatif du gène codant pour macroH2A1 (Fig.23) (Costanzi and Pehrson, 2001).

De nombreuses études ont montré que cette famille de variant joue un rôle essentiel dans l'établissement de l'hétérochromatine ou sa maintenance. Les variants macroH2A s'associent par exemple avec la chromatine condensée du chromosome X inactif, nommée corps de Barr (*Barr body*), qui se forme pendant le développement chez la femelle de mammifère (Costanzi and Pehrson, 1998). Par ailleurs, sur les autosomes, il inhibe la transcription notamment en empêchant le remodelage de la chromatine par SWI/SNF (Angelov et al., 2003), en interférant dans l'acétylation des histones par la HAT P300 (Doyen et al., 2006), ou encore en réduisant l'activité enzymatique de PARP1 (Ouararhni et al., 2006).

D'autre part, H2A.Bbd (pour *Barr body deficient*) a été identifié comme un variant de H2A qui est, au contraire de macroH2A, largement exclu du corps de Barr, ce qui suggère des

fonctions opposées pour ces deux variants dans la régulation de l'activité transcriptionnelle (Chadwick and Willard, 2001). Il est plus court que les autres variants de H2A et arbore une extension qui lui est propre constituée d'arginines en région N-terminale (Fig.23). Le nucléosome qui contient H2A.Bbd est plus mobile, ce qui soutient un éventuel rôle dans l'activation de la transcription (Gautier et al., 2004).

MacroH2A1.2 MacroH2A2 H2A.Bbd 🗉	<b>S K</b> <b>G R</b> 6 9 24 RRRRR <b>S R</b>		115 R \ R	5 122 12 K T K T K T K S	8	Macr	odoma ine ssoge K K Z38
H2B hTSH2B H2BFWT 📻	14 (S) 15 F 37 S						
H3.1 H3.2 H3.3 H3.11	24 31 A A A A A S 7	71 V V V N	87-90 SAVM SAVM AAIG SAVM	96 C S S C	98 A A A S	111 A A A V	

<u>Figure 23</u>: Représentation schématique des variants d'histones de mammifères, adaptée de (Bernstein and Hake, 2006). Les variants de l'histone H2A apparaissent en jaune, ceux de l'histone H2B en rouge et ceux de H3 en bleu. Les variants majeurs de H2A et H2B ne sont pas représentés, ni spH2B dont la séquence n'est pas encore connu. Quand les séquences protéiques sont très divergentes de celle de l'histone canonique, les variants sont représentés dans des dégradés de couleur. Les acides aminés son annotés uniquement lorsque de très faibles différences existent entre les variants (comme pour les variants de H3), ou lorsque ces acides aminés sont les sièges de modifications post-traductionnelles. Dans ce dernier cas, ils sont marqués comme suit : un triangle pour une acétylation, un carré pour une méthylation, un cercle pour une phosphorylation et un trapèze pour une ubiquitination. Les macrodomaines des variants macroH2A ne figurent pas à l'échelle et sont représentés par un triangle pour souligner le fait qu'il ne s'agisse pas de séquences de type histone. L'épissage alternatif à l'origine des formes macroH2A1.1 et macroH2A1.2 est matérialisé par des triangles blancs et noirs dans le macrodomaine.

Enfin, trois nouveaux variants de H2A spécifiques des cellules germinales mâles ont récemment été découverts. Deux d'entre eux, H2AL1 et H2AL2, localisés dans les régions péricentriques des spermatides en condensation, participent à la formation de nouvelles structures nucléoprotéiques (Govin et al., 2007).

#### 2. Les variants de l'histone H2B

En plus des deux variants majeurs H2B.1 et H2B.2, trois variants de remplacement ont été identifiés jusqu'à maintenant pour H2B : TSH2B, spH2B et H2BFWT (Fig.23). Leurs fonctions sont toutefois moins bien connues que celles des variants de H2A.

TSH2B (pour *Testis Sperm specific H2B*) et spH2B (pour *human SPerm specific H2B*) sont deux types de variants spécifiques des tissus testiculaires et des spermatozoïdes associés aux régions télomériques des chromosomes (Gineitis et al., 2000; Zalensky et al., 2002). Bien que spH2B ait été le premier à être découvert, il est le plus méconnu aujourd'hui. TSH2B, quant à lui, diffère principalement du H2B conventionnel au niveau de sa queue N-terminale qui, chez H2B, est nécessaire pour la condensation mitotique et apoptotique des chromosomes par le biais, entre autre, de la phosphorylation de sa sérine 14. Aussi, TSH2B ayant une phénylalanine (F) à cette position (Fig.23), il pourrait avoir un effet anti-apoptotique sur les cellules germinales (Kimmins and Sassone-Corsi, 2005).

H2BFWT (pour *H2B histone Family member W Testis specific*) est un autre variant apparaissant également exclusivement dans les testicules au niveau des télomères (Churikov et al., 2004). Malgré sa très faible homologie avec H2B, il semble se comporter de la même façon au sein du nucléosome. Cependant, il est incapable de recruter des facteurs de condensation des chromosomes ou de participer à l'assemblage des chromosomes mitotiques (Boulard et al., 2006).

Deux derniers variants de H2B, H2BL1 et H2BL2, spécifiques eux aussi des cellules germinales mâles, ont récemment été découverts mais leur fonction reste pour le moment inconnue (Govin et al., 2007).

#### 3. Les variants de l'histone H3

Concernant l'histone H3, deux variants d'histones majeurs, H3.1 et H3.2, et trois variants de remplacement, CENP-A, H3.3 et H3.1t, ont été identifiés à ce jour chez les mammifères (Fig.23) (pour une revue (Hake and Allis, 2006)).

CENP-A se distingue des autres variants par son extrémité N-terminale et est l'un des plus spécialisés du point de vue fonctionnel. Il est en effet spécifiquement localisé dans les régions centromériques, où il semble essentiel à la structure et à la fonction des centromères en participant directement à la formation d'un kinétochore actif (Sullivan, 2001). D'autre part, CENP-A a montré pouvoir être phosphorylé en mitose sur sa sérine 7 par Aurora B et est ainsi impliqué dans la cytocinèse (Fig.23) (Zeitlin et al., 2001).

De leur côté, H3.3 et H3.1t ne diffèrent dans leur séquence que de quelques acides aminés par rapport aux variants majeurs (Fig.23). H3.3 est hautement conservé à travers l'évolution et a été retrouvé dans les régions d'ADN ribosomique transcriptionnellement actives chez la drosophile (Ahmad and Henikoff, 2002). Dans des cellules humaines, ce variant s'accumule également dans les régions du génome dont la transcription a été activée, évènement qui s'accompagne de la perte de la méthylation de H3 sur la lysine 9 (Daury et al., 2006; Janicki et al., 2004). De plus, H3.3 est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles, notamment associées à l'activation transcriptionnelle lorsqu'il est intégré dans une région hautement transcrite (Hake et al., 2006; McKittrick et al., 2004). Une autre modification, la phosphorylation de sa sérine 31, résidu qui n'apparaît pas chez les variants majeurs, est catalysée sur la queue d'histone H3.3 durant la métaphase dans une région proche du centromère (Hake et al., 2005). Comme dans le cas des histones H3 majeurs, la fonction de H3.3 semble donc être régulée par les modifications qu'il subit.

Pour finir, contrairement à H3.3, la seule caractéristique connu de H3.1t, outre sa séquence, est son expression quasi-exclusive dans les testicules (Witt et al., 1996).

#### IV.La condensation mitotique de l'ADN

En 1882, Flemming décrivit un processus de division nucléaire qu'il appela mitose (M) (du grec *mito*, qui signifie filament) d'après l'apparence des chromosomes condensés

(Fig.24). Parce que les cellules semblaient n'être actives qu'au cours de la mitose, le reste du cycle cellulaire fut appelé interphase (ou « phase de repos »).

L'interphase est en fait la période du cycle cellulaire au cours de laquelle les cellules croissent et répliquent leur ADN. Elle se divise en trois parties (Fig.25). La phase G1 (pour *Gap 1* : premier intervalle) est l'intervalle entre la mitose et le début de la réplication de l'ADN. La phase S (pour Synthesis : synthèse) est la période durant laquelle l'ADN est répliqué. La phase G2 (pour *Gap 2* : second intervalle) est le laps de temps entre la fin de la réplication de l'ADN et le début de la mitose (pour une revue (Nurse, 2000)).

La phase G1 est typiquement la phase la plus longue et la plus variable du cycle cellulaire. La progression à travers G1 est régulée par deux points de contrôle du cycle cellulaire (ou



<u>Figure 24</u> : Illustration du livre *Zellsubstanz, Kern und Zellheilung,* 1882, (Substance cellulaire, Noyau et Division cellulaire) représentant les différentes phases de la mitose (Flemming, 1965).

*checkpoint*), le point de restriction et le point de contrôle des lésions de l'ADN en G1 (pour une revue (Russell, 1998)). Suite à une carence nutritive ou à un stimulus tel qu'un signal de différenciation, les cellules au point de restriction peuvent retarder leur progression dans le cycle cellulaire en phase G1 ou sortir du cycle et entrer en phase G0 (Fig.25). La phase G0 est une branche de la phase G1 dans laquelle les cellules sont stationnaires mais peuvent être physiologiquement très actives. Chez les organismes pluricellulaires, beaucoup de cellules différenciées afin d'exercer des fonctions spécialisées ne se divisent plus et sont en phase G0. Dans certains cas, les cellules en phase G0 peuvent être recrutées et entrer de nouveau dans le cycle cellulaire en réponse à des stimuli variés (pour une revue (Cooper, 2003)).

La réplication précise de l'ADN, qui est capitale pour la propagation et la survie des cellules, a lieu au cours de la phase S du cycle cellulaire. Cette phase est nécessaire pour que

le génome de la cellule mère puisse être réparti également entre les deux cellules filles. En général, les régions du génome transcrites activement se répliquent au début de la phase S, tandis que les régions d'hétérochromatine inactives se répliquent plus tard (pour une revue (Groth et al., 2007)).

Au cours de la phase G2, les cellules « corrigent sur épreuves » (*proofreading*) la structure de l'ADN et se préparent à la mitose. Si de l'ADN endommagé ou non répliqué est détecté, une cascade de protéines kinases se déclenche au point de contrôle des lésions de l'ADN en G2. Cette cascade aboutit à l'inactivation des kinases dépendantes des cyclines (CDK) nécessaires à l'entrée en mitose (pour une revue (O'Connell et al., 2000)).



<u>Figure 25</u>: Représentation de l'évolution de la morphologie cellulaire et de la structure chromosomique à travers les phases du cycle cellulaire, d'après (Pollard and Earnshaw, 2004). *Les points de contrôle (ou checkpoints) sont également annotés.* 

La mitose est l'étape au cours de laquelle les chromosomes et le cytoplasme se divisent pour former deux cellules filles. La ségrégation des chromosomes est contrôlée par le point de contrôle du fuseau, qui retarde le début de la séparation des chromatides sœurs jusqu'à ce que tous les chromosomes soient correctement alignés sur la plaque équatoriale du fuseau mitotique (pour une revue (Malmanche et al., 2006)). La mitose peut être décomposée

en au moins cinq phases distinctes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Fig.26).

La prophase se définit par le début de la condensation des chromosomes. Dans le cytoplasme, un changement considérable des propriétés dynamiques des microtubules s'accompagne de la séparation des centrosomes dupliqués qui entament chacun la nucléation d'un pôle du fuseau mitotique (Fig.26) (pour une revue (Gardner and Odde, 2006)).

La prométaphase débute lorsque l'enveloppe nucléaire se résorbe (chez les eucaryotes supérieurs), et que les chromosomes commencent à se fixer de façon aléatoire aux microtubules émanant des deux pôles du fuseau mitotique en formation. Une fois les deux kinétochores d'un même chromosome accrochés aux pôles opposés du fuseau, le chromosome se déplace lentement vers un point situé à mi-distance entre les pôles : la plaque équatoriale. Lorsque tous les chromosomes sont correctement alignés, la cellule est alors dite en métaphase (Fig.26) (Malmanche et al., 2006).

L'anaphase est annoncée par la brusque séparation des deux chromatides sœurs. Chacune d'elles se dirige alors vers l'un des deux pôles du fuseau, qui eux-mêmes s'éloignent l'un de l'autre (Fig.26). Pendant ce temps, l'enveloppe nucléaire se reforme autour de la chromatine. La cellule est à cet instant en télophase. Enfin, au cours de la télophase, un anneau contractile d'actine et de myosine s'assemble dans le cortex, tel une ceinture périphérique, à mi-distance entre les pôles et ressert la zone équatoriale de la cellule. Ce processus, appelé cytocinèse, sépare les deux cellules filles l'une de l'autre (pour une revue (Glotzer, 2005)).

Lors de la mitose, l'ADN traverse des étapes de condensation et de ségrégation, évènements cruciaux pour la transmission d'une copie du génome à chacune des deux cellules filles. Tandis que la cohésion entre chromatides est établie dès la phase S, de manière concomitante à la réplication de l'ADN, la condensation des chromosomes, initiée à partir du centromère, ne débute qu'en phase G2. Lors de la prophase, la condensation progresse en direction des télomères et atteint un maximum en métaphase. Les chromosomes restent alors compactés jusqu'à l'anaphase où, pendant que les chromatides se séparent, commence la décondensation progressive de l'ADN qui deviendra quasi-complète en télophase.

Les changements drastiques que ces étapes entraînent dans l'organisation de la chromatine sont le résultat de l'action concertée de nombreux effecteurs et régulateurs mitotiques associés probablement aux modifications post-traductionnelles mitotiques des histones telles que la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3.



<u>Figure 26</u>: Les différentes étapes de la mitose, adaptée de (Pollard and Earnshaw, 2004). Chaque phase de la mitose est représentée schématiquement et accompagnée d'une observation au microscope confocal de l'ADN marqué au Hoechst. Ces observations ont été effectuées au cours de mon travail de thèse.

#### A. Les facteurs protéiques de la condensation

On compte deux principaux types de facteurs protéiques intervenant dans la condensation de la chromatine pendant la mitose : les complexes à protéines SMC (pour *Structural Maintenance of Chromosomes*) et la topoisomérase II, plus particulièrement l'isoforme  $\alpha$  chez les vertébrés (pour une revue (Swedlow and Hirano, 2003)).

#### 1. Les complexes à protéines SMC

Les protéines SMC sont reconnues comme l'une des plus fondamentales classes de protéines qui régulent l'organisation structurale et fonctionnelle des chromosomes de la bactérie à l'homme (pour une revue (Losada and Hirano, 2005)). Ce sont de grands polypeptides, de 1000 à 1300 acides aminés, qui s'apparient au niveau de leur domaine « charnière » pour édifier des molécules en forme de « V » aux extrémités desquelles se trouvent des domaines de « tête » de liaison d'ATP (Fig.27) (Hirano and Hirano, 2002). Les bactéries ne contenant qu'un seul gène smc, les protéines en résultant vont former des homodimères. Par contre, la présence d'au moins six protéines SMC différentes chez les eucaryotes, SMC1, -2, -3, -4, -5 et -6, vont permettre la formation d'hétérodimères spécifiques. L'hétérodimère SMC1-SMC3 constitue ainsi le cœur du complexe cohésine, intervenant dans la cohésion des chromatides sœurs (Shintomi and Hirano, 2007), tandis que l'hétérodimère SMC2-SMC4 fait partie du complexe condensine qui est essentiel pour la condensation de l'ADN en chromosomes mais aussi pour la ségrégation de ces derniers en mitose comme en méiose (Fig.27) (Hirano, 2005). Les deux protéines restantes, SMC5 et SMC6, dont les séquences diffèrent davantage de celle des quatre autres protéines, forment un troisième complexe impliqué dans la réparation de l'ADN qui ne sera pas abordé ici (Lehmann, 2005).



<u>Figure 27</u>: Représentation schématique des complexes à protéines SMC des eucaryotes, adaptée de (Hirano, 2006). Les domaines charnières et de liaison d'ATP ont été annotés sur le complexe condensine I mais sont aussi présents dans les autres complexes.

#### a) Le complexe condensine

Chez les vertébrés, l'hétérodimère SMC2-SMC4 constitue la base de deux types de complexes condensine : la condensine I et la condensine II. Outre les protéines SMC, chacun

d'eux est composé de trois sous-unités non-SMC qui sont nécessaires pour l'activité de superenroulement de l'ADN par le complexe et peuvent être phosphorylées en mitose (Kimura and Hirano, 2000).

Les deux complexes participent à la condensation des chromosomes durant la mitose, mais agissent à des moments et des endroits différents au niveau du chromosome. Ainsi, la condensine II est principalement nucléaire pendant l'interphase, est contribue aux premières étapes de l'assemblage du chromosome en prophase. A l'inverse, la condensine I est séquestrée dans le cytoplasme de l'interphase à la prophase, et n'a accès aux chromosomes qu'après le démantèlement de l'enveloppe nucléaire en prométaphase (Ono et al., 2004). Par ailleurs, les deux complexes sont alternativement présents le long de la chromatide métaphasique, puis sont symétriquement répartis au niveau du centromère. Les condensines quittent ensuite progressivement les chromosomes durant la décondensation et redeviennent cytoplasmiques en G1.

Les mécanismes par lesquels la condensine participe à la condensation des chromosomes demeurent obscurs. Il semblerait qu'elle favorise, dans l'ADN auquel elle se lie, la création et la maintenance de boucles d'orientation positive en collaborant avec la topoisomérase I (Kimura and Hirano, 1997). A cela s'ajoute sa capacité d'introduire un super-enroulement positif de l'ADN en présence de topoisomérase II (Kimura et al., 1999). Ce remaniement de l'ADN aurait lieu grâce à des interactions intramoléculaires ou intermoléculaires entre les domaines de « tête » de liaison d'ATP (Fig.28).



<u>Figure 28</u>: Représentation schématique de deux mécanismes de condensation de l'ADN par les condensines, adaptée de (Hirano, 2006).

#### b) Le complexe cohésine

Le complexe cohésine est constitué de quatre sous-unités dont l'hétérodimère SMC1-SMC3 qui forme le cœur du complexe. Plusieurs études ont démontré que la sous-unité kléisine SCC1 (pour *Sister Chromatid Cohesion 1*), dont l'homologue chez l'homme est la protéine RAD21, ponte les domaines de « tête » de SMC1 et SMC3 (Haering et al., 2002). Son clivage protéolytique par une séparase au début de l'anaphase est une étape clef pour la séparation des chromatides sœurs (Uhlmann et al., 1999).

Le complexe cohésine semble en effet agir en tant que « lien » intermoléculaire entre deux brins d'ADN, ce qui expliquerait ses capacités d'agrégation de l'ADN *in vitro* (Losada and Hirano, 2001). Différents modèles ont alors été proposés pour tenter d'expliquer le

mécanisme par lequel le complexe cohésine permet la cohésion des chromatides sœurs (Fig.29) (pour une revue (Hirano, 2006)). Un premier modèle propose que chaque cohésine enlace les deux chromatides et interagisse avec les cohésines adjacentes par ses « tiges », ou domaines « coiled-coil », pour stabiliser la cohésion (Fig.29.A). Une autre possibilité serait que chaque cohésine ne prenne en charge qu'une seule des deux chromatides, mais parvienne à la cohésion en interagissant encore une fois avec les cohésines voisines par ses « tiges » (Fig.29.B). Enfin, la troisième hypothèse suggère que la cohésion ait lieu grâce à l'interaction intermoléculaire des domaines de « tête » des cohésines associées à l'une ou l'autre chromatide (Fig.29.C).



<u>Figure 29</u>: Différents modèles pour le mécanisme de la cohésion des chromatides sœurs par le complexe cohésine, adaptée de (Hirano, 2006). *Les détails sont dans le texte*.

Quoi qu'il en soit, la cohésine s'associe dès la phase S avec la chromatine en réplication. 95% s'en dissocie lors de l'entrée en mitose, remplacée par la condensine (Sumara et al., 2000). La cohésion entre chromatides est alors assurée par la fraction résiduelle de cohésine qui reste associée au centromère jusqu'à la transition métaphaseanaphase, lors de la séparation des chromatides, au cours de laquelle elle est définitivement écartée de la chromatine (Waizenegger et al., 2000).

#### 2. La topoisomérase IIa

Les topoisomérases de l'ADN sont une classe d'enzymes nécessaires à la résolution de problèmes topologiques lors de plusieurs processus liés au métabolisme de l'ADN, notamment la transcription, la réplication, la recombinaison et la dynamique des chromosomes mitotiques (pour une revue (Cortes et al., 2003)).

On distingue deux types d'ADN-topoisomérases. Les enzymes de type I, dont fait partie la topoisomérase I, ne nécessitent pas d'ATP. Elles catalysent le clivage d'un brin d'ADN puis font passer à travers la cassure le second brin d'ADN avant de refermer la coupure en fin de réaction. Les enzymes de type II quant à elles, qui comprennent les topoisomérases II $\alpha$  et II $\beta$  chez les mammifères, sont généralement dépendantes de l'ATP. Elles agissent en coupant les deux brins d'ADN pour faire passer cette fois-ci à travers la cassure une autre molécule d'ADN double brin intacte puis à nouveau refermer la coupure (Cortes et al., 2003).

Tandis que les topoisomérases de type I interviennent essentiellement dans les mécanismes de réplication, recombinaison et transcription (Leppard and Champoux, 2005) et que la topoisomérase II $\beta$  semble être associée à la régulation de l'expression des gènes, notamment lors de la réparation de l'ADN (Haince et al., 2006), la topoisomérase II $\alpha$  est l'un des principaux acteurs de la condensation des chromosomes en mitose. Il a en effet été montré qu'elle est particulièrement abondante sur les chromosomes mitotiques (Christensen et al., 2002). L'enzyme semble y jouer deux rôles cruciaux. Elle favorise, en collaboration avec la condensine, la ségrégation des chromosomes en permettant la résolution des chromatides sœurs (Coelho et al., 2003), et aide à la condensation des chromosomes par les complexes condensines, bien qu'elle ne semble pas absolument nécessaire pour ce dernier processus (Carpenter and Porter, 2004).

#### **B.** Les queues d'histones dans la condensation

Plusieurs études ont démontré l'aspect crucial du rôle des queues d'histones dans la condensation de la chromatine. Ainsi, lors d'expériences de condensation *in vitro*, au cours desquelles de la chromatine de spermatozoïdes de xénope est incubée en présence d'extraits mitotiques d'œufs de la même espèce, la recondensation de l'ADN en chromosomes est inhibée par l'ajout d'octamères d'histones (ou oligosomes) intactes mais n'est pas affectée lorsque les oligosomes sont privés de leurs queues d'histones par digestion à la trypsine (de la

Barre et al., 2000). Les auteurs expliquent cet effet d'inhibition par la séquestration de facteurs cruciaux à la condensation par les queues d'histones. Des approches similaires ont montré que la queue de l'histone H2B est nécessaire, à un degré très supérieur à celle des autres histones, à la condensation des chromosomes (de la Barre et al., 2001).

Outre l'intervention de facteurs protéiques, la condensation des chromosomes s'accompagne de plusieurs modifications d'histones, spécifiques de la mitose, dont la plus étudiée est la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3.

#### 1. La phosphorylation mitotique des histones

Le type de modification post-traductionnelle des histones le plus souvent associé à la mitose est la phosphorylation. Très tôt déjà, en 1973, il a en effet été constaté que le niveau de phosphorylation des histones augmente à cette phase du cycle cellulaire, et plus particulièrement sur les histones H1 et H3 (Bradbury et al., 1973). Néanmoins, la phosphorylation mitotique a pu être constatée sur d'autres histones, incluant les variants d'histones, de même que d'autres modifications apparaissent aussi en plus grande proportion au cours de la mitose.

#### a) La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3

L'augmentation de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 en mitose a été observée chez de nombreux organismes (pour une revue (Hans and Dimitrov, 2001)). A tel point que cette modification est communément utilisée comme marqueur de cette phase du cycle cellulaire (Gurley et al., 1978; Paulson and Taylor, 1982; Wei et al., 1998). Une phosphorylation massive de H3S10 se produit également lors des deux divisions méiotiques (pour une revue (Hans and Dimitrov, 2001)). Toutefois, les modalités spatio-temporelles d'apparition de la modification étant dans ce dernier cas identiques à celles observées lors de la mitose, seule la phosphorylation mitotique sera détaillée dans cette partie.

## *(i)* Corrélation spatio-temporelle avec la condensation des chromosomes

De premières expériences menées sur *Tetrahymena thermophila*, dont les résultats ont ensuite été confirmés dans de nombreux autres organismes, ont montré que H3S10p accompagne de manière très stricte le déroulement de la condensation des chromosomes (Fig.30) (Hendzel et al., 1997). Il apparaît que le marquage de cellules par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette modification se caractérise par l'apparition de discrets foci au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique en phase G2 tardive de l'interphase. Il s'étend ensuite tout au long des chromosomes au cours des phases suivantes, durant lesquelles la chromatine poursuit sa condensation, pour atteindre une intensité maximale en début de métaphase lorsque les chromosomes sont les plus compactés. Le niveau du marquage va alors à nouveau diminuer durant l'anaphase, de même que les chromosomes entament leur décondensation, jusqu'à sa totale disparition en télophase, étape à laquelle la chromatine est largement décondensée (Fig.30) (Hendzel et al., 1997).



<u>Figure 30</u>: Représentation schématique du profil de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 au cours de la mitose. Chaque phase de la mitose est représentée schématiquement et accompagnée d'une observation au microscope confocal de cellules immunomarquées par un anticorps dirigé contre H3S10p associé à un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy3 (rouge). L'ADN, marqué au Hoechst, apparaît en bleu. Ces observations ont été effectuées au cours de mon travail de thèse. Sur les schémas, seuls deux chromosomes ont été représentés dans chaque cellule. La partie des chromosomes contenant H3S10p est représentée en rouge tandis que la partie ne contenant pas la modification apparaît en bleu. Le fuseau mitotique est schématisé en vert et les centrosomes en marron. La description de l'évolution du marquage au cours de la mitose figure dans le texte.

#### (ii) La kinase Aurora B et le Complexe Passager du Chromosome

Comme il a été évoqué au point III.C.2.c.i, la kinase Aurora B est la principale enzyme responsable de la phosphorylation de H3S10 en mitose (Crosio et al., 2002). Il s'avère en fait qu'elle agit au sein d'un complexe composé de trois autres protéines, INCENP, survivine et boréaline, et qui porte le nom de complexe passager du chromosome (CPC) (Fig.31) (pour une revue (Vader et al., 2006)). A ces protéines du cœur du complexe s'ajoute TD-60 (pour Telophase Disk of 60 kDa) qui, bien qu'elle ne fasse pas partie intégrante du complexe de base (Gassmann et al., 2004), montre une localisation typique des protéines passagères du chromosome et est délocalisée si d'autres composants du complexe sont perturbés (Mollinari et al., 2003). INCENP apparaît comme la protéine de soutien du complexe en interagissant par son extrémité N-terminale avec la survivine et la boréaline, tandis qu'elle lie de son autre extrémité la kinase Aurora B (Fig.31) (Sessa et al., 2005). Cette dernière interaction lui permet d'ailleurs d'activer la kinase qui phosphoryle à son tour INCENP sur deux résidus sérines conservés proches de l'extrémité C-terminale pour être encore davantage activée en retour. D'autre part, INCENP a également montré pouvoir s'associer à HP1a in vitro mais une telle interaction n'a pu être observée pour le moment in vivo (Ainsztein et al., 1998). La survivine, présente sous forme de dimère dans le complexe, peut aussi lier les trois autres membres du complexe et est également phosphorylée par Aurora B (Verdecia et al., 2000; Wheatley et al., 2004). Une controverse existe toutefois quant à son rôle en mitose et en apoptose (Altieri, 2006; Lens et al., 2006). La boréaline enfin, aussi appelée Dasra-B, est phosphorylée in vitro par Aurora B, mais sa fonction reste encore méconnue (Gassmann et al., 2004).

Figure 31 : Représentation schématique du complexe passager du chromosome (CPC), d'après (Ruchaud et al., 2007)). Chaque protéine du complexe est associée à une couleur particulière. Le lobe N-terminal et Cterminal de la kinase Aurora B est annoté. Les interactions entre l'extrémité C-terminale de INCENP et Aurora B sont matérialisées par des flèches bleues foncées. Celles entre l'extrémité N-terminale de INCENP et les protéines boréaline et survivine ainsi que les interactions entre la survivine et Aurora B sont représentées par des flèches blanches.



Aussi, par le biais du complexe CPC, la kinase Aurora B s'est révélée être impliquée dans de nombreux processus tels que l'arrangement de la chromatine en chromosomes, la régulation de l'attachement des microtubules aux kinétochores des chromatides sœurs ou la cytocinèse (pour une revue (Ruchaud et al., 2007)). De toutes ces fonctions, son implication dans la structure des chromosomes est la moins bien comprise actuellement. Le rôle d'Aurora B dans le recrutement des complexes condensines sur les chromosomes est par exemple assez vague. Ainsi, une délétion de Aurora B chez *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* provoque une incapacité de réquisitionner la condensine I sur les chromosomes mitotiques (Hagstrom et al., 2002). De plus, cette même kinase a montré phosphoryler les sous-unités CAP-D2, CAP-G et CAP-H *in vitro* et augmenter l'ancrage de la condensine I sur les chromosomes mitotiques (Lipp et al., 2007). Néanmoins, une autre étude a montré que la délétion de CPC n'affecte pas l'association de la condensine aux chromosomes mitotiques ou la condensation des chromosomes dans des extraits d'œufs de xénope (MacCallum et al., 2002). Le rôle d'Aurora B, et donc celui de la phosphorylation de H3S10, dans la condensation de la chromatine reste donc à définir.

#### (iii) La fonction de la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10 au cours de la mitose

La parfaite corrélation spatio-temporelle entre la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 et la dynamique de l'ADN en mitose a donné lieu à plusieurs hypothèses visant à expliquer la fonction de cette modification lors de la mitose (Prigent and Dimitrov, 2003).

#### Un rôle dans la condensation de la chromatine

Plusieurs études attestent d'une implication de H3S10p dans la condensation de la chromatine en mitose. En effet, l'étude d'une souche de *Tetrahymena thermophila* portant une mutation de H3S10 en alanine (A), un résidu non phosphorylable, a montré que ce mutant présente des défauts de ségrégation des chromosomes, caractérisés par la présence de bras chromosomiques persistant sur la plaque équatoriale lors de l'anaphase. Ce phénomène est le signe d'une condensation imparfaite de l'ADN, puisque les chromosomes ne peuvent supporter les forces de traction exercées sur eux par le faisceau mitotique et sont sujets à des cassures. En conséquence, les cellules filles issues de la mitose présentent des taux d'aneuploïdie anormalement élevés (Wei et al., 1999).

Par ailleurs, la microinjection de peptides correspondant aux vingt premiers acides aminés de H3 non modifiés dans des cellules de hamster CHO provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, suggérant que les queues d'histones H3 sont importantes pour l'initiation de la condensation et l'entrée en mitose. De plus, l'inhibition des phosphatases par l'acide okadaïque dans ces mêmes cellules provoque l'augmentation du taux de H3S10p en interphase qui est accompagnée de la condensation de la chromatine, sans toutefois adopter une structure chromosomique. Cette dernière donnée plaide pour un rôle de la phosphorylation dans la condensation mais démontre aussi que celle-ci n'est pas suffisante pour la formation des chromosomes mitotiques (Van Hooser et al., 1998).

Les mécanismes moléculaires par lesquels la phosphorylation de l'histone H3 serait responsable de la condensation de la chromatine ont alors donné lieu à deux modèles.

Selon le premier d'entre eux, la phosphorylation induirait une baisse d'affinité de la queue de l'histone H3 pour l'ADN nucléosomal ou l'ADN de jonction, devenant alors accessible aux polyamines (Fig.32.A) (Sauve et al., 1999). Les polyamines sont des polycations organiques associés aux chromosomes mitotiques et pouvant induire une condensation de la chromatine *in vitro* (Hougaard et al., 1987; Smirnov et al., 1988). Cette hypothèse a été formulée suite à des expériences de fixation des liaisons moléculaires (ou *crosslinking*) aux UV qui ont révélé que les queues d'histones sont liées à l'ADN en interphase, mais que cette interaction est réduite en métaphase (Sauve et al., 1999). Des expériences de dichroïsme circulaire (Baneres et al., 1997) et des simulations de dynamisme moléculaire *in silico* (La Penna et al., 2006) soutenues par le respect des lois de la physique en matière d'interaction entre les queues d'histones et l'ADN qui, en outre, est sensible aux changements de charges et de morphologie des molécules impliquées.

Selon le second modèle, la queue de l'histone H3 phosphorylée servirait comme une plateforme pour la fixation de facteurs de condensation de la même façon que H3K9me2/3 sert de récepteur à la fixation des protéines de type HP1 pour la formation de l'hétérochromatine (Fig.32.B) (pour une revue (Seet et al., 2006)). Cependant, aucune protéine de la sorte n'a encore été identifiée pour la reconnaissance de H3S10p en mitose. Il apparaît en effet que ni la topoisomérase II $\alpha$ , ni les protéines SMC, qui sont les principaux acteurs protéiques de la condensation mitotique, ne reconnaissent spécifiquement cette modification (de la Barre et al., 2000). Un autre facteur de condensation, encore inconnu à ce jour, devrait donc assurer cette interaction.

La corrélation spatio-temporelle entre la phosphorylation de l'histone H3 et la condensation des chromosomes ayant été observée chez de nombreuses espèces, il était tentant de penser que cette modification mitotique était, à l'exemple de *T. thermophila*, universellement nécessaire à la compaction de l'ADN. Cependant, la mutation de la sérine 10 en alanine chez S.cerevisae n'affecte pas de manière détectable la condensation : la mitose et la méiose se déroulent de manière normale, et la souche mutante pousse à une vitesse similaire à une souche de type sauvage (Hsu et al., 2000). Ainsi, il semblerait que chez la levure, la phosphorylation de l'histone H3 ne soit pas nécessaire à la condensation.

D'autre part, chez les plantes, H3S10p est plutôt associée à la cohésion des chromatides sœurs (Kaszas and Cande, 2000). De récents résultats suggèrent un rôle similaire chez les mammifères (Song et al., 2007).



<u>Figure 32</u>: Les trois modèles illustrant la fonction de H3S10p au cours de la mitose. A. Hypothèse de la baisse d'affinité des queues d'histones pour l'ADN suite à l'ajout de la phosphorylation. Les polyamines se fixent alors sur les extrémités N-terminales devenues accessibles et engendrent la condensation de la chromatine. B. Hypothèse du rôle de H3S10p comme plateforme pour la fixation de facteurs de condensation qui permettront la compaction de la chromatine. Seules les queues d'histone H3 sont représentées. C. Hypothèse de « ready production label » où H3S10p marque les chromatides prêtes à être séparées. Seuls deux chromosomes ont été représentés dans chaque cellule. Le fuseau mitotique est représenté en vert et les centrosomes en marron. Plus de détails quant aux différents modèles apparaissent dans le texte.

## Un rôle de marquage des chromatides prêtes à être séparées

Quel que soit le moment de l'initiation de la phosphorylation de l'histone H3, en fin de phase G2 chez la plupart des organismes ou en fin de prophase chez les plantes, ainsi que son étendue spatiale, réduite à l'hétérochromatine péricentrique chez les végétaux, ou affectant toutes les molécules d'histone H3, cette modification semble toujours maximale lors de la métaphase, lorsque les chromosomes sont positionnés sur un plan équatorial, prêt à être ségrégés.

C'est sur cette dernière constatation que repose l'hypothèse de « *ready production label* » selon laquelle la phosphorylation de l'histone H3 constituerait une « marque » (« *label* ») ou un signal informant la cellule que les chromosomes sont correctement condensés et qu'elle peut procéder à l'étape irréversible de séparation des chromatides (Fig.32.C) (Hans and Dimitrov, 2001). Dans ce modèle, la phosphorylation devient la conséquence de la condensation des chromosomes, contrairement aux deux hypothèses précédentes où elle en est le point de départ.

#### b) Les autres phosphorylations mitotiques

Outre la phosphorylation de H3S10, trois autres phosphorylations sur la queue de l'histone H3 ont plus tard été montrées comme étant associées à la mitose: la phosphorylation de H3S28 (Goto et al., 1999), celle de H3T11 (Preuss et al., 2003) et celle de H3T3 (Dai et al., 2006).

Précédée de résidus identiques à ceux situés en amont de la sérine 10 (ARK<u>S</u>), H3S28 est phosphorylée par la même kinase en charge de la modification de H3S10 : Aurora B (Goto et al., 2002). H3S28p est donc également détectée sur les chromosomes mitotiques, mais elle apparaît plus tardivement que la phosphorylation de la sérine 10, c'est-à-dire en début de prophase et non en fin de phase G2, et disparaît plus tôt au cours de l'anaphase (Fig.33.A).

La thréonine 11, phosphorylée par la kinase Dlk/ZIP, est aussi modifiée de la prophase au début de l'anaphase (Preuss et al., 2003). Néanmoins, sa localisation est limitée aux régions centromériques et péricentromériques tout au long de la mitose (Fig.33.B).

Pour finir, H3T3p apparaît dans le même intervalle de temps que H3T11p ou H3S28p, mais sa distribution spatiale évolue différemment au cours de la mitose (Polioudaki et al., 2004). Il a ainsi été observé que la phosphorylation de la thréonine 3 débute à la périphérie des chromosomes puis progresse vers les régions centromériques qu'elle atteint en métaphase (Fig.33.C). De par sa localisation spécifique, H3T3p semble donc être impliquée dans la cohésion des chromatides sœurs, comme le confirment des expériences de délétion de la kinase Haspin responsable de cette modification, qui mènent à une interférence dans la liaison des cohésines aux centromères (Dai et al., 2006).



<u>Figure 33</u>: Représentation schématique des profils de phosphorylation des résidus S28, T11 et T3 de l'histone H3 au cours de la mitose. *Seuls deux chromosomes ont été représentés dans chaque cellule. La partie des chromosomes contenant la phosphorylation de l'un ou l'autre résidu est représentée en rouge tandis que la partie ne contenant pas la modification apparaît en bleu. Le fuseau mitotique est schématisé en vert et les centrosomes en marron. La description de l'évolution des marquages au cours de la mitose figure dans le texte.* A. *Évolution de H3S28p au cours de la mitose.* B. *Évolution de H3T11p au cours de la mitose.* C. *Évolution de H3T3p au cours de la mitose.* 

D'autres évènements de phosphorylations spécifiques de la mitose ont été retrouvés sur des histones différents de H3. Les sérines 1 d'H2A et H4, qui ont les mêmes 5 premiers acides aminés conservés chez de nombreuses espèces (SGRGK), sont en effet aussi phosphorylées. Si leur apparition a lieu, comme pour H3S28p, en prophase, les modifications semblent persister jusqu'en télophase, à l'égal de H3S10p (Barber et al., 2004). Quant à leur localisation, elle se révèle évoluer de la même façon que celle des phosphorylations de sérines de la queue d'histone H3, en progressant des régions péricentromériques vers les télomères au cours de la mitose.

Puis il y a l'histone H1 dont la phosphorylation existe déjà à un niveau bas en phase G1 de l'interphase, pour augmenter graduellement et atteindre son niveau maximum en mitose (Talasz et al., 1996). De plus, les divers variants majeurs de l'histone de jonction diffèrent dans leur degré de phosphorylation au cours du cycle cellulaire et ce, de façon spécifique. Aussi, il a été montré que la phosphorylation de H1 en interphase, quelle que soit son isoforme, a exclusivement lieu sur les résidus sérines, tandis que la phosphorylation mitotique additionnelle touche uniquement les thréonines (Sarg et al., 2006). Par ailleurs, il semblerait que ces phosphorylations soient associées à l'activité de la kinase CDK1 (ou CDC2) spécifique de la mitose (Swank et al., 1997). La fonction de cette hyperphosphorylation mitotique de H1 reste cependant obscure. S'il est supposé qu'elle neutralise les charges positives de l'histone et provoque de cette manière la fragilisation de sa liaison avec l'ADN puis la déstabilisation consécutive de la structure chromatinienne, plusieurs études ont montré qu'elle n'est pas indispensable à la condensation des chromosomes (Guo et al., 1995; Ohsumi et al., 1993; Shen et al., 1995).

#### 2. Les autres modifications des histones associées à la mitose

#### a) Les modifications mitotiques des histones « canoniques »

Outre les phosphorylations, d'autres modifications ont montré une certaine dynamique d'apparition et de disparition au cours du cycle cellulaire.

H4K20me1 et -3, de même que H3K9me3 semblent marquer plus spécifiquement les chromosomes mitotiques. Le rôle de la méthylation de H4 dans ce cas doit toutefois encore être élucidé (Karachentsev et al., 2007; Rice et al., 2002). En ce qui concerne H3K9me3, des expériences d'immunofluorescence ont révélé que la triméthylation est plus importante dans les cellules en mitose. L'analyse de la mitose chez des fibroblastes embryonnaires mutants de souris a par ailleurs suggéré que cette modification joue un rôle dans la ségrégation des chromosomes (McManus et al., 2006; Peters et al., 2001).

Des phénomènes d'acétylation ou de déacétylation ont également été observés couplés à la mitose. Ainsi, l'analyse au microscope à fluorescence du marquage de cellules humaines par des anticorps dirigés contre divers sites acétylés ont permis de constater une baisse d'acétylation des résidus H3K9, H4K5, H4K8 et de l'histone H2B en mitose, alors que les sites H3K14, H4K12 et H4K16 reste acétylés dans cette phase du cycle cellulaire (Kruhlak et al., 2001). L'étude de la distribution spatio-temporelle de l'acétylation des lysines 9 et 14 de l'histone H3 a d'autre part révélé une légère augmentation de H3K14ac en mitose, tandis qu'au même moment, H3K9ac semble diminuer (McManus and Hendzel, 2006). Toutefois, en ce qui concerne H4K16ac, de récentes données contredisent les résultats évoqués précédemment selon lesquels cette modification ne varierait pas tout au long du cycle cellulaire (Kruhlak et al., 2001). En effet, le niveau d'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 baisse significativement à l'entrée en mitose suite à l'action de la déacétylase SIRT2 chez les mammifères (Vaquero et al., 2006). En outre, des études *in vitro* ont démontré le rôle de cette modification dans la décondensation de la chromatine (Shogren-Knaak et al., 2006). Son absence en mitose semble donc être importante pour la compaction de la chromatine, indispensable dans cette phase du cycle cellulaire.

#### b) Les modifications mitotiques des variants d'histones

Certains variants d'histones voient aussi leurs résidus être modifiés différemment selon la phase du cycle cellulaire.

C'est par exemple le cas de CENP-A, un variant de l'histone H3 spécifique du centromère des chromosomes, qui est phosphorylé spécifiquement en mitose par Aurora B au niveau de sa sérine 7. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'environnement peptidique ARK<u>S</u> de cette sérine est semblable à celle des sérines 10 et 28 de l'histone H3. Sa cinétique est cependant plus semblable à celle de H3S28p puisqu'elle ne débute qu'en prophase, atteint également un pic en métaphase avant de diminuer rapidement pour devenir indétectable en anaphase (Zeitlin et al., 2001).

Un autre variant de H3, H3.3, peut être phosphorylé spécifiquement en mitose sur une sérine en position 31 que ne possède pas les variants majeurs H3.1 et H3.2. Cette modification est uniquement présente de la prométaphase tardive à la fin de la métaphase, et est enrichie au niveau de la région péricentromérique, sans jamais toutefois s'étendre jusqu'au centromère (Hake et al., 2005). De surcroît, en raison de sa singularité, aussi bien du point de vue de sa distribution spatio-temporelle que du point de vue de l'environnement peptidique dans lequel repose la sérine 31, il semblerait qu'une kinase différente de Aurora B soit responsable de cette modification. Sa fonction, elle aussi, reste inconnue à ce jour.

Enfin, au-delà de son rôle dans la réparation de l'ADN,  $\gamma$ H2A.X, qui correspond à la forme phosphorylée sur S139 de H2A.X, est aussi présent durant la mitose, en absence de dommage au sein de l'ADN (Ichijima et al., 2005). Son rôle dans ce cas n'a cependant pas encore été élucidé.

# PARTIE 1

### **PARTIE 1:**

Étude des modifications post-traductionnelles de la sousunité TAF10 au sein des complexes TFIID ou TFTC et de leurs variations en fonction du cycle cellulaire

#### I. L'historique du projet

La sous-unité TAF10, anciennement appelée hTAFII30, est présente non seulement dans TFIID mais également dans plusieurs autres complexes tels que TFTC, STAGA ou PCAF, comme nous l'avons vu dans la partie II.A.2.b.i de l'introduction. Cette protéine s'avère particulièrement intéressante de par son importance au sein du complexe TFIID et son implication dans de nombreux mécanismes biologiques. En effet, à mon arrivée dans l'équipe du Dr László TORA, il avait été démontré, suite à l'élimination du gène taf10 dans des cellules F9 de souris par recombinaison homologue, que TAF10 n'est nécessaire que pour la transcription d'une catégorie de gènes. Cette sous-unité est, par exemple, requise pour la progression de la phase G1/S du cycle cellulaire et pour l'expression de la cycline E. Elle semble aussi être impliquée dans la régulation de certains gènes induits par l'AMP cyclique et entraînant les cellules vers une différenciation pariétale (Metzger et al., 1999). Plus récemment, différentes mutations thermosensibles de yTAF10, l'homologue de TAF10 chez la levure, ou des constructions chimériques avec TAF10 humain exprimées dans des cellules de levure ont montré un arrêt du cycle cellulaire aux phases G1 ou G2/M et des changements du phénotype et de l'expression génique (Kirschner et al., 2002). Enfin, il a été montré que TAF10 est requis pour la stabilité de TFIID, la progression du cycle cellulaire et la transcription chez l'embryon précoce de souris (Mohan et al., 2003).

Par ailleurs, comme il a été décrit dans l'introduction, TAF10 fait partie de ces TAFs qui portent un domaine de type histone. Or les histones étant reconnu pour être les cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles afin, notamment, de réguler l'expression des gènes, il était aisément envisageable que de telles modifications affectent TAF10 et, éventuellement, altèrent sa fonction biologique. De plus, au cours de différentes études détaillées en II.B.2.b de la partie précédente, d'autres TAFs ont montré pouvoir être phosphorylés *in vitro*.

Notre objectif était donc, dans un premier temps, de déterminer si TAF10 est bien modifié *in vivo* puis de définir si ces modifications peuvent avoir un rôle biologique dans les fonctions de cette protéine en comparant leur apparition en phase G1/S ou G2/M du cycle cellulaire et leur présence lorsque TAF10 se trouve au sein du complexe TFIID ou TFTC. La dernière étape consistait à identifier la nature de ces modifications, leur localisation sur la protéine et les effets précis de ces modifications sur les fonctions de TAF10.

#### II. Matériel et méthodes

#### A. Préparation d'extraits protéiques totaux de cellules HeLa ou SF9

Les cellules cultivées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> de surface ont été lavées une fois dans 10 ml de PBS 1X (pour *Phosphate Buffered Saline* pH 7.5 : 150  $\mu$ M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 270  $\mu$ M KCl; 13,7 mM NaCl; 800  $\mu$ M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) puis grattées dans 1 ml de PBS 1X froid. Après avoir été transférées dans un tube eppendorf 1,5 ml, elles ont été centrifugées à 2000 rpm à 4°C pendant 5 min. Le culot cellulaire a été lavé deux fois par ajout de 5 ml de PBS 1X suivi d'une centrifugation à 2000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire lavé est alors resuspendu dans 400 à 500  $\mu$ l de tampon d'extraction à 400 mM de KCl (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 2 mM DTT; 20% Glycérol; 400 mM KCl; mélange d'inhibiteurs de protéase (2,5  $\mu$ g/ml de leupeptine, pepstatine, chymostatine, antipaïne et aprotinine) (PIC 1X pour *Protease Inhibitor Cocktail*)). Les cellules sont alors lysées par trois cycles de congélation dans l'azote liquide suivie de décongélation à 13000 rpm et à 4°C pendant 15 min. Le surnageant contenant les protéines est conservé à –80°C.

#### B. Préparation d'extraits nucléaires de cellules HeLa

Toute la procédure a été réalisée sur glace à 4°C (chambre froide ou sur la glace, avec des tampons et des instruments refroidis) afin d'éviter la dégradation éventuelle des protéines. D'autre part, les extraits nucléaires étant voués à une analyse par spectrométrie de masse, les solutions doivent être stériles.

10<sup>10</sup> à 10<sup>11</sup> cellules HeLa cultivées en suspension et conservées à -80°C dans du tampon MS30 (50 mM Tris-HCl pH 7,9 ; 2,5 mM EDTA; 30% Glycérol) (service commun IGBMC), ont été centrifugées 10 min à 4°C à 1500 rpm. Le culot a été repris dans 100 ml de PBS 1X froid à la pipette, et le volume de cellules compactées (PCV pour *Packed Cell Volume*) a été estimé en mesurant le volume total moins les 100 ml ajoutés. Les cellules ont à nouveau été centrifugées dans les mêmes conditions, et reprises dans 4 PCVs de tampon hypotonique A (50 mM TrisHCl pH 7,9 ; 1mM EDTA ; 1 mM DTT ; PIC 1X ; 0,5 mM PMSF) dans lequel elles ont été laissées ainsi pendant 30 min pour permettre leur gonflement. Les cellules ont été alors transférées dans un broyeur (Kontes), où elles ont été soumises à une première lyse mécanique par dix allers-retours successifs avec un piston B (serré). Les noyaux

ont été récupérés par centrifugation dans des tubes d'environ 40 ml pendant 10 min à 3000 rpm et 4°C. Le surnageant a été enlevé, et le culot remis en suspension dans 4 PCVs de tampon B (50 mM TrisHCl pH 7,9; 0,5 mM EDTA; 25% glycérol; 0,5 M NaCl; 1 mM DTT ; PIC 1X ; 0,5 mM PMSF). Les protéines nucléaires ont ensuite été extraites du noyau par vingt allers-retours successifs dans un broyeur (Kontes) avec un piston de type B, suivis de 30 min d'agitation douce. Puis le lysat a été centrifugé à 15000 rpm et 4°C pendant 40 min. Le surnageant a été filtré à travers de la gaze hydrophile, pour obtenir un volume V2, et les protéines nucléaires précipitées par ajout progressif de sulfate d'ammonium jusqu'à une concentration finale de 30% (p/v). La solution a été agitée pendant 30 min pour permettre la précipitation, puis centrifugée à 15000 rpm pendant 30 min. Le culot contenant des protéines nucléaires a été remis en suspension dans un cinquième du volume V2 de tampon D (50 mM TrisHCl pH 7,9; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; 20% glycérol; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF), puis la solution a été dialysée toute la nuit contre 4 litres de tampon D sans PMSF. L'extrait a été une dernière fois centrifugé pendant 15 min à 9000 rpm et à 4°C pour éliminer les matières insolubles. Les échantillons ont été utilisés directement pour une immunoprécipitation (IP) à l'aide d'un anticorps anti-TAF10 ou ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

Ces extraits ont été préparés par Elisabeth Scheer, ingénieure de recherche au sein de l'équipe du Dr. TORA.

#### C. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et Western Blot

Le gel de polyacrylamide est composé de deux parties :

Le gel de concentration : (12,5 mM Tris-HCl pH 6.8 à 25°C ; 0,1% SDS ; 4,38% acrylamide ; 0,04% bis-acrylamide ; 0,05% persulfate d'ammonium ; 0,1% TEMED) qui amène toutes les protéines au même niveau pendant la migration.

Le gel de séparation (ici à 12,5% de polyacrylamide): (0,375 mM Tris-HCl pH 8.8 à 25°C ; 0,1% SDS ; 12,16% acrylamide ; 0,34% bis-acrylamide ; 0,0625% persulfate d'ammonium ; 0,1% TEMED) qui sépare les protéines selon leur taille.

Les échantillons ont été dénaturés pendant 5 min à 100°C dans une solution de dépôt (25 mM Tris-HCl pH 6.8 à 25°C ; 10% glycérol ; 1% SDS ; 0,05% bleu de bromophénol) avant d'être chargées. La migration s'effectue en présence de tampon de migration (25 mM Tris-HCl ; 192 mM Glycine ; 1% SDS) à 250 Volts sous 15 mA pour le gel de concentration et 30 mA pour le gel de séparation.

La taille des gels destinés à la découpe de bandes et à l'analyse par spectrométrie de masse est plus importante que celle des gels de Western Blot, ceci afin d'augmenter la quantité de protéines chargées et d'améliorer leur séparation. Dans ce cas, la migration a été effectuée à 250 Volts et 50 mA pour le gel de séparation.

Les protéines du gel ont ensuite été soit colorées au nitrate d'argent, soit transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert a lieu à 150 Volts pendant 45 min dans du tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine). La membrane de nitrocellulose a été saturée par une solution de lait écrémé à 3% (p/v) dans du PBS 1X pendant 30 min à température ambiante, puis incubée durant la nuit à 4°C avec un ou plusieurs anticorps monoclonaux de souris dirigés contre des épitopes de TBP (2C1, 4C2, 3G3) et de TAF10 (1H8, 2B11, 4G2, 1H12) (anticorps primaires). Ces anticorps ont été dilués mille fois dans une solution de PBS 1X contenant du lait écrémé à 0,3% (p/v). Après trois lavages successifs de 10 min dans une solution de lavage (PBS 1X et Tween 20 à 0,05%), la membrane de nitrocellulose a été incubée pendant 1 h à 25°C avec des anticorps secondaires de chèvre (Jackson Laboratory), couplés à la peroxydase, reconnaissant les anticorps primaires de souris. Ces anticorps ont été dilués dix mille fois dans du PBS 1X. La membrane de nitrocellulose a enfin été lavée pendant 5 min dans trois bains successifs contenant de la solution de lavage. Les protéines marquées ont été révélées par chimioluminescence (Kit ECL, Amersham) sur un film autoradiographique (KODAK XO-MAT).

## D. Synchronisation des cellules HeLa en phase G1/S ou G2/M du cycle cellulaire

Dans les deux cas, les cellules ont été traitées lorsqu'elles atteignaient une confluence de 30% à 50% par boîte de culture.

Synchronisation en phase G1/S : le milieu de culture contenant de la thymidine à une concentration de 2 mM a été pré-incubé au bain-marie à 37°C pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été mises en présence de ce milieu pendant 14 h à 16 h. Un excès de thymidine inhibe la ribonucléotide réductase qui convertit les ribonucléotides en désoxyribonucléotides et plus particulièrement le CTP en dCTP. Ces derniers manquent alors à la cellule pour la réplication de son ADN en phase S. Les cellules ont ensuite subi 3 lavages de PBS 1X à raison de 10 ml de PBS par boîte afin d'enlever un maximum de thymidine. Pour augmenter la fiabilité, on a réalisé deux blocages successifs. Les cellules ont alors à nouveau été incubées à l'étuve dans un milieu sans agent bloquant pendant 11 h puis remises en présence de
thymidine, comme précédemment, pendant 14 h à 16 h. À ce stade, les cellules étaient toutes arrêtées en phase G1/S du cycle cellulaire. On pouvait alors soit relancer leur croissance en les remettant dans du milieu sans agent bloquant afin de réaliser une expérience de suivi du cycle cellulaire, soit réaliser une analyse des cellules par FACS (pour *Fluorescence Activated Cell Sorting*), ou encore en faire des extraits protéiques.

Synchronisation en phase G2/M : les cellules ont été incubées à l'étuve pendant 14 h à 16 h dans un milieu à 3  $\mu$ M de nocodazole. Le nocodazole est un agent antimitotique qui, en se liant à la  $\beta$ -tubuline, empêche la polymérisation des sous-unités en microtubules. De cette façon, il inhibe la dynamique du microtubule, perturbe la fonction du fuseau mitotique et entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Comme précédemment, les cellules ont ensuite été lavées 3 fois au PBS 1X pour enlever le nocodazole et peuvent alors être remises en croissance dans un milieu sans agent bloquant ou être utilisées.

Une population de cellules témoins a été incubée en absence de tout agent arrêtant le cycle cellulaire pendant 14 h à 16 h puis a aussi été soit laissée en croissance soit récupérée suivant l'expérience réalisée.

# E. Préparation des cellules pour l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux à l'aide du FACScan

On a utilisé une boîte de culture à 70% de confluence maximum. Après avoir été lavées, suite à la synchronisation, les cellules ont été décrochées de la boîte à l'aide de trypsine diluée préchauffée à 37°C. La réaction a été arrêtée par 10 ml de milieu de culture dès que les cellules commençaient à se décoller. Elles ont alors été transférées dans un tube de 15 ml puis centrifugées à 2000 rpm et à 4°C pendant 5 min. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de PBS 1X avant d'être transférées dans un tube eppendorf 1,5 ml. Elles ont alors subi une brève centrifugation à 6000 rpm et à température ambiante. Le surnageant éliminé, les cellules ont été resuspendues dans 300  $\mu$ l de PBS 1X auxquels ont été ajouté pour les fixer 700  $\mu$ l d'éthanol 100% (soit 70% d'éthanol dans la solution finale). Cet échantillon a ensuite été incubé au moins 30 min à 4°C ; à ce stade, il pouvait être gardé à 4°C pendant quelques jours.

Environ 2 h avant l'analyse au FACScan, l'échantillon a été centrifugé 5 min à 5000 rpm et à température ambiante. Le culot a été lavé 2 fois par 1 ml de PBS 1X. Après chaque centrifugation, les cellules ont été laissées à regonfler 5 min à 4°C dans le PBS 1X. Afin de se débarrasser de l'ARN pouvant interférer dans l'analyse, les cellules ont finalement été

resuspendues dans 500 µl de PBS à 1 mg/ml de RNAse A et incubées 30 min au bain-marie à 37°C. L'échantillon a encore une fois été centrifugé à 5000 rpm et à température ambiante pendant 5 min. Le surnageant éliminé, le culot cellulaire a été resuspendu dans 1 ml de PBS 1X à 25 µg/ml d'iodure de propidium. L'iodure de propidium est un composé fluorescent qui va s'intercaler entre les bases des acides nucléiques. Il va donc marquer l'ADN comme l'ARN d'où l'utilisation de RNAse à l'étape précédente. Les cellules ont alors été laissées au noir et à température ambiante pendant 30 min afin de permettre à l'iodure de propidium de s'incorporer à l'ADN.

Après avoir été filtrés à l'aide de papier nylon, les échantillons ont tour à tour été placés dans le FACScan pour leur analyse par cytométrie de flux. Cette technique consiste à faire défiler très rapidement les unes derrière les autres des cellules en suspension monocellulaire devant un faisceau laser, à travers un très fin capillaire. Pour chaque cellule sont mesurées très précisément la fluorescence émise à diverses longueurs d'ondes (3 signaux de fluorescence sont analysés simultanément suivant les appareils) et la lumière diffusée, recueillie dans 2 directions différentes (l'une pouvant être corrélée avec la taille, et la seconde avec la réfringence et la granulosité de la cellule). L'appareil peut ainsi analyser les cellules selon plusieurs paramètres et définir des « sous-populations » homogènes pour les regrouper selon des critères choisis. Pour chaque sous-population, on peut par exemple calculer l'effectif, le pourcentage qu'il représente par rapport à la population totale ou encore la moyenne de chacun des paramètres.

L'acquisition des données et leur analyse ont ensuite été gérées par le logiciel CellQuest®.

#### F. Double immunoprécipitation pour la purification de complexes TFIID et l'obtention d'un surnageant contenant le complexe TFTC

Deux IP successives permettent d'obtenir un complexe TFIID relativement pur. La première est réalisée à l'aide d'anticorps anti-TAF10 (23TA1H8) et la deuxième avec un anticorps anti-TBP (5TF2C1). Le surnageant de cette deuxième IP comprend notamment le complexe TFTC.

Chaque IP nécessite au préalable la liaison de l'anticorps à la résine. En outre, la première IP requiert également la pré-purification de l'extrait à immunoprécipiter, afin de se débarrasser d'un maximum de protéines contaminantes liant la protéine G. Le volume du

matériel devant subir l'IP, c'est-à-dire dans notre cas un extrait nucléaire de cellules HeLa, est noté IV (pour *Input Volume*).

<u>Pré-purification</u> : Une fraction de résine équivalente à un dixième de IV a été utilisée. La résine constituée de protéine G couplée à du sépharose (Pharmacia) a été lavée dans de l'eau MilliQ et équilibrée dans le tampon IP100 (25 mM TrisHCl pH 7,9 ; 5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 10% glycérol ; 0,1% NP40 ; 100 mM KCl ; 0,3 mM DTT). L'extrait nucléaire de cellules HeLa a alors été incubé pendant 1 h avec cette résine. Après 5 min de centrifugation à 1000 rpm, le surnageant a été récupéré pour être incubé avec la résine liée à l'anticorps anti-TAF10.

Liaison de l'anticorps anti-TAF10 (23TA1H8) à la résine : Environ 1 mg d'anticorps par ml de résine utilisée, dilué dans un dixième de IV de tampon IP100, a été ajouté à un dixième de IV de résine lavée et équilibrée comme précédemment. Le tout a été incubé sous agitation à température ambiante pendant 1h. Après centrifugation pendant 5 min à 1000 rpm, le culot de résine couplée à l'anticorps a été lavé deux fois 2 min avec 1 volume IV de tampon IP500 (même composition que l'IP100 à l'exception de la concentration en KCl = 500 mM), puis trois fois rapidement avec 1 volume IV de tampon IP100.

<u>Liaison des protéines de l'extrait nucléaire à l'anticorps</u> : La fraction protéique « prépurifiée » a été incubée avec la résine préalablement couplée à l'anticorps sous agitation et pendant toute la nuit à 4°C. Après centrifugation pendant 5 min à 1000 rpm, le surnageant a été prélevé et la résine lavée trois fois avec un dixième de volume IV de tampon IP500 puis trois autres fois avec un dixième de volume de tampon IP100.

Élution des protéines de la résine : Pour cette étape, un dixième de volume IV de tampon IP100 contenant 2 mg/ml d'un peptide compétiteur, correspondant à l'épitope de l'anticorps et nommé PC249 dans le cas de TAF10, a été incubé avec la résine liée à la protéine sous agitation douce pendant 2 à 5 h à 4°C. Ce type d'élution permet d'obtenir des complexes protéiques sous leur forme native. Pour que l'élution soit la plus efficace possible, le pH du peptide doit être neutre avant sa dilution dans le tampon IP100. Les complexes protéiques détachés de la résine ont été récupérés après centrifugation à 1000 rpm pendant 2 min à 4°C. L'éluat ainsi obtenu a été noté E1. Une seconde élution a été effectuée en incubant la résine avec une nouvelle solution contenant le peptide PC249 sous agitation douce pendant 30 min supplémentaires à 4°C. Comme précédemment, le nouvel éluat E2 a été récupéré par centrifugation à 1000 rpm pendant 2 min à 4°C. Enfin, la résine a été lavée deux fois avec un dixième de volume IV de tampon IP100. Les produits récupérés ont été notés L1 et L2.

<u>Seconde IP avec l'anticorps anti-TBP (5TF2C1)</u> : Pour cette deuxième IP, les éluats et les lavages ont été rassemblés pour obtenir un volume IV2. Les autres étapes ont été

effectuées de la même façon que pour la première IP, où seul le volume IV est remplacé par un volume IV2. L'élution quant à elle a été réalisée à l'aide du peptide PB242 encore une fois selon les mêmes conditions que précédemment.

Le complexe TFIID purifié contenu dans les nouveaux éluats, et le complexe TFTC se trouvant, parmi d'autres complexes, dans le surnageant de cette deuxième IP ont été utilisés pour la réalisation de gels en deux dimensions.

#### G. Réalisation de gels en deux dimensions

La séparation des protéines se fait en deux étapes. La première dimension est une isoélectrofocalisation et la seconde une électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

<u>L'isoélectrofocalisation (IEF)</u>: Cette première étape consiste à faire se déplacer tout polypeptide contenu dans l'échantillon jusqu'à une position en fonction de son point isoélectrique (pI), point auquel les charges électriques portées par la protéine se neutralisent. Cette séparation se fait sur un gel au gradient de pH immobilisé (bandelette IPG pour *Immobilized PH gradient Gel*) (BIORAD).

Avant de commencer l'IEF, les échantillons doivent être préparés et les bandelettes réhydratées. Les protéines ont ainsi été diluées dans 250  $\mu$ l de Tampon IEF (8 M Urée ; 4% CHAPS ; 0,2% Biolytes 3-10 ; 2 mM Tributylphosphine ; 0,001% Bleu de Bromophénol). Pour une bonne migration, la quantité de protéine ne doit pas dépasser 100  $\mu$ g par bandelette de 7 cm. En outre, une concentration finale en sels supérieure à 20 mM perturbe l'électrophorèse.

Les bandelettes utilisées étaient des bandelettes de 7 cm à gradient de pH 3-10. Elles ont été mises en contact avec les échantillons puis recouvertes d'1 ml d'huile minérale avant d'être placées pour une réhydratation passive dans l'appareil IEF pendant 12 h à 20°C sans être soumises à un courant électrique.

Les bandelettes ont ensuite été transférées dans un portoir muni d'électrodes, l'extrémité pH 3 du gel du côté de l'anode et l'extrémité pH 10 du côté de la cathode. De part et d'autre de la bandelette, entre l'électrode et le gel, a été placé un petit morceau de papier 3MM imbibé d'eau distillée. Les bandelettes ont à nouveau été recouvertes d'1 ml d'huile minérale et le portoir a été placé dans l'appareil IEF.

L'isoélectrofocalisation s'est déroulée en 6 étapes :

Étape 1 : 9 h ; 50  $\mu$ A par gel ; 50 Volts

Étape 2 : 15 min ; 50 µA par gel ; 250 Volts

Étape 3 : 15 min ; 50 μA par gel ; 500 Volts Étape 4 : 3 h ; 50 μA par gel ; 6000 Volts Étape 5 : atteindre 30000 Vh ; 50 μA par gel ; 6000 Volts Étape 6 : 24 h ; 50 μA par gel ; 500 Volts

La première étape sert à se débarrasser de l'excès de sels. Les étapes suivantes, de 2 à 5, permettent l'isoélectrofocalisation des protéines, tandis que la dernière étape est une étape de conservation des bandelettes et peut être arrêtée à tout moment. Les bandelettes peuvent alors être conservées à - 80°C jusqu'à la deuxième dimension.

<u>Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante</u>: Cette deuxième étape va séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire.

Avant de procéder à l'électrophorèse, il est nécessaire d'équilibrer les bandelettes IPG par deux incubations successives dans deux différents tampons afin qu'elles incorporent le SDS nécessaire à la dénaturation des protéines. Les bandelettes ont ainsi été incubées pendant 15 min et sous une faible agitation dans le premier tampon d'équilibration (6 M Urée ; 0,375 M Tris-HCl pH 8.8 ; 2% SDS ; 20% glycérol ; 2% (p/v) DTT). Les bandelettes ont ensuite été rincées rapidement avec 1 ml de ce même tampon dépourvu de DTT puis à nouveau incubées dans les mêmes conditions que précédemment dans le deuxième tampon d'équilibration (6 M Urée ; 0,375 M Tris-HCl pH 8.8 ; 2% SDS, 20% glycérol ; 2,5% (p/v) iodoacétamide). Les bandelettes ont alors été encore une fois rapidement rincées avec 1 ml de tampon sans DTT ni iodoacétamide puis conservées dans cette solution jusqu'au moment de charger le gel de polyacrylamide.

Le gel de polyacrylamide comporte, comme dans le cas d'une électrophorèse classique, deux parties. Le gel de séparation est le même que celui décrit précédemment. En revanche, le gel de concentration est cette fois composé d'1% d'agarose et de 0,001% de bleu de bromophénol. Il nécessite donc d'être fondu au bain-marie à 70°C pour pouvoir être déposé. Tant que le gel de concentration est liquide, la bandelette est glissée entre les deux plaques de verre et appliquée contre la surface du gel de polyacrylamide.

La migration a été effectuée en présence de tampon de migration (25 mM Tris-HCl ; 192 mM Glycine ; 0,4% SDS) sous 25 Volts et 25 mA pour le gel de concentration puis à 180 Volts et 50 mA pour le gel de séparation. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose, mises en contact avec les anticorps, puis révélées comme pour un Western blot classique.

#### H. Immunopurification anti-TAF10 pour la concentration de la protéine en vue de son analyse par spectrométrie de masse

L'immunopurification réalisée à partir de cellules HeLa à l'aide de l'anticorps anti-TAF10 (23TA1H8) a été réalisée de la même façon que celle qui a été décrite précédemment dans le cadre de la double IP servant à purifier des complexes TFIID. Une étape de concentration des éluats et des lavages obtenus a néanmoins été rajoutée.

<u>Concentration des éluats et des lavages</u> : Les deux éluats et les deux lavages ont été combinés chacun de leur côté puis chargés dans des tubes à membrane VIVASPIN 500 (Sartorius) avec une limite de rétention de 100 kDa en vue de leur concentration. Les échantillons ont alors été centrifugés à 11000 rpm pendant 8 min et à 4°C. Une centrifugation supplémentaire peut être nécessaire si l'échantillon n'a pas été assez concentré. La concentration était estimée comme suffisante lorsqu'elle atteignait les 15 fois.

Lorsque l'IP a été faite à partir d'extraits protéiques de cellules SF9, la protéine TAF10 y étant surexprimée et donc plus concentrée que dans les cellules HeLa, le rapport entre la quantité de résine utilisée et le volume de l'extrait n'était plus de 1/10 mais de 2/3. Il en est de même pour le volume de solution d'élution utilisée et le volume des deux derniers lavages qui étaient également de 2/3 de volume IV au lieu des 1/10 lorsqu'il s'agissait de cellules HeLa. Enfin, les éluats et lavages n'ont dans ce cas pas été concentrés.

Le matériel concentré a ensuite été utilisé pour la réalisation de grands gels en vue d'une analyse des bandes correspondant à TAF10 en spectrométrie de masse.

Cette préparation a été effectuée avec l'aide d'Elisabeth Scheer, ingénieure de recherche dans le laboratoire du Dr. TORA.

#### I. Coloration à l'argent compatible avec la spectrométrie de masse

Pour ce protocole, les bacs et éprouvettes doivent être en verre, propres, et les solutions préparées avec de l'eau ultrapure (MilliQ). Le gel de polyacrylamide a été lavé très rapidement à l'eau MilliQ, puis fixé dans une solution à 30% éthanol et 5% acide acétique pendant 3x 30 min ou 1h puis toute la nuit à température ambiante. 200 ml suffisent à chaque étape pour un gel 10/15 cm. Il a alors été lavé 4x 10 min à l'eau MilliQ, puis sensibilisé dans une solution à 0,02% (p/v) de thiosulfate de sodium. Deux nouveaux lavages à l'eau d'1 min ont été réalisés, puis le gel a été incubé dans la solution de coloration (2 g/l Nitrate d'argent, 0,028% formaldéhyde 37% à ajouter extemporanément) 30 à 45 min. Il a ensuite été lavé très rapidement à l'eau MilliQ et incubé dans la solution de révélation (17,6 g/l de carbonate de

sodium non hydraté ; 0,0025% thiosulfate de sodium, 0,028% formaldéhyde 37% à ajouter extemporanément). Cette révélation doit se faire dans la mesure du possible à l'abri de la lumière, et son degré est à estimer visuellement. L'arrêt de la coloration a été réalisé par incubation dans la solution stop (Tris 40 g/l ; 2% v/v acide acétique) pendant 30 à 60 min.

#### J. Préparation d'échantillons et analyse par spectrométrie de masse

#### Digestion de protéine dans le gel :

L'ensemble des opérations suivantes a été réalisé dans une pièce « blanche » et l'opérateur portait une blouse propre fermée à l'arrière, une charlotte, un masque et des gants. Tout le matériel (tips, verre, spatule) doit avoir été protégé du contact avec la peau, et si possible stérilisé. L'eau et les solvants doivent être ultrapurs.

Les bandes découpées ou spots de gel SDS PAGE ont été placés dans des tubes Eppendorf et lavés successives par deux solutions alternées, (volume à évaluer de façon à largement immerger les bandes) : première solution 25 mM carbonate d'ammonium, puis agitation 5 min sur un vortex à plateau, puis deuxième solution acétonitrile, puis agitation 5 min sur un vortex à plateau. Cette routine a été répétée 3 fois. Le reste d'acétonitrile du dernier lavage a été éliminé par évaporateur rotatif (speedvac) pendant 10 min. La bande a alors été incubée dans une solution de réduction (10 mM DTT dans 25 mM carbonate d'ammonium) pendant 1h à 57°C. La solution de réduction a ensuite été remplacée par une solution d'alkylation (55 mM Iodoacétamide dans 25 mM carbonate d'ammonium) pour une nouvelle incubation d'1h à température ambiante et à l'obscurité.

Après cela, la bande ou le spot a été soumis à nouveau à trois cycles de lavages identiques aux précédents, puis séché dans un évaporateur rotatif pendant 10 min. On a alors ajouté une solution de digestion (trypsine à 12,5 ng/µl dans 25 mM carbonate d'ammonium), de façon à réhydrater complètement le gel et le couvrir, sans pour autant être en excès. L'état de réhydratation doit être vérifié 20 min après l'ajout de la solution de digestion. La digestion a été laissée pendant 12 à 16h (une nuit) à 37°C.

Les peptides résultants de la digestion enzymatique ont été extraits du gel par l'ajout d'acétonitrile de façon à atteindre une concentration sur le gel de 30%, et sonication pendant 15 min. Le surnageant a été récupéré et remplacé par une solution à 60% d'acétonitrile pour une seconde extraction de 15 min par sonication. Les deux fractions ont été regroupées et concentrées dans un évaporateur rotatif avant d'être analysées en MALDI-TOF ou ESI-IT.

Concentration et dessalage de mélange peptidique sur micro-colonne de phase inverse (ZIPTIPC18, Millipore) :

On a utilisé de l'eau ultrapure pour ce protocole.

Un mélange peptidique de quelques microlitres, contenant des sels et/ou détergents a tout d'abord été additionné d'acide trifluoroacétique qsp 0,1% final, sans dépasser 10  $\mu$ l. Un cône zip-tip a été équilibré par aspiration d'une solution d'acétonitrile à 50%, puis 3 à 4 aspirations de 0,1% acide trifluoroacétique. Les peptides ont été fixés sur le zip-tip par 5 à 10 cycles aspiration/rejet du mélange. Le cône a alors été lavé par une autre série de cycles aspiration/rejet d'une solution à 0,1% acide trifluoroacétique. Indépendamment, 2 à 4  $\mu$ l de 50% acétonitrile ont été distribués dans un tube pour chaque échantillon. L'élution des peptides dessalés a été faite par aspiration/rejet de cette solution, qui a ensuite pu être analysée en MALDI-TOF ou ESI-IT.

#### Acquisition de spectres MALDI-TOF :

Les analyses de protéine mentionnées ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse REFLEX IV (Bruker Daltonics), et des logiciels XMASS, XTOF et FLEXANALYSIS (Bruker Daltonics). Les matrices organiques, l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) et l'acide dihydroxybenzoïque (DHB) proviennent de la société (Fluka ou Sigma). Les dépôts ont été faits sur une cible SCOUT 384 (Bruker Daltonics).

Dépôt sandwich : cette méthode n'est compatible qu'avec la CHCA, insoluble dans l'eau. Deux solutions de matrice sont préparées : 1 = solution saturée dans l'acétone, 2 = solution à 10 mg/ml dans 50% acétonitrile. 0,5 µl de matrice 1 sont déposés sur la plaque cible, et séchés à l'air libre. On dépose alors dessus 0,5 µl de 5% acide formique, puis 0,5 µl d'échantillon. Avant que ce dernier dépôt ne soit évaporé, on le couvre par 0,5 µl de solution de matrice 2. Le dépôt complet est séché à l'air libre ou dans une cloche à vide pendant 5 min. S'il présente un excès de sels, le spot est lavé en déposant dessus une goutte (1 µl) de 5% acide formique, qui est ré-aspirée, ou chassée à l'aide d'une poire.

Dépôt goutte séchée : une solution de matrice à 10 mg/ml dans de l'acétonitrile à 50 est préparée. Sur la plaque cible du spectromètre,  $0,5 \mu l$  d'échantillon sont déposés est mélangés à  $0,5 \mu l$  de solution de matrice. Ce dépôt est séché à l'air libre ou sous une cloche à vide. Dans le cas de la matrice CHCA, un lavage à l'acide formique peut être effectué comme décrit ci-dessus.

Les échantillons présentés dans ce travail ont été analysés majoritairement en mode positif, dans une configuration réfléctron. La source d'ions a été paramétrée dans les conditions suivantes : fluence laser entre 15 et 20% pour la matrice CHCA, 35 à 40% pour la DHB ; tensions : IS1 20 kV IS2 17,2 kV Lens 9 kV Reflector 23 kV ; délai d'extraction de 400 ns ; suppression des masses inférieures à 800 Da.

La calibration externe en masse a été réalisée à l'aide d'un mélange de peptides synthétiques : angiotensine 1046,54 Da ; Substance P 1348,72 Da ; Bombesine 1620,80 ; Unknown 2004,94 ; ACTH 2465,47. Dans certains cas, les peptides d'autodigestion de la trypsine ont été utilisés pour une calibration interne (842,51 et 2211,11).

#### Acquisition de spectre MALDI-TOF-TOF :

Afin d'obtenir la séquence en acides aminés de peptides intéressants, un dépôt goutte séchée a été réalisé avec un matrice CHCA ultrapure (méthode du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique de Strasbourg). Celle-ci a été diluée à saturation dans de l'acétonitrile 50% et le surnageant de cette dilution a lui-même été dilué 3 fois dans de l'acétonitrile à 70 % pour obtenir la fraction à utiliser. Le dépôt a été réalisé sur une cible SCOUT et analysé en mode positif, dans un appareil ULTRAFLEX (Bruker-Franzen analytic GmbH, Bremen, Germany), commandé par le logiciel Flexcontrol 2.0. L'ionisation est due à l'irradiation du dépôt par un laser à azote de longueur d'onde 337 nm et de fréquence de tir de 10 à 20 Hz. Sa puissance est modulée entre 150 et 200 µJ. Une acquisition représente en général plus de 100 tirs accumulés pour réduire le rapport signal sur bruit. La source d'ionisation a été paramétrée de la façon suivante: IS1 : 20 kV, IS2 : 17,5 kV, lens 21 kV ; délai d'extraction : 400 ns. L'acquisition du spectre MS a été faite à l'aide d'une tension d'accélération maximale de 25 kV. Les ions de fragmentation sont alors obtenus par décomposition induite par laser (LID : Laser Induced Decomposition) d'un ion précurseur sélectionné dans le premier tube de vol. Dans ce cas, tous les ions précurseurs sont accélérés à 8 kV puis l'un est sélectionné et décomposé dans l'interface « timed ion gate ». Les fragments sont ré-accélérés par une tension de 19 kV dans l'interface LIFT, puis résolus dans le second tube de vol en mode réflecteur.

L'étalonnage externe de la gamme de masse a été réalisé à l'aide d'un mélange de peptides synthétiques, car la protéase ArgC ne donne pas de peptide d'autolyse utilisable pour la calibration. Leurs masses sont les suivantes : 712,38 Da ; 1046,54 Da ; 1348,72 Da ; 1620,81 Da ; 2004, 95 Da.

Les fragments ont été analysés à l'aide du logiciel Biotools 2.2.

Recherche par empreinte peptidique dans les banques de données de protéines :

Les listes de masses peptidiques obtenues par MALDI sont soumises via les logiciels MSFit, Mascot et Profound à une comparaison à des listes de masses peptidiques issues de digestion *in silico* des protéines des banques Swissprot et NCBI. Pour cela les paramètres sont les suivants : le plus souvent une seule protéine candidate est demandée, dans l'espèce dont est issu l'échantillon et chez les rongeurs (contaminants d'anticorps). Le point isoélectrique n'est pas précisé, mais on fixe une gamme de poids moléculaires en fonction de celui donnée par la position du spot sur le gel. Les modifications potentielles des peptides endogènes, ou dues au traitement du gel ne sont pas prises en compte, à l'exception de la modification par l'iodoacétamide des cystéines. Un minimum de 3 masses attribuées est requis pour retenir la protéine candidate, et une précision sur la masse de ces peptides de 30 à 50 ppm. Enfin, les masses sont soumises au moteur de recherche en tant que masses monoisotopiques chargées par un proton.

Une recherche systématique des peptides attribués aux kératines humaines a été faite sur chaque échantillon pour minimiser les faux positifs.

En cas d'identification douteuse, la liste de masse a été soumise avec la protéine candidate aux logiciels Findpep et Findmod (swissprot) pour élargir éventuellement le recouvrement de la séquence.

Tout le travail de préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse et leur analyse a été réalisé par le Dr Manuela Argentini, responsable du service de spectrométrie de masse à l'IGBMC.

#### **III.Résultats**

Dans le souci d'effectuer nos recherches chez les mammifères, mais aussi en raison des anticorps dont nous disposons qui se trouvent être essentiellement dirigés contre des protéines humaines, nous avons décidé de travailler à partir d'extraits protéiques de cellules HeLa.

# A. Recherche de l'existence de modifications post-traductionnelles sur la protéine TAF10 dans des extraits cellulaires

Étant donné que certaines modifications altèrent légèrement l'encombrement de la protéine et/ou sa charge, celles-ci peuvent provoquer une différence de migration lorsque les extraits protéiques de cellules sont soumis à une électrophorèse simple ou bidimensionnelle. Aussi, afin de vérifier la présence de modifications post-traductionnelles sur TAF10, nous nous sommes penchés sur son profil obtenu par les techniques de « *Western Blot* » (WB) et de gel en deux dimensions. Cette dernière expérience se déroule en fait en deux étapes. Les protéines sont d'abord séparées en fonction de leur point isoélectrique (pI) puis elles subissent une deuxième migration sur un gel de polyacrylamide classique pour être séparées en fonction de leur masse. Les protéines de même masse mais de charges différentes vont ainsi pouvoir être différenciées.

L'étude par WB du profil de TAF10 fait apparaître 3 bandes distinctes alors que la protéine témoin TBP ne montre qu'une unique bande (Fig.34.A). TAF10 semble donc exister au moins sous trois formes différentes dans les cellules, avec une dominance des deux formes migrant le plus vite, représentées par les deux bandes les plus basses.

De son côté, le gel en deux dimensions montre 5 spots correspondant à la protéine TAF10 alors qu'un seul apparaît pour la protéine témoin TAF7 (Fig.34.B). Ces spots peuvent être répartis en deux populations. Trois d'entre eux, de même poids moléculaire et ne variant donc que par leur pI, sont plus intenses et semblent correspondre à la bande la plus basse révélée sur le WB. Ils sont numérotés 1, 2 et 3 dans l'ordre de leur pI décroissant. Les deux autres spots, annotés de la même façon 4 et 5, sont plus faibles et migrent à la même hauteur que la bande médiane de TAF10 sur le WB. De par son intensité, le spot 1 pourrait représenter la forme la plus abondante de TAF10 dans la cellule. Viendraient ensuite les formes matérialisées par les spots 2 et 3, puis celles des spots 4 et 5.



<u>Figure 34</u>: TAF10 existe sous différentes formes probablement issues de modifications posttraductionnelles dans les cellules HeLa. A. « Western Blot » de gel à 12,5% de polyacrylamide réalisé à partir d'extraits protéiques totaux de cellules HeLa. TAF10 et TBP ont été identifiés à l'aide de mélanges d'anticorps dirigés contre chacune des protéines. TBP sert de témoin. B. Gel en deux dimensions réalisé à partir d'extraits protéiques totaux de cellules HeLa. TAF7 et TAF10 ont été identifiés par deux incubations successives avec un mélange d'anticorps dirigés contre l'une puis contre l'autre protéine. Les spots de TAF10 ont été numérotés de 1 à 5 de l'intensité la plus forte à l'intensité la plus faible. TAF7 sert de témoin. Les signes – et + indiquent la polarité du champ électrique appliqué. La correspondance entre les bandes de TAF10 sur le WB et les spots de TAF10 sur le gel 2D est indiquée par des flèches en pointillés. pI = point isoélectrique.

Ces premiers résultats suggèrent l'existence de modifications post-traductionnelles affectant la protéine TAF10. Aussi, afin d'évaluer l'importance de ces modifications dans certains processus biologiques, nous avons voulu savoir si celles-ci manifestaient un dynamisme précis en fonction du cycle cellulaire, mais aussi si TAF10 était modifié de la même façon au sein du complexe TFTC que dans le facteur général de transcription TFIID.

# **B.** Étude des variations des modifications post-traductionnelles de TAF10 en fonction du cycle cellulaire

L'étude des variations des modifications post-traductionnelles de TAF10 en fonction du cycle cellulaire nécessite une bonne synchronisation des cellules. Celles-ci ont donc été arrêtées en phase G1/S ou G2/M du cycle cellulaire. Une petite quantité de ce matériel a alors été analysée par FACS pour s'assurer de l'arrêt du cycle tandis que le reste a servi à obtenir des extraits protéiques.

Les données obtenues en cytométrie de flux ont révélé que les cellules avaient été très efficacement arrêtées aux différentes phases du cycle cellulaire puisque 92% des cellules traitées à la thymidine se trouvaient en G1/S contre les 56% affichés pour la culture non synchronisée, et 75% des cellules traitées au nocodazole se trouvaient en G2/M contre les 25

% de la culture non synchronisée (Fig.35.A). Les cellules ont donc bien été majoritairement arrêtées aux phases G1/S et G2/M du cycle cellulaire.



Figure 35 : Les modifications post-traductionnelles de TAF10 varient en fonction du cycle cellulaire. A. Synchronisation des cellules HeLa. Toutes les cellules ont été fixées, marquées à l'iodure de propidium, puis analysées par FACS. Les cellules arrêtées en G1/S du cycle cellulaire ont été traitées à la thymidine et celles arrêtées en G2/M avec du nocodazole. Les cellules asynchrones n'ont été traitées avec aucun agent. À chaque graphique est associé un tableau répertoriant le nombre de cellules dans les différentes phases du cycle et leur pourcentage par rapport à la totalité. B, C. Gels en deux dimensions réalisés à partir d'extraits protéiques de cellules synchronisées en phase G1/S et G2/M. Le gel en deux dimensions représenté dans la figure 34 obtenu à l'aide d'extraits de cellules non synchronisées a été ajouté ici à titre de comparaison. TAF7 (B) et TAF10 (C) ont été localisés respectivement par un mélange d'anticorps dirigés contre l'une ou l'autre protéine. Outre son rôle de témoin, TAF7 a servi de point de repère pour l'alignement des spots de TAF10. La numérotation des spots de TAF10 est restée identique à celle définie en figure 34. Les signes – et + indiquent la polarité du champ électrique appliqué. pI = point isoélectrique. D. Tableau

répertoriant l'intensité de chaque spot de TAF10 à travers les différentes phases du cycle cellulaire. ++ = forte intensité ; + = intensité moyenne ; +/- = faible intensité ; - = non visible.

Les extraits protéiques totaux préparés à partir des cellules synchronisées aux phases G1/S et G2/M du cycle cellulaire ont alors pu être soumis aux deux migrations successives d'un gel en deux dimensions. Le spot correspondant à la protéine TAF7 restant ici encore unitaire et ne modifiant pas son profil d'un extrait à l'autre, ce dernier a été utilisé comme point de repère pour aligner les spots correspondant à TAF10 (Fig.35.B).

On a ainsi constaté que les trois spots principaux observés antérieurement avec les extraits de cellules asynchrones sont toujours présents lorsqu'il s'agit d'extraits de cellules synchronisées en G1/S ou en G2/M (Fig.35.C). Toutefois, leur intensité varie d'une phase du cycle cellulaire à l'autre, à l'exception du premier qui apparaît, conformément aux résultats précédents, comme le spot le plus important de cet ensemble. Il s'agit donc probablement de la forme dominante de TAF10. De même, le spot 2 n'affiche qu'une faible diminution dans les cellules synchronisées en phase G2/M. Il représente donc éventuellement une autre forme prédominante de TAF10, de pI inférieur à la précédente. Le spot 3, quant à lui, est le plus variable de cette série de trois spots. En effet, alors qu'il se montre aussi intense que les spots 1 et 2 sur l'autoradiographie du gel issue de la culture non synchronisée, il est plus faible dans le cas des cellules synchronisées en phase G1/S (Fig.35.C, comparez les panels du haut et du bas). Cette forme de TAF10, qui pourrait en fait être spécialement modifiée, ne semble donc pas être présente en quantité équivalente à toutes les étapes du cycle cellulaire et paraît être plus spécifique de la phase G1/S.

Les spots 4 et 5 obtenus avec les extraits de cellules asynchrones ont ceci d'intéressant qu'ils sont absents de l'autoradiographie du gel issu des cellules synchronisées en phase G1/S du cycle cellulaire (Fig.35.C, comparez les panels du haut et du centre). Par ailleurs, dans le cas des cellules synchronisées en G2/M, le spot 4 apparaît bien plus intensément que lorsqu'il s'agit d'extraits de cellules asynchrones, contrairement au spot 5 dont l'intensité reste équivalente d'un extrait à l'autre (Fig.35.C, comparez les panels du haut et du bas). Ces deux derniers spots, et plus particulièrement le quatrième, pourraient donc représenter une forme de TAF10 spécifique de la phase G2/M.

Enfin, un spot de plus faible pI, numéroté 6, n'apparaît que dans la culture de cellules synchronisées en phase G2/M (Fig.35.C, comparez les panels du haut et du bas). Bien que ce

spot soit faible, il apparaît spécifiquement dans cette phase du cycle cellulaire et pourrait donc également traduire une forme de TAF10 propre à la phase G2/M.

Ces résultats ont ainsi révélé qu'il existe des formes de TAF10 spécifiques de l'une ou l'autre phase du cycle cellulaire pouvant provenir de modifications post-traductionnelles particulières de la sous-unité.

# C. Étude des modifications post-traductionnelles de TAF10 au sein des complexes TFIID et TFTC

La sous-unité TAF10 pouvant appartenir à plusieurs complexes, dont notamment les facteurs de transcription TFIID et TFTC, il était intéressant pour nous de savoir si l'une des formes observées au cours des précédentes expériences était spécifique d'un de ces deux complexes. Nous devions donc commencer par purifier les complexes à partir des extraits protéiques de cellules HeLa. Pour ce faire, nous avons employé la méthode qui a permis d'identifier le facteur TFTC dans les cellules HeLa et qui consiste en deux immunoprécipitations (IP) successives à l'aide d'un anticorps dirigé contre TAF10 puis d'un autre anticorps dirigé contre la protéine TBP (Wieczorek et al., 1998). L'éluat de la seconde IP contient alors le complexe TFIID purifié tandis que le surnageant de cette même IP contient TFTC.

Les deux complexes ainsi isolés ont ensuite chacun fait l'objet d'un gel en deux dimensions (Fig.36, panel ① et ③). Dans le cas de TFIID, on retrouve les trois principaux spots numérotés 1, 2 et 3 observés au cours des expériences précédentes, mêmes si les spots 2 et 3 sont ici plus faibles (Fig.36, panel ①). La présence des spots 4 et 5 n'est pas aussi évidente. Si le cinquième spot semble effectivement apparaître sur cette autoradiographie, le spot 4 est d'une si forte intensité qu'il se confond avec le spot 2.

En ce qui concerne TFTC, les trois spots majeurs sont encore une fois présents. Par ailleurs, les spots 4 et 5 sont ici facilement distingués et montrent une intensité équivalente aux spots 2 et 3 respectivement. Un sixième spot, de pI plus faible que les précédents, a également fait son apparition (Fig.36, panel ③).

En comparant le profil de TAF10 dans le complexe TFIID à celui qu'il affiche dans le complexe TFTC, on s'aperçoit qu'il existe quelques variations aussi bien au niveau du nombre de formes présentes, et donc, probablement, du nombre de modifications post-traductionnelles touchant la sous-unité, qu'au niveau de leur abondance. En effet, si les trois spots 1, 2 et 4 semblent représenter les formes majeures de TAF10 dans les deux facteurs de

transcription, et ce à des proportions équivalentes, les spots 3 et 5 apparaissent de façon plus intense au sein de TFTC que dans TFIID (Fig.36, panel ① et ③). Ces deux points pourraient donc être dus à des modifications post-traductionnelles ciblant davantage le TAF10 de TFTC que celui de TFIID. Un autre spot, le spot 6, n'est même présent que dans TFTC et traduit donc une forme de TAF10 appartenant uniquement à ce complexe.

Figure 36: Les modifications post-traductionnelles de TAF10 varient en fonction du complexe dans lequel se trouve la sousunité et comprennent des formes phosphorylées. Gels en deux dimensions réalisés à l'aide de complexes TFIID purifiés à partir d'extraits protéigues de cellules HeLa et de surnageant d'IP effectuée sur ces mêmes extraits et contenant TFTC. Les différentes formes de TAF10 ont été localisées par un mélange d'anticorps dirigés contre la sous-unité. Les panels  $\mathcal{D}$  et  $\mathcal{3}$ montrent le profil de TAF10 dans chacun des deux complexes non traités à la phosphatase alcaline intestinale de veau. Les panels 2 et 4 correspondent



quant à eux aux profils de TAF10 obtenus dans ces mêmes complexes préalablement traités à la phosphatase pendant 45 minutes à 37°C. Les spots ont été alignés en fonction du premier spot 1 et de leur localisation sur le gel. La numérotation des spots de TAF10 est restée identique à celle définie en figure 34. Les signes – et + indiquent la polarité du champ électrique appliqué. pI = point isoélectrique.

Aussi, certaines formes de TAF10 sont communes aux deux facteurs de transcription TFIID et TFTC, tandis que d'autres, portant peut-être une modification post-traductionnelle précise, sont plus spécifiques de TFTC.

Il s'agissait donc d'identifier ces différentes formes de TAF10 et, par la même occasion, les modifications post-traductionnelles de la sous-unité.

#### **D.** Identification des modifications post-traductionnelles de TAF10

#### 1. Recherche des formes phosphorylées de TAF10

L'une des modifications post-traductionnelles les plus répandues qui puissent être à l'origine de ce type de profil de spots alignés sur un gel en deux dimensions est la phosphorylation (Pietrogrande et al., 2006). Ainsi, pour tester si ces différentes formes de TAF10 que nous avons distinguées correspondent à des phosphorylations de la protéine, nous avons soumis les extraits protéiques contenant les complexes TFIID ou TFTC à un traitement à la phosphatase alcaline intestinale de veau (CIP pour *Calf Intestinal Phosphatase*) avant de les faire migrer sur un gel en deux dimensions comme précédemment.

La comparaison des profils de TAF10 dans les facteurs de transcription TFIID traitées ou non à la phosphatase montre que le premier spot ne varie pas en intensité, et ne semble donc pas être une forme phosphorylée de TAF10 (Fig.36, panels  $\bigcirc$  et  $\bigcirc$ ). Par contre, d'importantes variations ont été observées pour les autres spots. Tandis que les spots 3 et 5 disparaissent presque complètement, un seul spot plus faible apparaît à hauteur des spots 2 et 4. Un doute subsiste cependant quant à savoir s'il s'agit là du spot 2 ou du spot 4. Des expériences complémentaires ont suggéré qu'il serait en fait question du spot 4, ce qui signifierait que son intensité ait tout de même diminuée par rapport au TFIID non traité, et que le deuxième spot ait disparu comme pour les spots 3 et 5. Les formes de TAF10 matérialisées par les spots 2, 3, 5 et peut-être 4 seraient alors vraisemblablement des protéines phosphorylées à différents degrés.

En ce qui concerne le TAF10 de TFTC, la comparaison entre les complexes traités et non traités est moins aisée. En effet, lorsqu'on observe le profil de TAF10 au sein des TFTC traités à la phosphatase, le problème est de savoir si les spots 1, 2 et 3 sont ici des doublets de fortes intensité qui se confondent pour afficher 7 spots au total en y incorporant le quatrième, ou s'il s'agit d'un seul et même spot à chaque fois conduisant à 4 spots totaux (Fig.36, panel ④). Dans ce cas, des expériences complémentaires suggèrent que TAF10 de TFTC ne présente qu'une somme de 4 spots, validant ainsi la deuxième hypothèse. Il semblerait alors que le traitement à la phosphatase ait fait disparaître les spots 4 et 5 et intensifier les spots 1, 2 et 3 (Fig.36, comparez panels ③ et ④). Le quatrième et le cinquième spot traduiraient donc des formes phosphorylées de TAF10.

À la vue de ces données, il apparaît que parmi les différentes formes de TAF10 observées sur gel en deux dimensions, certaines, quatre pour TFIID et deux pour TFTC,

correspondent à des phosphorylations de la sous-unité. De même, différents degrés de phosphorylation sont retrouvés dans TAF10 selon qu'il soit incorporé dans TFTC ou dans TFIID. La question était alors pour nous de savoir sur quels sites ont lieu ces modifications et s'il existait d'autres modifications post-traductionnelles affectant TAF10 qui ne puissent être distinguées par la technique du gel en deux dimensions, telles que la méthylation.

#### 2. Recherche d'autres modifications de TAF10 par spectrométrie de masse

Nous avons décidé d'utiliser la spectrométrie de masse MALDI-TOF (pour *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight*) en collaboration avec le Dr Manuela Argentini, spécialiste de cette méthode analytique, afin d'identifier les modifications posttraductionnelles de TAF10. Aussi, au lieu d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose comme dans les expériences précédentes, les protéines issues de cellules HeLa ont été séparées sur gel en deux dimensions et colorées au nitrate d'argent. Néanmoins, après séparation, la quantité de protéines n'a pas été suffisante pour l'identification par spectrométrie de masse même après concentration.

Nous avons donc changé de stratégie et, afin d'avoir une quantité suffisante de protéines, nous avons analysé TAF10 après surexpression dans des cellules SF9 d'insectes infectées par des baculovirus contenant un plasmide codant pour la protéine TAF10 humaine. Les extraits protéiques ont été utilisés pour effectuer une IP avec un anticorps dirigé contre TAF10 et l'éluat a été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide classique et coloré au nitrate d'argent. Les bandes correspondant à la protéine TAF10 ont été coupées et digérées dans le gel par des protéases. L'analyse approfondie des spectres et leur interprétation par le logiciel de prédiction de modifications post-traductionnelles « FindMod tool » (http://www.expasy.org/tools/findmod/) ont permis de mettre en évidence des pics spécifiques susceptibles de correspondre à certains peptides modifiés de TAF10.

Les nombreuses répétitions de cette expérience et l'utilisation de protéases variées pour l'étape de digestion des protéines, nous ont permis de prédire cinq sites potentiels de modifications de TAF10 surexprimé dans les cellules d'insectes : R141, K175 et K189 étant les cibles de méthylations ; S186 et S188 celles de phosphorylations (Fig.37).



<u>Figure 37</u>: Plusieurs sites de la protéine TAF10 apparaissent comme potentiellement modifiés suite à l'analyse par spectrométrie de masse. *Les séquences de la protéine TAF10 retrouvées dans plusieurs organismes ont été représentées des acides aminés 128 à 218 chez l'homme et alignées. Les résidus conservés ont été noircis, tandis que les résidus équivalents en charge et en encombrement ont été grisés. Les résidus potentiellement modifiés ont été encadrés selon le code de couleur indiqué dans la légende.* 

Afin de confirmer l'existence de ces modifications potentielles sur la protéine TAF10 endogène, des extraits nucléaires de cellules HeLa ont été soumis à une IP anti-TAF10 et les bandes correspondantes à TAF10 ont été analysées comme décrit précédemment. Les empreintes peptidiques ont confirmé la présence de deux pics pouvant correspondre à deux peptides méthylés : le peptide 125-147, dont l'arginine R141 pourrait être le siège d'une triméthylation, et le peptide 162-175, dont la lysine K175 pourrait être monométhylée (Fig.37). Toutefois, en ce qui concerne le peptide 125-147, sa masse pouvait non seulement correspondre au peptide 125-147 triméthylé en position 141, mais aussi au peptide 165-189 dont une sérine ou une thréonine porterait un groupement octanoate. Cette dernière modification n'étant retrouvée qu'au niveau de la ghréline, une hormone stimulant la sécrétion d'hormone de croissance et intervenant dans la régulation de l'appétit (pour une revue (De Vriese and Delporte, 2007)), son occurrence sur TAF10 nous a semblés peu probable.

Nous avons donc continué l'analyse de spectrométrie de masse des deux pics détectés dans les spectres des protéines TAF10 recombinantes et endogènes. Aussi, pour démontrer sans ambiguïté les méthylations des résidus R141 et K175, les deux peptides ont été fragmentés et analysés par spectrométrie de masse en tandem (MALDI LIFT-TOF, Ultraflex, Bruker). Cette dernière technique permet d'obtenir d'une part, des renseignements sur la séquence des peptides, et d'autre part, de localiser certaines modifications post-traductionnelles. Nous avons pu confirmer que les deux peptides étaient bien des peptides de la protéine TAF10. Cependant les prédictions faites par le logiciel « FindMod tool » concernant les modifications post-traductionnelles se sont révélées fausses. En effet nous avons premièrement pu montrer que le pic prédit comme étant le peptide triméthylé en position 141 était en réalité le peptide 40-68 issu d'une digestion non spécifique inattendue. Et deuxièmement que le pic prédit comme étant le peptide 162-175 mois pas méthylé. Il s'agissait dans ce cas de la cystéine 174 qui était propionamidée, une modification artefactuelle assez fréquente induite par l'acrylamide du gel (Delta mass, <u>http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home</u>).

#### **IV.Discussion et perspectives**

Bien que nous ne soyons pas parvenus à identifier le type de modifications posttraductionnelles affectant TAF10, nous avons pu mettre en évidence au cours de cette étude l'existence de plusieurs formes de la protéine TAF10 et, qui plus est, leur variation suivant les phases du cycle cellulaire ou le complexe auquel appartient la sous-unité. Or ces différentes formes résultent probablement de modifications post-traductionnelles de la protéine qui pourraient affecter l'activité de la protéine dans le complexe de transcription.

Ainsi, conformément à nos résultats, certaines modifications semblent spécifiquement associées à la phase G2/M du cycle cellulaire et pourraient stimuler la transcription de gènes de protéines nécessaires au bon déroulement de la mitose (Fig.35.C et D, spots 4, 5 et 6), tandis que d'autres apparaissent de façon plus ubiquitaire (Fig.35.C et D, spots 1, 2 et 3).

Par ailleurs, nos observations montrent que la protéine TAF10 modifiée représentée par le spot 6 de la figure 36 s'avère être uniquement présente au sein du complexe TFTC. Cependant, ce facteur se trouvant dans un surnageant de double IP, quelques doutes subsistent quant à sa pureté dans notre préparation. Il serait plus probable que notre échantillon contienne en fait plusieurs complexes contenant TAF10 dont les complexes TFTC, STAGA, SMAT et le « complexe à 7 TAFs » (Demeny et al., 2007) (Nagy and Tora, 2007). Aussi, pour analyser précisément quelles formes de TAF10 sont présentes dans ces autres facteurs, il faudrait procéder à une succession d'IPs, la première étant réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine TRRAP, afin de retenir les complexes de type STAGA, TFTC, PCAF/GCN5 et TIP60, et la deuxième faisant intervenir un anticorps dirigé contre une sous-unité spécifique de l'un ou l'autre complexe, comme SPT7L pour le complexe TFTC (Nagy and Tora, 2007). L'absence de TBP, et donc de TFIID, du surnageant de la double IP a néanmoins été avérée par des expériences de WB qui ne figurent pas ici. Nous pouvons donc en conclure que la forme de TAF10 dont il est question (Fig.36, spot 6) est exclue du facteur général de transcription TFIID.

Si les informations obtenues grâce au gel en deux dimensions ne nous permettent pas de déterminer la nature des modifications apparentées à chaque spot, nous pouvons émettre quelques hypothèses reposant sur la position des spots les plus faibles par rapport à celle du spot le plus intense. Le spot 1 a ainsi été désigné comme représentant la forme dominante de TAF10, supposée dépourvue de modifications altérant sa charge. Il apparaît que tous les autres spots ont migré davantage vers le pôle positif, ce qui signifie que les protéines correspondantes sont chargées plus négativement que la forme dominante. Ceci pourrait être la conséquence de l'ajout de groupements chargés négativement dont le plus commun est le phosphate (Pietrogrande et al., 2006). Dans ce sens, nous avons pu observer que certaines des formes de TAF10 présentes dans les complexes TFIID et TFTC sont sensibles à un traitement à la phosphatase, suggérant qu'il s'agisse de protéines phosphorylées à différents degrés (Fig.36). Cette dernière donnée est d'autant plus intéressante que des phosphorylations ont déjà été décrites comme ayant lieu sur certains TAFs au sein du complexe TFIID (détaillées en II.B.2.b de l'introduction) et seraient, entre autre, impliquées dans l'inhibition de l'activation des gènes lors de la mitose (pour une revue (Hoffmann et al., 1997)).

Une nouvelle expérience faisant intervenir un traitement à la phosphatase sur des préparations de complexes issus de cellules synchronisées en phase G1/S ou G2/M du cycle cellulaire pourrait alors nous renseigner sur le dynamisme de ces formes phosphorylées au cours du cycle cellulaire. En outre, dans l'optique d'identifier la kinase responsable de telles modifications, des tests de phosphorylation *in vitro* peuvent être réalisées à l'aide de l'enzyme CKII (pour *Casein Kinase II*), qui a déjà montré pouvoir phosphoryler TAF5, TAF6, TAF7 et TAF1 (Maldonado and Allende, 1999; Sawa et al., 2004), ou des kinases mitotiques Aurora B ou CDK1 (Crosio et al., 2002; Swank et al., 1997). Enfin, TAF1, dont l'activité kinase est impliquée dans la phosphorylation de TFIIF et ce préférentiellement en mitose, pourrait également constituer un bon candidat (Yonaha et al., 1997).

D'autre part, le regroupement de ces spots sur deux lignes parallèles correspondant aux deux bandes les plus basses observées en WB classique suggère la présence d'une ou plusieurs autres modifications affectant la masse de la protéine de façon assez significative pour pouvoir entraîner un ralentissement dans la migration de TAF10 sur gel de polyacrylamide. Une glycosylation pourrait par exemple être responsable de ce type de profil (Seo and Lee, 2004). De plus, comme la phosphorylation, la glycosylation change également la charge de la protéine en la rendant plus négative (Pietrogrande et al., 2006). Il serait donc envisageable que les spots de la ligne la plus haute soient en fait des formes glycosylées de TAF10 auxquelles peuvent éventuellement s'ajouter l'une ou l'autre phosphorylation.

Aussi, la méthode la plus directe pour identifier les modifications d'une protéine est celle que nous avons employé : la spectrométrie de masse. L'obstacle majeur que nous avons rencontré en ce qui concerne cette technique est la quantité de matériel nécessaire pour assurer la caractérisation de ces modifications. En effet, les formes phosphorylées ou méthylées de TAF10 par exemple ne représentent certainement qu'un faible pourcentage du nombre total de TAF10 que peuvent contenir les cellules. Des techniques d'enrichissement

ciblées pour chaque type majeur de modification s'avèrent nécessaires afin de concentrer davantage chaque forme modifiée de TAF10.

Néanmoins, bien que les résultats obtenus par spectrométrie de masse en tandem aient temporairement écarté les sites de méthylation R141 et K175 détectés également dans la protéine TAF10 endogène, deux sites de phosphorylation et un autre site de méthylation avaient été identifiés dans la protéine surexprimée : respectivement S186, S188 et K189. Or quelque temps avant l'obtention de ces résultats, une équipe en collaboration avec la nôtre devait découvrir la présence d'une monométhylation sur la lysine 189, catalysée par la méthyltransférase SET7/9 (Kouskouti et al., 2004). Ce résultat accrédite la méthode que nous avons choisie pour l'identification des modifications de TAF10. Il faudrait donc vérifier si les sérines S186 et S188 sont effectivement phosphorylées, d'autant plus que ce type de modification très labile est particulièrement difficile à isoler en spectrométrie de masse d'où, peut-être, son absence des empreintes peptidiques obtenues pour la protéine endogène.

Pour tester cette hypothèse, nous pourrions muter TAF10 en substituant les acides aminés en question et faire exprimer ces protéines mutées dans des cellules F9 de souris. Une telle opération ayant déjà été effectuée pour créer une souche de cellules dont la lysine 189 a été remplacée par un acide glutamique (Q), nous disposons déjà du système nécessaire pour réaliser cette expérience. Ces nouveaux clones seraient alors soumis à une extraction protéique afin d'étudier le profil de migration sur gel en deux dimensions de la protéine TAF10 comme nous l'avons fait jusqu'ici. La disparition d'un spot en comparaison du profil de TAF10 obtenu pour une protéine sauvage signifierait que la phosphorylation a bien lieu *in vivo*. Une confirmation pourrait être obtenu suite à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine phosphorylée dans des expériences de WB ou d'immunoflurorescence.

Plus tard, si la phosphorylation de S186 et/ou de S188 devait exister *in vivo*, le but serait de savoir quelle fonction elle occupe au sein de la cellule. Des expériences de méthylation *in vitro* effectuées par l'équipe du Dr Iannis Talianidis à l'aide de la méthyltransférase SET7/9 sur des peptides TAF10 ont montré que des peptides TAF10 phosphorylés sur leurs sérines 186 et/ou 188 ne peuvent plus être méthylés par l'enzyme sur leur lysine 189. On pourrait donc envisager l'existence d'une collaboration entre les deux modifications afin de réguler la fonction de TAF10. Ceci pourrait se faire suivant un mécanisme de « commutateur binaire » où l'alternance des formes méthylées et phosphorylées de la sous-unité modulerait son rôle au sein de la cellule.

Enfin, la protéine TAF10 ayant été impliquée dans la progression du cycle cellulaire et dans le phénomène de différenciation pariétale (Metzger et al., 1999), les clones mutés

évoqués précédemment pourraient être comparés au clone sauvage à travers des expériences de suivi du cycle cellulaire et des tests de différenciation. En outre, pour définir quels gènes sont régulés par les complexes associés à ces différentes formes de TAF10, nous pourrions nous servir de l'ARN messager de chaque clone en vue de préparer de l'ADN complémentaire grâce auquel nous analyserions le niveau de transcription des gènes sur une puce d'expression. La comparaison entre le profil obtenu pour les clones mutés et celui obtenu pour le clone sauvage nous indiquerait, pour chaque gène, un changement ou non de son niveau d'expression en réponse à la mutation du site de phosphorylation de TAF10.

Il semble admis, aujourd'hui, que les modifications post-traductionnelles n'ont pas uniquement lieu sur les histones, donnant lieu au « langage de la chromatine » (Berger, 2007), mais également sur les complexes de transcription (sujet traité en partie II.B de l'introduction en ce qui concerne les GTFs). Ne pourrait-on pas envisager alors un mécanisme de régulation similaire faisant intervenir ces complexes? Un éventuel « langage des facteurs de transcription »? Plusieurs modèles peuvent ainsi être proposés quant au rôle exact des modifications post-traductionnelles des complexes de transcription (Fig.38).

Une première hypothèse serait que les modifications de l'une ou l'autre sous-unité du complexe de transcription réguleraient l'expression des gènes transcrits par ce facteur. Ce modèle ferait donc intervenir une sorte de « langage des facteurs de transcription » qui pourrait être la conséquence de mécanismes variés. L'un d'entre eux suggère par exemple la présence de TFIID sur des promoteurs inactifs, comme le promoteur de l'interleukine 2 dans des lymphocytes T inactifs (Brunvand et al., 1993). TFIID pourrait alors remplacer, sur certains promoteurs, la structure nucléosomale grâce à ses motifs HFD et être remodelé, comme les nucléosomes, par des modifications post-traductionnelles permettant ainsi la formation du PIC et l'initiation de la transcription (Fig.38.A) (pour une revue (Hoffmann et al., 1997)). Un autre processus qui ne nécessiterait pas de fixation préalable du facteur de transcription sur le promoteur pourrait conduire, comme il a été observé pour les phosphorylations des sous-unités TBP, TAF6, TAF9 et TAF12 de TFIID, à une inhibition de la transcription dépendante des activateurs (Segil et al., 1996). Un troisième mécanisme enfin impliquerait une influence des modifications sur la formation du PIC au niveau du promoteur, comme pour la phosphorylation de TFIIA ou l'acétylation de TFIIB qui ont montré stabiliser le complexe de préinitiation (Fig.38.B) (Choi et al., 2003; Solow et al., 1999).



Figure 38 : Quelques modèles du rôle des modifications post-traductionnelles des facteurs de transcription. Dans un souci de simplification, seules les modifications post-traductionnelles de TFIID, TAF10 et des histones sont représentées. Dans le même but, l'acétylation des histones a été couplée à la décondensation de la chromatine et la méthylation à sa condensation. A, B. Modèle selon lequel la modification des facteurs de transcription servirait à la régulation de l'expression génique. Deux hypothèses sont présentées pour illustrer le mécanisme par lequel aurait lieu une telle régulation. A. Hypothèse proposant un remplacement de la structure nucléosomale par TFIID sur certains gènes. La modification du facteur permettrait son remodelage et le recrutement des autres membres du PIC. B. Hypothèse soutenant que les modifications des facteurs de transcription. C. Modèle selon lequel les modifications des sous-unités des facteurs de transcription. C. Modèle selon lequel les modifications des sous-unités des facteurs de transcription telles que TAF10 orienteraient les protéines vers l'un ou l'autre complexe en formation afin d'y être incorporées. Les détails pour les différents modèles figurent dans le texte.

L'autre modèle que l'on pourrait formuler reposerait sur un rôle de « marques » des modifications pour guider certaines sous-unités vers l'un ou l'autre complexe. Un TAF10 modifié d'une certaine façon serait ainsi intégré au facteur TFIID, tandis qu'un TAF10 orné de modifications différentes serait incorporé dans TFTC (Fig.38.C).

Ces deux modèles ne sont cependant pas incompatibles et on peut aisément imaginer qu'une fois que la sous-unité TAF10 a gagné un complexe, elle peut encore modifier l'activité de ce complexe en vue de réguler la transcription. En démontrant l'existence de modifications post-traductionnelles sur la sous-unité TAF10 *in vivo* et leur spécificité envers un complexe particulier ou une phase précise du cycle cellulaire, nous révélons que la connaissance de telles modifications est cruciale à la compréhension du rôle de TAF10 dans la cellule. Ce savoir permettra en outre de mieux appréhender le réseau complexe d'interactions sur lequel repose la régulation des gènes et de pouvoir agir en conséquence lorsque celui-ci est défaillant. Aussi, puisque TAF10 semble être impliqué, directement ou indirectement, dans la régulation des gènes engagés dans la progression du cycle cellulaire ou l'apoptose (Kirschner et al., 2002; Metzger et al., 1999; Mohan et al., 2003), la synthèse de nouvelles molécules stimulant ou inhibant la modification de la protéine et altérant ainsi sa fonction pourraient devenir une stratégie adéquate pour arrêter la prolifération de cellules ciblées à différentes étapes de leur développement.

# PARTIE 2

### **PARTIE 2:**

## Caractérisation d'une conformation particulière de la queue N-terminale de l'histone H3 doublement modifiée en mitose

#### I. Historique du projet

Avant mon arrivée au laboratoire, au cours de recherches sur les modifications posttraductionnelles de TAF10 menées en collaboration avec l'équipe du Dr Iannis Talianidis, le site K189 de la sous-unité a montré pouvoir être méthylé *in vitro* et *in vivo* par la méthyltransférase SET7/9 (Kouskouti et al., 2004). Aussi, afin de déterminer le degré de méthylation qui a lieu sur ce résidu, l'équipe du Dr Tora a décidé de synthétiser trois anticorps, chacun dirigé contre un peptide TAF10 monométhylé, diméthylé ou triméthylé.

Lors de la caractérisation d'un de ces anticorps, l'anticorps 51TA2H12 dirigé contre le peptide TAF10 diméthylé (ASGSSRSKSKme2DRKYTLC), nous nous sommes aperçus que si celui-ci n'était pas capable de reconnaître la protéine TAF10 endogène en WB, il pouvait, à notre grande surprise, marquer des cellules F9 dépourvues du gène *taf10* en immunofluorescence (Fig.1.A du papier). De plus, seules les cellules mitotiques étaient ainsi reconnues par l'anticorps 51TA2H12, leur conférant un profil de marquage similaire à celui pouvant être observé à l'aide d'un anticorps spécifique de l'histone H3 phosphorylé sur sa sérine 10 (Hendzel et al., 1997).

Ayant le sentiment que la protéine reconnue par 51TA2H12 pourrait s'avérer nécessaire au bon déroulement de la mitose et contribuer à mieux comprendre les mécanismes régulant cette étape cruciale du cycle cellulaire, nous nous sommes donc consacrés à la caractérisation de cet anticorps dans le but d'en identifier l'épitope.

#### II. Matériel et méthodes

Seul le matériel et les méthodes employés qui n'ont pas été mentionnés dans la publication issue de ce travail actuellement en révision et jointe à ce manuscrit seront développés ici.

#### A. Microinjection de peptides compétiteurs dans des cellules NIH3T3

Quatre peptides modifiés ou non des vingt premiers acides aminés N-terminaux de l'histone H3 ont été synthétisés et purifiés par HPLC (pour *High Performance Liquid Chromatography*) puis utilisés pour les études de microinjection. Les séquences de ces peptides sont : - H3 non modifié : ARTKQTARKSTGGKAPRKQLC

- H3K9me2D10 : ARTKQTARKme2DTGGKAPRKQLC
- H3K9me2A10 : ARTKQTARKme2ATGGKAPRKQLC
- TBP2 : RDQTVTGNKLASEESCRTRD

La veille de l'expérience,  $10^5$  cellules ont été déposées dans une boîte de Petri de 3 cm de diamètre à fond en verre (MatTek). Avant la microinjection, chaque peptide, à une concentration de 10 mg/ml, a été filtré puis mélangé avec du dextran (de masse molaire de 70000 g/moles) conjugué à de l'*oregon green* 488 (Molecular Probes) à une concentration finale de 2,5 mg/ml. Les cellules ont ensuite pu être injectées à l'aide d'aiguilles d'injections Femtotip®II (Eppendorf), dont le diamètre intérieur est de 0,5 µm, et d'un injecteur à air de type Transjector 5246 (Eppendorf). Ce microinjecteur a également été couplé à un microscope optique (Zeiss) pour l'observation des cellules et à un micromanipulateur (5171 Eppendorf) pour leur manipulation. Les injections ont été faites à 100 hectopascals pendant 0,1 seconde. Environ 300 cellules ont été injectées par expérience durant 30 mn. Après la microinjection, les cellules ont été réincubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pendant 1 h avant d'être placées dans la chambre d'acquisition du dispositif utilisé pour le Time lapse.

# **B.** Time lapse pour le suivi des cellules NIH3T3 préalablement microinjectées

Le devenir des cellules microinjectées a été analysé par Time lapse pendant 30 h. Les cellules ont pu être observées à l'aide d'un microscope Time lapse inversé motorisé (Leica DMIRE 2) et muni d'une chambre d'acquisition pour cellules vivantes avec contrôle de la température, du pH et de l'humidité. Avant de placer les cellules dans la chambre

d'acquisition, le milieu a été changé pour un nouveau milieu sans rouge de phénol (toujours composé de DMEM pour *Dulbecco Modified Eagle's Medium* à 4,5 g/l de glucose et 10% de NCS pour *Newborn Calf Serum*). Cette précaution est importante car le rouge de phénol est auto-fluorescent, ce qui peut gêner la visualisation de *l'oregon green* 488. L'observation des cellules a été effectuée en fluorescence, grâce une lampe HBO à vapeur de mercure, et au contraste interférentiel différentiel (DIC pour *Differential Interference Contrast*), au moyen d'une lampe halogène.

L'acquisition des images a été faite grâce à un objectif à sec Leica 20x HC PL APO CS d'ouverture numérique de 0,70 et à une caméra noir et blanc Photometrics Coolsnap FX. Tout le système a été installé sur une table anti-vibrations pour éviter toute instabilité pendant l'acquisition.

L'intégralité du système, et donc l'acquisition, a été piloté par le logiciel Metamorph (version 6.2.r.6), de même que l'analyse des images et la réalisation des films.

#### III. Résultats

Les résultats obtenus au cours de cette étude ayant fait l'objet d'une publication actuellement en révision et jointe à ce manuscrit, seul un résumé de ces données figurera dans cette partie. Toutefois, des résultats complémentaires n'apparaissant pas dans la communication seront davantage développés.

#### A.La publication

Le profil inattendu du marquage obtenu en immunofluorescence avec l'anticorps 51TA2H12 sur des cellules F9 de souris dépourvues du gène codant pour TAF10 nous a conduit à montrer par WB que l'anticorps 51TA2H12 reconnaît spécifiquement l'histone H3 modifié (Fig.1.B du papier). Par ailleurs, des analyses du matériel immunopurifié par l'anticorps en spectrométrie de masse ont montré la présence d'une diméthylation sur le résidu H3K9 ou H3K27 nécessaire à la reconnaissance par 51TA2H12 (Fig.1.C et D du papier).

Néanmoins, ces modifications n'étant pas spécifiques de la mitose, nous avons comparé 51TA2H12 à trois autres anticorps dirigés contre des modifications de l'histone H3 associées à cette phase du cycle cellulaire et déjà décrits dans la littérature : l'anticorps dirigé contre la S10p ( $\alpha$ -S10p) évoqué plus haut (Hendzel et al., 1997), un anticorps dirigé contre la S28p ( $\alpha$ -S28p) (Goto et al., 1999), et un anticorps dirigé contre la double modification K9me2S10p ( $\alpha$ -dimeK9pS10) (Mateescu et al., 2004). Les spécificités de reconnaissance de ces anticorps ont été étudiées par tests ELISA et Dot Blot sur des peptides correspondant aux différentes modifications post-traductionnelles de la queue d'histone H3 (Fig.1.E du papier). Ces expériences nous ont tout d'abord indiqué que l'anticorps 51TA2H12, comme l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10, montre sa meilleure affinité pour H3K9me2S10p et H3K27me2S28p. Ces deux anticorps semblaient donc reconnaître le motif Kme2Sp présent aux positions 9-10 et 27-28 de l'histone H3. Cependant, certaines différences de reconnaissance d'autres peptides ont pu être constatées. Aussi, afin de mieux différencier ces anticorps, nous avons comparé leur profil de reconnaissance *in vivo*.

Ces anticorps étant tous d'excellents marqueurs de la mitose, nous avons décidé d'analyser de façon plus précise l'apparition de leur signal respectif au cours de cette phase du cycle cellulaire par immunofluorescence sur des cellules murines observées en microscopie confocale (Fig.2 du papier). Chaque anticorps a montré un marquage différent du point de vue de son moment d'apparition et de disparition au cours de la mitose. En effet, même si tous ces anticorps reconnaissent un maximum d'histones en métaphase, les anticorps  $\alpha$ -S10p et  $\alpha$ dimeK9pS10 couvrent presque l'intégralité des phases de la mitose, de la G2 tardive à la télophase, alors que les anticorps 51TA2H12 et  $\alpha$ -S28p apparaissent dans des fenêtres de temps plus restreintes, allant de la prophase à l'anaphase. Des résultats semblables qui ne seront pas présentés ici ont été obtenus dans des cellules HeLa et des cellules COS. Pour compléter ces observations, nous avons réalisé un co-marquage en incubant les cellules avec l'anticorps 51TA2H12 et l'anticorps  $\alpha$ -S10p ou  $\alpha$ -S28p (Fig.3 du papier). Bien que les deux anticorps colocalisent en certains points, d'autres régions se montrent plus exclusives pour l'un ou l'autre marquage. Nous en avons donc conclu qu'il existait bien une différence entre les épitopes reconnus par chacun des anticorps et notamment les anticorps 51TA2H12 et  $\alpha$ dimeK9pS10 semblant pourtant reconnaître la même queue d'histone H3 doublement modifiée. Nous avons suggéré que cette dernière distinction repose sur la structure de chacune des queues d'histones H3Kme2Sp reconnues.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé de nouveaux tests ELISA et des expériences de compétition par WB ou par immunomarquage de cellules murines NIH3T3 en utilisant cette fois des peptides dont certains acides aminés pouvant être impliqués dans une conformation de la queue d'histone ont été remplacés (Fig.4 du papier). Nous avons notamment conçu un peptide H3K9me2D10 où la S10 a été remplacée par un acide aspartique (D) pour mimer la charge et l'encombrement d'une sérine phosphorylée. Nous avons alors pu observer que l'anticorps 51TA2H12 reconnaît toujours le peptide muté, à un niveau équivalent à celui constaté pour la reconnaissance du peptide H3K9me2S10p, tandis que les autres anticorps testés, y compris l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10, ne sont pas capables de reconnaître ce peptide muté. Des résultats similaires ont été obtenus avec le peptide H3K27me2D28 où la S28 a été remplacée par un acide aspartique. Aussi, nous en avons conclu que l'épitope de l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 doit contenir la S10 ou la S28 phosphorylée. Par contre, cette même phosphorylation dans l'épitope de l'anticorps 51TA2H12 ne semble être importante que pour sa charge et son encombrement qui s'avèrent être des éléments cruciaux pour l'établissement d'une conformation de la queue d'histone H3.

La reconnaissance par l'anticorps 51TA2H12 d'une queue d'histone structurée a finalement été confirmée par simulation de dynamique moléculaire sur ordinateur en collaboration avec Cédric Grauffel, étudiant en thèse dans l'équipe du Dr Annick Dejaegere (IGBMC). En effet, des tests d'ancrage d'acides aminés puis de chaînes peptidiques, *in silico*,

sur un modèle de la région hypervariable de l'anticorps 51TA2H12 ont permis d'identifier un site favorable pour la liaison d'un tetrapeptide R8-K9me2-S10p-T11 (Fig.5.A, B et C du papier). D'autre part, nous nous sommes aperçus qu'une conformation étirée bien particulière du tetrapeptide, générée suite à l'établissement d'une liaison hydrogène entre les acides aminés K9me2 et S10p, est nécessaire pour permettre sa reconnaissance par l'anticorps 51TA2H12 (Fig.5.C et D du papier). Encore une fois, les mêmes résultats ont été obtenus en considérant un tetrapeptide R26-K27me2-S28p-A29 mettant en jeu les sites modifiables K27 et S28. Aussi, ces observations confortent notre hypothèse selon laquelle les anticorps 51TA2H12 et  $\alpha$ -dimeK9pS10 reconnaissent chacun une conformation différente de la queue d'histone H3 doublement modifiée.

Cette conformation de la queue d'histone H3Kme2Sp ayant essentiellement lieu en métaphase, stade où la chromatine est la plus condensée, nous avons voulu savoir s'il existait un lien entre son apparition et le degré de compaction de la chromatine. En collaboration avec le laboratoire du Dr Patrick Schultz (IGBMC), nous avons réalisé un immunomarquage, avec les anticorps 51TA2H12 et  $\alpha$ -dimeK9pS10, de cryosections de cellules murines NIH3T3 observées en microscopie électronique (Fig.6 du papier). À nouveau, l'anticorps 51TA2H12 et l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 ont montré deux profils complètement différents. En effet, alors que le marquage par  $\alpha$ -dimeK9pS10 apparaît diffus sur l'ensemble des chromosomes métaphasiques, celui obtenu avec 51TA2H12 se concentre sur certaines zones de la chromatine, mettant en évidence de nombreux « filaments » qui correspondraient, par leur taille, à la fibre de chromatine de 30 nm. De plus, certaines parties de ces « filaments » ne sont pas marquées par l'anticorps 51TA2H12 ce qui suggère une spécificité de l'anticorps pour certaines régions de la chromatine métaphasique.

#### **B.** Résultats non publiés

De nombreux autres résultats ont été obtenus tout au long de ce travail. Ainsi, plusieurs données permettent de distinguer davantage les anticorps 51TA2H12 et  $\alpha$ -dimeK9pS10 aussi bien en immunofluorescence observée au microscope confocal qu'en Dot Blot et tests ELISA mettant en scène d'autres peptides H3 ou des peptides TAF10 modifiés.

Mais le point qui reste à élucider est celui de la fonction de cette modification conformationnelle que nous avons mise en évidence. Les expériences visant à répondre à cette question étant en cours, quelques résultats préliminaires seront présentés ici.

#### 1. Étude de la localisation des histones reconnus par les anticorps 51TA2H12 et α-dimeK9pS10 au sein d'une même cellule au cours de la mitose

L'observation au microscope confocal du profil de marquage en immunofluorescence des anticorps 51TA2H12 et  $\alpha$ -dimeK9pS10 nous avait déjà permis de constater une différence entre les deux marquages quant à leur temps d'apparition et de disparition au cours de la mitose (Fig.2 du papier). Néanmoins, leur localisation au sein des cellules semblait assez similaire, ayant essentiellement lieu au niveau de l'hétérochromatine périphérique de la prophase à l'anaphase. Aussi, afin de savoir si les histones reconnus par chacun des anticorps étaient situés au même endroit dans la chromatine mitotique, nous avons procédé au même marquage en immunofluorescence observé au microscope confocal mais en incubant cette fois les cellules NIH3T3 avec un mélange des deux anticorps.

Tout d'abord, conformément à nos précédents résultats, il apparaît que le marquage de 51TA2H12 s'étend de la prophase à l'anaphase précoce, tandis que celui de l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 commence en G2 tardive pour prendre fin au cours de l'anaphase (Fig.39). Puis, à notre grande surprise, nous avons constaté un marquage complètement exclusif d'un anticorps par rapport à l'autre et ce quelle que soit la phase de la mitose ou la concentration des deux anticorps lors du marquage. Seule la métaphase montre quelques rares phénomènes de colocalisation entre les deux anticorps (en jaune sur l'image). On assiste en fait à une délocalisation du marquage de l'anticorps 51TA2H12 dans les régions internes des chromosomes, se rapprochant du profil de marquage d'un anticorps  $\alpha$ -T11p (Preuss et al., 2003).

Il semblerait donc que l'anticorps 51TA2H12 soit également capable de reconnaître cette partie de la chromatine mitotique mais uniquement lorsqu'il y est contraint par


l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10, alors que ce dernier reste spécifique de la chromatine périphérique.

<u>Figure 39</u>: L'anticorps 51TA2H12 occupe les régions internes de la chromatine en présence de l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 qui lui est recruté au niveau de la chromatine périphérique. Les phases de la mitose sont indiquées au-dessus de chaque colonne d'images et les anticorps utilisés en immunofluorescence à gauche de chaque ligne. L'anticorps monoclonal de souris 51TA2H12 a été révélé à l'aide d'anticorps secondaires de chèvre anti-souris couplés à un fluorochrome Cy3 (Jackson Laboratories) tandis que l'anticorps polyclonal  $\alpha$ -dimeK9pS10 a été révélé à l'aide d'anticorps secondaires de chèvre anti-lapin couplés à un fluorochrome Alexa 488 (Jackson Laboratories). L'ADN a été visualisé à l'aide de Hoechst 33258.

#### 2. Étude de la reconnaissance de peptides H3 mutés et de peptides TAF10 par les anticorps 51TA2H12 et α-dimeK9pS10

L'expérience de co-marquage décrite ci-dessus laissant envisagé une affinité de l'anticorps 51TA2H12 pour un histone H3 phosphorylé sur sa thréonine 11, nous avons testé cet anticorps, mais également les anticorps  $\alpha$ -S10p et  $\alpha$ -dimeK9pS10, sur deux peptides H3 phosphorylés en T11, l'un étant également diméthylé en K9 et l'autre non.

Les résultats obtenus ont montré qu'aucun des trois anticorps n'est capable de reconnaître ce type de modification sur la queue N-terminale de l'histone H3, qu'elle soit associée ou non à la diméthylation de K9 (Fig.40 lignes A et B). Aussi, le changement de localisation du marquage de 51TA2H12 observé en immunofluorescence lorsque l'anticorps

est en présence de  $\alpha$ -dimeK9pS10 n'est probablement pas dû à la reconnaissance d'une modification différente de Kme2Sp, mais bien à la distinction entre deux conformations de ce couple de modifications.

D'ailleurs, dans nos recherches sur l'établissement d'une structure interne de la queue d'histone H3, outre les peptides H3 où S10 ou S28 avaient été remplacées par D, d'autres peptides H3 mutés on été testés pour leur reconnaissance par les trois anticorps en Dot Blot et en test ELISA.



<u>Figure 40</u> : 51TA2H12 reconnaît un motif Kme2Sp ou Kme2D aussi bien dans les peptides H3 que dans les peptides TAF10. Analyses par Dot blot et par tests ELISA de la reconnaissance de différents peptides H3 modifiés mutés ou non (lignes A à D) et de peptides TAF10 modifiés ou non (lignes E à I) par les anticorps 51TA2H12,  $\alpha$ -S10p et  $\alpha$ dimeK9pS10. Les alanines en rouge sont les acides aminés de remplacement. La position des acides aminés importants est indiquée au-dessus de chaque peptide. me2 = diméthylation ; p = phosphorylation.

L'arginine 8, pouvant former une liaison hydrogène avec la sérine 10 phosphorylée et ainsi engendrer une structure interne au sein de la queue d'histone (Macdonald et al., 2005), a ainsi été remplacée par une alanine, de même que la proline 16, candidate à une éventuelle isomérisation semblable à celle démontrée pour les prolines 30 et 38 chez la levure (Nelson et al., 2006). Ces deux mutations n'ont cependant pas empêché la reconnaissance des peptides H3 doublement modifiés par les deux anticorps (Fig.40 lignes C et D). Seul le changement de R8 en A semble légèrement diminuer l'affinité de 51TA2H12 pour le peptide sans que l'arginine s'avère toutefois primordiale pour cette reconnaissance (Fig.40 ligne C). Combinés aux données évoquées plus haut, ces résultats montrent que l'anticorps 51TA2H12 nécessite, pour pouvoir reconnaître l'histone H3, K9me2 et S10p ou un acide aminé de charge et d'encombrement équivalent à cette dernière tel un acide aspartique. De plus, contrairement à l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10, la présence de R8 paraît sensiblement accroître la reconnaissance pour le peptide doublement modifié. Notons enfin qu'une telle arginine précède également l'épitope K27me2S28p reconnu plus loin sur la queue d'histone, ce qui conforte l'hypothèse d'un rôle, même mineur, de cette arginine dans la reconnaissance du peptide par 51TA2H12.

Parallèlement, l'anticorps 51TA2H12 ayant été à la base dirigé contre un peptide TAF10 diméthylé en K189, nous avons voulu tester l'affinité de 51TA2H12 mais aussi de  $\alpha$ -dimeK9pS10 pour plusieurs peptides TAF10 différemment modifiés (Fig.40 lignes E, F, G, H et I). Il apparaît que le peptide TAF10 non modifié n'est reconnu ni par l'un ni par l'autre anticorps (Fig.40 ligne E) mais aussi qu'aucun peptide TAF10 ne peut aussi bien les lier que les peptides H3Kme2Sp. Néanmoins, certains de ces peptides TAF10 peuvent fixer l'un ou l'autre anticorps suivant les modifications qu'ils portent. Ainsi, les peptides TAF10S188pK189me2 et TAF10K187me2S188p peuvent aussi bien lier les deux anticorps (Fig.40 lignes G et I), tandis que TAF10K189me2 est spécifiquement reconnu par 51TA2H12 et TAF10S186pK187me2 par  $\alpha$ -dimeK9pS10 (Fig.40 lignes F et H).

En analysant ces données, nous nous sommes aperçus que les peptides TAF10 reconnus par 51TA2H12 possèdent tous un résidu Kme2 suivi d'une Sp ou d'un D. De son côté, l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 montre une affinité particulière pour les peptides portant une lysine diméthylée et une sérine phosphorylée adjacente, sans attribuer d'importance à l'ordre des résidus sur la chaîne peptidique. Les résultats obtenus antérieurement avec les peptides H3 modifiés sont donc confirmés même lorsqu'il s'agit de peptides TAF10. Cependant, *in vivo*, 51TA2H12 est spécifique de H3 et ne reconnaît en aucun cas la protéine TAF10.

## 3. Analyse par simulation de dynamique moléculaire *in silico* de la conformation du peptide H3Kme2Sp reconnue par 51TA2H12

Comme il a été décrit dans la publication, les résultats obtenus par simulation de dynamique moléculaire sur ordinateur en collaboration avec l'équipe du Dr Annick Dejaegere (IGBMC) ont mis en évidence l'existence d'une structure interne au sein de la queue d'histone H3 doublement modifiée provoquée par la formation d'une liaison hydrogène entre les acides aminés K9me2 et S10p ou K27me2 et S28p. En outre, cette structure interne confère une conformation étirée à la chaîne peptidique et s'avère nécessaire à la reconnaissance par l'anticorps 51TA2H12.



<u>Figure 41</u>: 51TA2H12 reconnaît une conformation étirée de la queue d'histone H3 doublement modifiée résultant de la formation d'un lien hydrogène entre K9me2 et S10p et d'une position particulière de R8. A. *Représentation de la conformation étirée reconnue par l'anticorps 51TA2H12*. B. *Représentation d'une autre conformation, de type hélicoïdal, ne pouvant pas être reconnue par 51TA2H12*. Dans ces deux représentations, un « fil » vert plus large met en évidence la chaîne peptidique. C. Vue du tetrapeptide R8-K9me2-S10p-T11 dans sa conformation étirée, comme en A, et lié à la surface de la région hypervariable de

l'anticorps 51TA2H12. Les acides aminés K9me2 et S10p ont été mis en évidence par des structures plus épaisses. Les zones dans lesquelles se trouvent les acides aminés de l'anticorps interagissant avec le peptide sont représentées en couleur. L'aire bleue correspond à la zone d'interaction avec le résidu R8, l'aire verte à la zone d'interaction avec le résidu K9me2 et l'aire magenta à la zone d'interaction avec le résidu S10p.

Lors de ces analyses, il est apparu que la queue d'histone H3 est très dynamique et peut adopter une multitude de conformations. L'une d'entre elle, permettant, comme dans le cas de la conformation étirée (Fig.41.A), la formation d'une liaison hydrogène entre K9me2 et S10p, est de type hélicoïdal (Fig.41.B). Néanmoins, à cause de la position particulière de l'arginine 8, celle-ci ne peut être reconnue par l'anticorps 51TA2H12. Cette observation corrobore celle que nous avons faite précédemment lors des tests ELISA et des Dot blot effectués sur le peptide H3A8K9me2S10p. Il semblerait en effet que R8 puisse interagir avec certains acides aminés précis de la région hypervariable de 51TA2H12 (Fig.41.C). Par ailleurs, si ces interactions ne paraissent pas nécessaires à la liaison de H3 sur 51TA2H12, elles permettent tout de même de stabiliser la chaîne peptidique à la surface de l'anticorps. Ainsi, seule la conformation étirée semble rassembler toutes les conditions conduisant à une reconnaissance maximale par l'anticorps 51TA2H12.

## 4. Recherche d'une fonction pour cette modification conformationnelle de la queue d'histone H3

Toutes ces expériences ayant conduit à une caractérisation précise de l'épitope de l'anticorps 51TA2H12, il nous reste aujourd'hui à comprendre quelle fonction peut avoir une telle modification conformationnelle au sein de la cellule.

Comme cette modification apparaît entre la prophase et l'anaphase de la mitose (Fig.2 du papier) et a montré être spécifique de certaines régions de la fibre de 30nm en microscopie électronique (Fig.6 du papier), nous soupçonnons qu'elle puisse jouer un rôle dans le bon déroulement de la mitose, et plus précisément dans la compaction de la chromatine nécessaire durant cette phase du cycle cellulaire.

Dernièrement, pour tester cette hypothèse, nous avons suggéré que le peptide H3K9me2D10, mimant la modification conformationnelle reconnue par 51TA2H12, interagirait avec les mêmes partenaires que la queue d'histone H3 portant cette modification. Qu'il s'agisse d'autres queues d'histones ou de facteurs impliquées dans la condensation de la chromatine, un excès de ce type de peptide au sein de la cellule devrait alors réquisitionner ces partenaires, ne les laissant plus disponibles pour mener à bien leur fonction. C'est dans

cette optique que nous avons microinjecté des cellules NIH3T3 avec un excès de 4 différents peptides : H3K9me2D10, H3K9me2A10, où la S10 a été remplacé par une alanine, H3 non modifié comme contrôle positif (Van Hooser et al., 1998) et un peptide TBP2 pour un contrôle négatif. Puis nous avons étudié l'effet de cette manipulation sur la division cellulaire en observant les cellules par la technique du « *Time lapse* » pendant 24 à 30 h. La sérine 10 phosphorylée pouvant être impliquée dans le bon déroulement de la mitose (Van Hooser et al., 1998; Wei et al., 1999), nous avons pensé que la microinjection du peptide H3K9me2A10 dépourvu de cet acide aminé n'aurait aucun effet sur le processus de division cellulaire. L'impact de l'injection de peptides H3 non modifiés sur la mitose a quant à lui été montré dans des cellules de hamster CHO où la manipulation provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Van Hooser et al., 1998). Enfin, la protéine TBP2 n'étant présente uniquement dans les cellules germinales femelles (Gazdag et al., 2007), le peptide TBP2 ne devait avoir aucun impact sur la division cellulaire dans les fibroblastes NIH3T3.

Suite à la microinjection des peptides, l'étude du comportement des cellules par Time lapse nous a permis de quantifier les cellules en division, les cellules ne se divisant plus et les cellules mortes. Une centaine de cellules ont ainsi été suivie pour chaque expérience et les résultats ont ensuite été retranscrits en diagrammes (Fig.42.A). Il apparaît alors que les trois quarts des cellules microinjectées avec le peptide TBP2, notre contrôle négatif, continuent à se diviser. Le stress occasionné par l'expérience ne semble donc provoquer que très peu de mort cellulaire et environ une fois sur cinq, l'arrêt du cycle cellulaire ou du moins sa pause pendant les 30h qui suivent la microinjection. Au contraire, le peptide non modifié, interfère dans la division cellulaire pour près de la moitié des cellules. Une grande proportion d'entre elles, 35%, vont même jusqu'à mourir tandis qu'environ une sur huit ne se divisent plus. Étonnamment, le peptide H3K9me2A10 a montré avoir des effets très semblables à ceux du peptide H3 non modifié. En effet, ici aussi, seule la moitié des cellules ont été capables de poursuivre leur division tandis que 17% d'entre elles sont mortes et un tiers ont arrêté de se diviser. Ce peptide semble donc finalement pouvoir interférer dans la mitose et ne constitue pas un bon contrôle. Enfin, notre peptide d'intérêt, H3K9me2D10, provoque l'arrêt d'environ un quart des cellules et la mort de 10% supplémentaires. Il paraît donc pouvoir agir sur la division cellulaire.



<u>Figure 42</u>: La modification conformationnelle reconnue par 51TA2H12 pourrait être impliquée dans la progression des cellules à travers le cycle cellulaire. A. *Diagrammes résumant l'effet de la microinjection de divers peptides dans des cellules NIH3T3 suivies par Time lapse. Chaque diagramme compile les résultats obtenus au cours de trois expériences indépendantes. Une légende indique la correspondance des couleurs.* B. *Histogramme représentant les temps moyens du cycle cellulaire de cellules microinjectées avec différents peptides ou non-microinjectées. Chaque barre correspond à une moyenne de différents temps mesurés entre deux divisions cellulaires associée à sa déviation standard. Ici encore, le graphique répertorie les données obtenues au cours de trois expériences indépendantes pour chaque peptide.* 

Par ailleurs, afin de mettre en évidence un éventuel rallongement du cycle cellulaire dans les cellules microinjectées, nous avons mesuré leur temps moyen de division et l'avons comparé à celui des cellules non injectées au cours d'une même expérience (Fig.42.B). Dans un premier temps, les résultats montrent que tous les peptides, à l'exception du contrôle négatif TBP2, provoquent un ralentissement du cycle cellulaire lorsqu'ils sont injectés dans les cellules. On passe alors d'un temps moyen d'environ 15 h entre deux divisions pour les cellules non-injectées à un temps de 21 h à 23 h suivant le peptide injecté. Le temps du cycle cellulaire est donc, dans les trois cas, augmenté de 40 à 50%. Il n'existe néanmoins aucune différence significative entre les trois peptides.

Ces expériences suggèrent que la modification conformationnelle que nous avons mise à jour a un rôle dans la progression du cycle cellulaire, et plus précisément en mitose puisque c'est à cette phase qu'elle est associée. Néanmoins des expériences complémentaires restent encore à être effectuées pour écarter la possibilité d'un effet sur le cycle cellulaire ne dépendant pas des résidus K9me2 et D10 lors des microinjections de peptides.

#### **IV.** Discussion et perspectives

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus montre que plusieurs queues d'histones H3 subissant des modifications post-traductionnelles identiques, une diméthylation sur la lysine 9 ou 27 suivie d'une phosphorylation sur la sérine adjacente (H3Kme2Sp), peuvent adopter différentes conformations. L'une d'elles, de forme étirée et apparaissant uniquement en mitose entre la prophase et l'anaphase, est par ailleurs spécifiquement reconnue par l'anticorps que nous avons caractérisé : l'anticorps 51TA2H12. Nos données ont également indiqué que cette même conformation ne pouvait pas être reconnue par l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 pourtant lui aussi dirigé contre une queue d'histone H3 diméthylée sur la lysine 9 et phosphorylée sur la sérine 10. Nous avons ainsi pu constater que l'épitope de l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 repose sur la séquence primaire de la queue d'histone en nécessitant la présence d'une lysine diméthylée adjacente à une sérine phosphorylée, alors que 51TA2H12 reconnaît une structure interne particulière au sein de la queue d'histone H3 résultant de la formation d'une liaison hydrogène entre la lysine 9 ou 27 diméthylée et la sérine 10 ou 28 phosphorylée. L'importance de cette liaison hydrogène dans la reconnaissance de l'épitope par 51TA2H12 a en effet été confirmée à l'aide de peptides d'histone H3Kme2D dans lesquels l'acide aspartique mime la charge et l'encombrement de la sérine phosphorylée et permet donc aussi la formation de la liaison hydrogène. De surcroît, ce même peptide n'a pas pu être reconnu par l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10.

D'autre part, nous avons observé qu'un peptide Kme2D, impliquant les résidus K189me2 et D190 au sein de la protéine TAF10 contre laquelle a été généré l'anticorps 51TA2H12, pouvait également lier 51TA2H12 mais pas l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10. Néanmoins, les peptides TAF10K189me2D190 et TAF10K187me2S188p n'ont pas montré de reconnaissance équivalente aux peptides H3Kme2Sp ou H3Kme2D. Une des différences entre les deux protéines consiste en la présence ou non d'une arginine précédent la lysine diméthylée. Ainsi, si ce résidu existe au niveau de l'histone H3, que ce soit en position 8 avant K9me2 ou en position 26 avant K27me2, aucune arginine n'apparaît à côté de la lysine 189 dans le peptide TAF10K189me2D190 ou de la lysine 187 dans le peptide TAF10K187me2S188p. Par ailleurs, le remplacement de R8 par une alanine dans un peptide H3 doublement modifié a permis de retrouver le même niveau de reconnaissance par 51TA2H12 qui avait été observé pour les peptides TAF10. Enfin, les résultats de tests d'ancrage du peptide H3K9me2S10p sur la région hypervariable de 51TA2H12 combinés à

ceux obtenus par simulation de dynamique moléculaire sur ordinateur, ont révélé un rôle pour l'arginine 8 dans la reconnaissance du peptide par l'anticorps 51TA2H12. Celle-ci doit en effet se positionner de façon précise pour permettre à la queue d'histone de s'engouffrer dans la poche de liaison de l'anticorps et interagir avec certains résidus de 51TA2H12. Aussi, tous ces résultats montrent que la présence de l'arginine précédent la lysine 9 ou 27 diméthylée dans la queue d'histone H3 augmente encore la reconnaissance par l'anticorps 51TA2H12 et contribue à la mise en place de la forme étirée particulière que la chaîne peptidique doit adopter pour lier l'anticorps durant la mitose.

Pour résumer ces premiers résultats, nous pourrions envisager un modèle faisant intervenir deux types de conformation au niveau des résidus K9me2S10p ou K27me2S28p. L'une d'entre elles, de forme étirée, serait reconnue par l'anticorps 51TA2H12, et l'autre, comme la conformation hélicoïdale, ne pourrait pas être reconnue par l'anticorps (Fig.43).



<u>Figure 43</u>: Modèle résumant la reconnaissance de la queue d'histone H3 par l'anticorps 51TA2H12 en fonction des modifications qui y ont lieu et de la conformation de la chaîne peptidique. Seule une queue d'histone H3 est représentée pour chaque nucléosome. La conformation hélicoïdale n'est qu'un exemple choisi pour représenter ici une forme de la queue d'histone H3 qui ne serait pas reconnue par 51TA2H12. La reconnaissance de la queue d'histone par l'anticorps est indiquée dans chacun des cas : + = reconnaissance ; - = absence de reconnaissance.

Au cours de nos expériences, nous avons également constaté que cette modification conformationnelle n'apparaît qu'à des étapes particulières de la mitose, entre la prophase et l'anaphase, à la différence de l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 dont le marquage débute plus tôt, en phase G2, pour disparaître plus tard, en télophase. Aussi, si l'apparition du marquage de l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 en phase G2 traduit la présence de queues d'histone H3Kme2Sp à cette phase de la mitose, le fait que cet épitope ne puisse être reconnu à ce stade par 51TA2H12 suggère que les extrémités H3Kme2Sp n'adoptent la conformation nécessaire à la liaison de 51TA2H12 qu'au cours de la prophase. De plus, des expériences complémentaires ont permis de montrer que cette conformation spécifique n'a lieu qu'au niveau de l'histone H3, puisque l'histone H1, qui peut pourtant contenir une séquence modifiée semblable K26me2S27p (Daujat et al., 2005), n'est pas reconnu par notre anticorps (Supp.Fig.1 de la publication).

En outre, alors que cette modification conformationnelle de l'histone H3 semblait se situer dans la région périphérique de la chromatine (Fig.2 de la publication), le mélange de l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10 avec l'anticorps 51TA2H12 a suggéré une toute autre localisation, 51TA2H12 marquant dans ce cas les régions internes de la chromatine. Des expériences complémentaires ont écarté la possibilité d'une reconnaissance d'un autre épitope incluant la thréonine 11 phosphorylée, une modification spécifique des centromères (abordée dans la partie IV.B.1.b de l'introduction) (Preuss et al., 2003). Aussi, il est vraisemblable que la modification conformationnelle mise en évidence par l'anticorps 51TA2H12 prenne place sur l'ensemble du chromosome, aussi bien sur les télomères que sur les centromères, tandis que l'anticorps  $\alpha$ -dimeK9pS10, quelle que soit sa concentration, ne se lie que sur les histones de l'hétérochromatine périphérique.

Pour comprendre le rôle de la queue d'histone H3 doublement modifiée et de conformation étirée, nous nous sommes intéressés à la fonction de la phosphorylation de la sérine 10 qui partage avec H3K9me2S10p une grande spécificité pour la mitose (Hendzel et al., 1997).

La question de savoir si H3S10p est nécessaire à la formation des chromosomes mitotiques ou si elle n'est qu'une marque indiquant à la cellule que les chromosomes sont correctement condensés reste encore très controversée (trois modèles du rôle de H3S10p ont été développés dans la partie IV.B.1.a.iii de l'introduction) (Hans and Dimitrov, 2001)). Il a ainsi été démontré que la phosphorylation de la S10 jouait un rôle important dans la condensation et la ségrégation des chromosomes durant la mitose chez *Tetrahymena* (Wei et

al., 1998) et dans les œufs de xénope (de la Barre et al., 2000). De plus, la phosphorylation de la S10 semble être impliquée dans l'initiation de la condensation de la chromatine chez les mammifères (Van Hooser et al., 1998). Enfin, nous avons pu observer en microscopie confocale dans des expériences complémentaires un phénomène déjà constaté précédemment (Hauf et al., 2003) selon lequel des cellules traitées à l'hespéradine, un inhibiteur de l'enzyme Aurora kinase B responsable notamment de la phosphorylation de H3S10, montrent une difficulté à passer le stade de la métaphase de la mitose. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 semble donc, au moins dans certains organismes, être impliquée dans la condensation de la chromatine en mitose. Elle pourrait donc être importante pour l'acquisition de cette conformation particulière que nous avons décrite, comme le suggère nos résultats préliminaires obtenus par microinjection de peptides compétiteurs suivie d'une analyse par Time lapse. L'apparente redondance des mécanismes impliqués dans la condensation mitotique de la chromatine (pour une revue (Belmont, 2006)) pourrait d'autre part expliquer pourquoi certaines expériences proposent une absence de fonction des queues d'histones et/ou de leurs modifications dans la condensation de la chromatine (de la Barre et al., 2001; Hsu et al., 2000).

Par ailleurs, plusieurs expériences ont montré que la queue d'histone H3 s'associe à l'ADN au sein de la chromatine (Baneres et al., 1997; La Penna et al., 2006). L'une d'entre elles a même révélé que cette interaction s'affaiblit au cours de la métaphase (Sauve et al., 1999). En outre, de récentes données ont suggéré que la liaison entre la queue d'histone H3 et l'ADN serait sensible aux changements de charges et de morphologie de l'une des deux molécules (Arcesi et al., 2007). On peut donc imaginer que la phosphorylation de l'extrémité N-terminale de l'histone H3 en mitose fragiliserait l'interaction entre l'ADN et la queue d'histone, tout comme l'acétylation, conformément à l'hypothèse « électrostatique » évoquée en III.C.5.a de l'introduction (Hong et al., 1993). Un tel dynamisme des attractions électrostatiques au sein de la chromatine a d'ailleurs été suggéré dernièrement suite à des expériences réalisées *in silico* à partir d'un modèle de nucléosome (Muhlbacher et al., 2006).

Néanmoins, si l'on peut concevoir que l'ajout d'une charge négative d'un groupement phosphate au niveau de la queue d'histone puisse favoriser la décondensation de la chromatine en interphase en fragilisant les interactions ADN/histones, le processus par lequel ce phénomène permettrait la condensation de la chromatine en mitose reste obscur.

Aussi, on pourrait supposer que l'association de la phosphorylation avec d'autres modifications comme la diméthylation de la lysine adjacente permettrait à la queue d'histone modifiée de la sorte d'interagir avec un nucléosome voisin via la liaison à l'une de ses queues

d'histones ou à son ADN nucléosomal. Dans ce sens, de récentes études ont montré que les queues d'histones sont importantes pour la régulation de la structure chromatinienne en établissant des interactions internucléosomales. Les queues des histones H3 et surtout H4 interagiraient avec les nucléosomes de la fibre chromatinienne à laquelle elles appartiennent alors que les extrémités des histones H2A et H2B seraient davantage impliquées dans les interactions entre différentes fibres (Arya and Schlick, 2006). Un tel modèle couplé à un certain dynamisme des attractions électrostatiques histones/ADN au sein de la chromatine favoriserait la condensation de la chromatine nécessaire au bon déroulement de la mitose.

On pourrait aussi émettre une autre hypothèse selon laquelle, une fois que les queues d'histones seraient détachées de l'ADN suite à l'ajout de la phosphorylation, l'adoption de la conformation étirée résultant de la formation d'une liaison hydrogène entre les résidus contigus Kme2 et Sp rapprocherait les queues d'histones issues du même nucléosome ou de nucléosomes adjacents. Un tel rassemblement des queues d'histones permettrait à une enzyme modificatrice des histones qui aurait reconnu l'une des extrémités de toutes les modifier, augmentant ainsi son efficacité en terme de rapidité d'action (Fig.7 de la publication, côté gauche). Ceci signifierait que l'on puisse également observer une méthylation ou une déacétylation globale des histones en mitose visant à favoriser la condensation de la chromatine. Or justement, la triméthylation de H3K9 a été montrée comme étant plus importante en mitose (McManus et al., 2006) et une chute de l'acétylation globale de l'histone H3 a pu être constatée dans des fibroblastes mitotiques (Kruhlak et al., 2001). De plus, nos observations au microscope électronique de cryosections de cellules métaphasiques font apparaître un marquage de la fibre chromatinienne sous forme de petits groupes de cinq ou six spots pour l'anticorps 51TA2H12, pouvant traduire un ensemble de queues d'histone H3 spécifiquement modifiées. Au contraire, l'anticorps α-dimeK9pS10 affiche dans ce cas un marquage plus disparate de la chromatine (Fig. 6 de la publication). Aussi, des expériences de co-marquage en immunofluorescence à l'aide de 51TA2H12 et d'anticorps dirigés contre ces modifications dont le taux varie en mitose, ou des études de la variation de ces mêmes modifications par WB sur des extraits de cellules synchronisées, nous renseigneraient davantage sur le bien fondé de ce modèle.

Mais la modification conformationnelle de l'histone H3 pourrait aussi faire office de plateforme pour le recrutement de facteurs nécessaires à la condensation de la chromatine en mitose (Fig.7 de la publication, côté droit). Il a d'ailleurs été suggéré que la queue d'histone phosphorylée sur sa sérine 10 puisse recruter un tel facteur différent de la topoisomérase 2 ou des complexes condensines pourtant impliqués dans l'architecture du chromosome mitotique

(de la Barre et al., 2000). D'un autre côté, il a été montré que la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 régule négativement la liaison des HP1 à H3K9me3 (Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2005). Pourtant, il s'avère aussi que la protéine HP1 $\alpha$  reste associée aux centromères mitotiques et se révèle cruciale pour la cohésion des chromatides (Minc et al., 1999). Il serait alors envisageable que la modification conformationnelle H3Kme2Sp permette le maintien de la liaison de la protéine HP1 $\alpha$  au centromère. Ceci expliquerait la localisation du marquage de l'anticorps 51TA2H12 au niveau des régions internes de la chromatine que nous avons pu observer lorsqu'il a été mis en présence de  $\alpha$ -dimeK9pS10 (Fig.39). Nous pourrions alors tester cette interaction par des expériences de « *peptide pull-down assay* » qui consisterait à essayer d'isoler par chromatographie d'affinité les protéines se liant aux peptides H3Kme2D mimant la modification conformationnelle préalablement fixés sur une colonne SulfoLink® (Wysocka, 2006). Parallèlement, la recherche d'une éventuelle colocalisation de HP1 $\alpha$  avec la modification conformationnelle en question par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti- HP1 $\alpha$  et de 51TA2H12 nous permettrait de valider ou non notre hypothèse. Ces expériences sont d'ailleurs en cours de réalisation.

Récemment, les queues d'histones ont également montré leur importance dans le processus de positionnement des nucléosomes par rapport au promoteur de certains gènes au cours d'expériences in vitro menées à partir de nucléosomes reconstitués de xénope ou de drosophile (Yang et al., 2007). Ces données plaident pour un rôle des queues d'histones dans la régulation de l'expression des gènes en modulant l'accessibilité des promoteurs aux facteurs de transcription. On pourrait alors imaginer une dernière hypothèse quant au rôle de la modification conformationnelle que nous avons mise en évidence selon laquelle l'adoption de la structure interne de l'extrémité H3Kme2Sp engendrerait la mobilité du nucléosome qui découvrirait alors certains promoteurs de gènes impliqués dans la mitose ou au contraire couvrirait les promoteurs de gènes devant être inhibés. Nos résultats obtenus par immunomarquage de cryofractions pourraient corroborer ce modèle puisqu'on y voit que la modification conformationnelle reconnue par l'anticorps 51TA2H12 est localisée en des endroits précis sur la fibre chromatinienne de 30nm (Fig.6 de la publication). Ces positions peuvent en fait correspondre à l'emplacement de gènes particuliers à activer ou à inhiber. L'étude de la localisation précise du marquage de l'anticorps 51TA2H12 par des expériences de « Metaphase Spreads » sur des chromosomes polytènes de drosophile nous confirmerait la présence de la modification conformationnelle sur des régions précises de la chromatine. Si cette spécificité de localisation est vraie, l'utilisation de la technique de « ChIP on chip » nous

renseignera sur l'identité des gènes régulés par la modification conformationnelle. Cette dernière méthode consiste à isoler les fragments de chromatine où notre modification est présente par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP pour *Chromatin ImmunoPrecipitation*) à l'aide de l'anticorps 51TA2H12 puis de déposer cet ADN sur une puce d'expression (*chip* en anglais) qui devra contenir un ensemble d'ADN complémentaires de gènes, exprimés ou non durant la mitose,

À travers cette étude, nous avons donc confirmé l'existence d'une association entre la diméthylation d'une lysine et la phosphorylation de la sérine adjacente au sein de la même queue d'histone. Mais nous avons surtout démontré l'intervention, *in vivo*, d'un phénomène supplémentaire s'ajoutant aux modifications post-traductionnelles pour réguler l'expression génique par les queues d'histones : la formation d'une structure interne entre les deux résidus modifiés entraînant l'adoption d'une conformation étirée par l'extrémité N-terminale de l'histone H3. La compréhension du rôle de ce type de conformation permettra probablement de définir par quels mécanismes certaines modifications comme, dans notre cas, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3, peuvent intervenir dans deux processus opposés tels que l'activation de la transcription et la condensation de la chromatine.

# BIBLIOGRAPHIE

- Agalioti, T., G. Chen, and D. Thanos. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*. 111:381-92.
- Ahmad, K., and S. Henikoff. 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell*. 9:1191-200.
- Ahn, S.H., R.L. Diaz, M. Grunstein, and C.D. Allis. 2006. Histone H2B deacetylation at lysine 11 is required for yeast apoptosis induced by phosphorylation of H2B at serine 10. *Mol Cell*. 24:211-20.
- Ainsztein, A.M., S.E. Kandels-Lewis, A.M. Mackay, and W.C. Earnshaw. 1998. INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J Cell Biol*. 143:1763-74.
- Ait-Si-Ali, S., A. Polesskaya, S. Filleur, R. Ferreira, A. Duquet, P. Robin, A. Vervish, D. Trouche, F. Cabon, and A. Harel-Bellan. 2000. CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene*. 19:2430-7.
- Akhtar, A., and S.M. Gasser. 2007. The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet*. 8:507-17.
- Akoulitchev, S., S. Chuikov, and D. Reinberg. 2000. TFIIH is negatively regulated by cdk8containing mediator complexes. *Nature*. 407:102-6.
- Akoulitchev, S., and D. Reinberg. 1998. The molecular mechanism of mitotic inhibition of TFIIH is mediated by phosphorylation of CDK7. *Genes Dev.* 12:3541-50.
- Albright, S.R., and R. Tjian. 2000. TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene*. 242:1-13.
- Alen, C., N.A. Kent, H.S. Jones, J. O'Sullivan, A. Aranda, and N.J. Proudfoot. 2002. A role for chromatin remodeling in transcriptional termination by RNA polymerase II. *Mol Cell*. 10:1441-52.
- Alexeev, A., A. Mazin, and S.C. Kowalczykowski. 2003. Rad54 protein possesses chromatinremodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Biol.* 10:182-6.
- Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky. 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 51:786-94.
- Altieri, D.C. 2006. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and celldeath decisions. *Curr Opin Cell Biol*. 18:609-15.
- Angelov, D., A. Molla, P.Y. Perche, F. Hans, J. Cote, S. Khochbin, P. Bouvet, and S. Dimitrov. 2003. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell*. 11:1033-41.
- Apone, L.M., C.M. Virbasius, J.C. Reese, and M.R. Green. 1996. Yeast TAF(II)90 is required for cell-cycle progression through G2/M but not for general transcription activation. *Genes Dev.* 10:2368-2380.
- Arcesi, L., G. La Penna, and A. Perico. 2007. Generalized electrostatic model of the wrapping of DNA around oppositely charged proteins. *Biopolymers*. 86:127-35.
- Arents, G., R.W. Burlingame, B.C. Wang, W.E. Love, and E.N. Moudrianakis. 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:10148-52.
- Ares, M., Jr., and N.J. Proudfoot. 2005. The spanish connection: transcription and mRNA processing get even closer. *Cell*. 120:163-6.
- Arita, K., T. Shimizu, H. Hashimoto, Y. Hidaka, M. Yamada, and M. Sato. 2006. Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:5291-6.
- Arya, G., and T. Schlick. 2006. Role of histone tails in chromatin folding revealed by a mesoscopic oligonucleosome model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:16236-41.

- Auty, R., H. Steen, L.C. Myers, J. Persinger, B. Bartholomew, S.P. Gygi, and S. Buratowski. 2004. Purification of active TFIID from Saccharomyces cerevisiae. Extensive promoter contacts and co-activator function. J Biol Chem. 279:49973-81.
- Azuara, V., P. Perry, S. Sauer, M. Spivakov, H.F. Jorgensen, R.M. John, M. Gouti, M. Casanova, G. Warnes, M. Merkenschlager, and A.G. Fisher. 2006. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol*. 8:532-8.
- Baarends, W.M., E. Wassenaar, J.W. Hoogerbrugge, S. Schoenmakers, Z.W. Sun, and J.A. Grootegoed. 2007. Increased phosphorylation and dimethylation of XY body histones in the Hr6b-knockout mouse is associated with derepression of the X chromosome. J Cell Sci. 120:1841-51.
- Baker, B.S. 1989. Sex in flies: the splice of life. Nature. 340:521-4.
- Baneres, J.L., A. Martin, and J. Parello. 1997. The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome. *J Mol Biol*. 273:503-8.
- Bannister, A.J., and T. Kouzarides. 2005. Reversing histone methylation. Nature. 436:1103-6.
- Bao, Y., and X. Shen. 2007. INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutat Res.* 618:18-29.
- Barber, C.M., F.B. Turner, Y. Wang, K. Hagstrom, S.D. Taverna, S. Mollah, B. Ueberheide, B.J. Meyer, D.F. Hunt, P. Cheung, and C.D. Allis. 2004. The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma*. 112:360-71.
- Barlev, N.A., V. Poltoratsky, T. Owen-Hughes, C. Ying, L. Liu, J.L. Workman, and S.L. Berger. 1998. Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex. *Mol Cell Biol*. 18:1349-58.
- Barrero, M.J., and S. Malik. 2006. Two functional modes of a nuclear receptor-recruited arginine methyltransferase in transcriptional activation. *Mol Cell*. 24:233-43.
- Bell, B., E. Scheer, and L. Tora. 2001. Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function. *Mol Cell*. 8:591-600.
- Belmont, A.S. 2002. Mitotic chromosome scaffold structure: new approaches to an old controversy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:15855-7.
- Belmont, A.S. 2006. Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr Opin Cell Biol.* 18:632-8.
- Belmont, A.S., and K. Bruce. 1994. Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J Cell Biol*. 127:287-302.
- Berger, S.L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 447:407-12.
- Bergink, S., F.A. Salomons, D. Hoogstraten, T.A. Groothuis, H. de Waard, J. Wu, L. Yuan, E. Citterio, A.B. Houtsmuller, J. Neefjes, J.H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, and N.P. Dantuma. 2006. DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev.* 20:1343-52.
- Berk, A.J. 2000. TBP-like factors come into focus. Cell. 103:5-8.
- Bernstein, B.E., T.S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S.L. Schreiber, and E.S. Lander. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 125:315-26.
- Bernstein, E., and S.B. Hake. 2006. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem Cell Biol.* 84:505-17.
- Blackwood, E.M., and J.T. Kadonaga. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*. 281:60-3.

- Blake, M.C., R.C. Jambou, A.G. Swick, J.W. Kahn, and J.C. Azizkhan. 1990. Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol Cell Biol*. 10:6632-41.
- Bondarenko, V.A., Y.V. Liu, Y.I. Jiang, and V.M. Studitsky. 2003. Communication over a large distance: enhancers and insulators. *Biochem Cell Biol*. 81:241-51.
- Botuyan, M.V., J. Lee, I.M. Ward, J.E. Kim, J.R. Thompson, J. Chen, and G. Mer. 2006. Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*. 127:1361-73.
- Boulard, M., T. Gautier, G.O. Mbele, V. Gerson, A. Hamiche, D. Angelov, P. Bouvet, and S. Dimitrov. 2006. The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol Cell Biol*. 26:1518-26.
- Bourguet, W., V. Vivat, J.M. Wurtz, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 2000. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell*. 5:289-98.
- Boyer-Guittaut, M., K. Birsoy, C. Potel, G. Elliott, E. Jaffray, J.M. Desterro, R.T. Hay, and T. Oelgeschlager. 2005. SUMO-1 modification of human transcription factor (TF) IID complex subunits: inhibition of TFIID promoter-binding activity through SUMO-1 modification of hsTAF5. *J Biol Chem.* 280:9937-45.
- Bradbury, E.M., R.J. Inglis, H.R. Matthews, and N. Sarner. 1973. Phosphorylation of verylysine-rich histone in Physarum polycephalum. Correlation with chromosome condensation. *Eur J Biochem*. 33:131-9.
- Brand, M., C. Leurent, V. Mallouh, L. Tora, and P. Schultz. 1999. Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC. *Science*. 286:2151-3.
- Brand, M., J.G. Moggs, M. Oulad-Abdelghani, F. Lejeune, F.J. Dilworth, J. Stevenin, G. Almouzni, and L. Tora. 2001. UV-damaged DNA-binding protein in the TFTC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *Embo J.* 20:3187-96.
- Brandeis, M., D. Frank, I. Keshet, Z. Siegfried, M. Mendelsohn, A. Nemes, V. Temper, A. Razin, and H. Cedar. 1994. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*. 371:435-8.
- Breathnach, R., and P. Chambon. 1981. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 50:349-383.
- Briggs, S.D., M. Bryk, B.D. Strahl, W.L. Cheung, J.K. Davie, S.Y. Dent, F. Winston, and C.D. Allis. 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev*. 15:3286-95.
- Brunvand, M.W., A. Krumm, and M. Groudine. 1993. In vivo footprinting of the human IL-2 gene reveals a nuclear factor bound to the transcription start site in T cells. *Nucleic Acids Res*. 21:4824-9.
- Brzeski, J., and A. Jerzmanowski. 2003. Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J Biol Chem.* 278:823-8.
- Buck, S.W., C.M. Gallo, and J.S. Smith. 2004. Diversity in the Sir2 family of protein deacetylases. *J Leukoc Biol*. 75:939-50.
- Buratowski, S. 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. Cell. 77:1-3.
- Burke, T.W., J.G. Cook, M. Asano, and J.R. Nevins. 2001. Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1. *J Biol Chem*. 276:15397-408.
- Cabrejos, M.E., C.C. Allende, and E. Maldonado. 2004. Effects of phosphorylation by protein kinase CK2 on the human basal components of the RNA polymerase II transcription machinery. *J Cell Biochem*. 93:2-10.

- Caldas, C., M.H. Kim, A. MacGregor, D. Cain, S. Aparicio, and L.M. Wiedemann. 1998. Isolation and characterization of a pufferfish MLL (mixed lineage leukemia)-like gene (fMll) reveals evolutionary conservation in vertebrate genes related to Drosophila trithorax. *Oncogene*. 16:3233-41.
- Camporeale, G., E.E. Shubert, G. Sarath, R. Cerny, and J. Zempleni. 2004. K8 and K12 are biotinylated in human histone H4. *Eur J Biochem*. 271:2257-63.
- Carcamo, J., L. Buckbinder, and D. Reinberg. 1991. The initiator directs the assembly of a transcription factor IID-dependent transcription complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:8052-8056.
- Carpenter, A.J., and A.C. Porter. 2004. Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell*. 15:5700-11.
- Carpenter, G. 2003. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 15:143-8.
- Carrozza, M.J., B. Li, L. Florens, T. Suganuma, S.K. Swanson, K.K. Lee, W.J. Shia, S. Anderson, J. Yates, M.P. Washburn, and J.L. Workman. 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell*. 123:581-92.
- Casey, J.L., M.W. Hentze, D.M. Koeller, S.W. Caughman, T.A. Rouault, R.D. Klausner, and J.B. Harford. 1988. Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science*. 240:924-8.
- Chadwick, B.P., and H.F. Willard. 2001. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol*. 152:375-84.
- Chalkley, G.E., and C.P. Verrijzer. 1999. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250- TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *Embo J.* 18:4835-45.
- Chen, Z., and J.L. Manley. 2000. Robust mRNA transcription in chicken DT40 cells depleted of TAF(II)31 suggests both functional degeneracy and evolutionary divergence. *Mol Cell Biol.* 20:5064-76.
- Cheung, W.L., K. Ajiro, K. Samejima, M. Kloc, P. Cheung, C.A. Mizzen, A. Beeser, L.D. Etkin, J. Chernoff, W.C. Earnshaw, and C.D. Allis. 2003. Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*. 113:507-17.
- Cheung, W.L., F.B. Turner, T. Krishnamoorthy, B. Wolner, S.H. Ahn, M. Foley, J.A. Dorsey, C.L. Peterson, S.L. Berger, and C.D. Allis. 2005. Phosphorylation of histone H4 serine 1 during DNA damage requires casein kinase II in S. cerevisiae. *Curr Biol.* 15:656-60.
- Chew, Y.C., G. Camporeale, N. Kothapalli, G. Sarath, and J. Zempleni. 2006. Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase. *J Nutr Biochem.* 17:225-33.
- Chibazakura, T., F. Watanabe, S. Kitajima, K. Tsukada, Y. Yasukochi, and H. Teraoka. 1997. Phosphorylation of human general transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB by DNA-dependent protein kinase--synergistic stimulation of RNA polymerase II basal transcription in vitro. *Eur J Biochem*. 247:1166-73.
- Choi, C.H., Z.F. Burton, and A. Usheva. 2004. Auto-acetylation of transcription factors as a control mechanism in gene expression. *Cell Cycle*. 3:114-5.
- Choi, C.H., M. Hiromura, and A. Usheva. 2003. Transcription factor IIB acetylates itself to regulate transcription. *Nature*. 424:965-9.
- Choi, H.S., B.S. Kang, J.H. Shim, Y.Y. Cho, B.Y. Choi, A.M. Bode, and Z. Dong. 2007. Cot, a novel kinase of histone H3, induces cellular transformation through up-regulation of c-fos transcriptional activity. *Faseb J*.

- Christensen, M.O., M.K. Larsen, H.U. Barthelmes, R. Hock, C.L. Andersen, E. Kjeldsen, B.R. Knudsen, O. Westergaard, F. Boege, and C. Mielke. 2002. Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol*. 157:31-44.
- Churikov, D., J. Siino, M. Svetlova, K. Zhang, A. Gineitis, E. Morton Bradbury, and A. Zalensky. 2004. Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics*. 84:745-56.
- Citterio, E., V. Van Den Boom, G. Schnitzler, R. Kanaar, E. Bonte, R.E. Kingston, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 2000. ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol Cell Biol*. 20:7643-53.
- Clayton, A.L., and L.C. Mahadevan. 2003. MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett.* 546:51-8.
- Clements, A., A.N. Poux, W.S. Lo, L. Pillus, S.L. Berger, and R. Marmorstein. 2003. Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. *Mol Cell*. 12:461-73.
- Coelho, P.A., J. Queiroz-Machado, and C.E. Sunkel. 2003. Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *J Cell Sci*. 116:4763-76.
- Coin, F., J. Auriol, A. Tapias, P. Clivio, W. Vermeulen, and J.M. Egly. 2004. Phosphorylation of XPB helicase regulates TFIIH nucleotide excision repair activity. *Embo J.* 23:4835-46.
- Coin, F., L. Proietti De Santis, T. Nardo, O. Zlobinskaya, M. Stefanini, and J.M. Egly. 2006. p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit. *Mol Cell*. 21:215-26.
- Conaway, R.C., and J.W. Conaway. 1993. General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*. 62:161-90.
- Conaway, R.C., S. Sato, C. Tomomori-Sato, T. Yao, and J.W. Conaway. 2005. The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 30:250-5.
- Cook, J.R., J.H. Lee, Z.H. Yang, C.D. Krause, N. Herth, R. Hoffmann, and S. Pestka. 2006. FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem Biophys Res Commun.* 342:472-81.
- Cooper, S. 2003. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points. *Faseb J.* 17:333-40.
- Cortes, F., N. Pastor, S. Mateos, and I. Dominguez. 2003. Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis. *Mutat Res.* 543:59-66.
- Costanzi, C., and J.R. Pehrson. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*. 393:599-601.
- Costanzi, C., and J.R. Pehrson. 2001. MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family. *J Biol Chem.* 276:21776-84.
- Coulombe, B., and Z.F. Burton. 1999. DNA bending and wrapping around RNA polymerase: a "revolutionary" model describing transcriptional mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:457-78.
- Couture, J.F., E. Collazo, G. Hauk, and R.C. Trievel. 2006. Structural basis for the methylation site specificity of SET7/9. *Nat Struct Mol Biol*. 13:140-6.
- Couture, J.F., and R.C. Trievel. 2006. Histone-modifying enzymes: encrypting an enigmatic epigenetic code. *Curr Opin Struct Biol*. 16:753-60.
- Cramer, P., D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*. 292:1863-76.

- Crosio, C., G.M. Fimia, R. Loury, M. Kimura, Y. Okano, H. Zhou, S. Sen, C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi. 2002. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol*. 22:874-85.
- Cuthbert, G.L., S. Daujat, A.W. Snowden, H. Erdjument-Bromage, T. Hagiwara, M. Yamada, R. Schneider, P.D. Gregory, P. Tempst, A.J. Bannister, and T. Kouzarides. 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*. 118:545-53.
- Dai, J., B.A. Sullivan, and J.M. Higgins. 2006. Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell*. 11:741-50.
- Dantonel, J.C., J.M. Wurtz, O. Poch, D. Moras, and L. Tora. 1999. The TBP-like factor: an alternative transcription factor in metazoa? *Trends Biochem Sci.* 24:335-9.
- Daujat, S., U. Zeissler, T. Waldmann, N. Happel, and R. Schneider. 2005. HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *J Biol Chem.* 280:38090-5.
- Daury, L., C. Chailleux, J. Bonvallet, and D. Trouche. 2006. Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription. *EMBO Rep.* 7:66-71.
- Davey, C.A., D.F. Sargent, K. Luger, A.W. Maeder, and T.J. Richmond. 2002. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *J Mol Biol.* 319:1097-113.
- Davidson, I. 2003. The genetics of TBP and TBP-related factors. *Trends Biochem Sci.* 28:391-8.
- Davidson, I., D. Kobi, A. Fadloun, and G. Mengus. 2005. New insights into TAFs as regulators of cell cycle and signaling pathways. *Cell Cycle*. 4:1486-90.
- de la Barre, A.E., D. Angelov, A. Molla, and S. Dimitrov. 2001. The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *Embo J.* 20:6383-93.
- de la Barre, A.E., V. Gerson, S. Gout, M. Creaven, C.D. Allis, and S. Dimitrov. 2000. Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *Embo J*. 19:379-91.
- de la Cruz, X., S. Lois, S. Sanchez-Molina, and M.A. Martinez-Balbas. 2005. Do protein motifs read the histone code? *Bioessays*. 27:164-75.
- de Napoles, M., J.E. Mermoud, R. Wakao, Y.A. Tang, M. Endoh, R. Appanah, T.B. Nesterova, J. Silva, A.P. Otte, M. Vidal, H. Koseki, and N. Brockdorff. 2004. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell*. 7:663-76.
- De Souza, C.P., A.H. Osmani, L.P. Wu, J.L. Spotts, and S.A. Osmani. 2000. Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in Aspergillus nidulans. *Cell*. 102:293-302.
- De Vriese, C., and C. Delporte. 2007. Ghrelin: A new peptide regulating growth hormone release and food intake. *Int J Biochem Cell Biol.*
- Delaval, K., J. Govin, F. Cerqueira, S. Rousseaux, S. Khochbin, and R. Feil. 2007. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *Embo J.* 26:720-9.
- Demeny, M.A., E. Soutoglou, Z. Nagy, E. Scheer, A. Janoshazi, M. Richardot, M. Argentini, P. Kessler, and L. Tora. 2007. Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PLoS ONE*. 2:e316.
- Deng, W., and S.G. Roberts. 2005. A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes Dev.* 19:2418-23.
- Deng, W., and S.G. Roberts. 2007. TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Chromosoma*.
- Dikstein, R., S. Ruppert, and R. Tjian. 1996a. TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74. *Cell*. 84:781-90.

- Dikstein, R., S. Zhou, and R. Tjian. 1996b. Human  $TAF_{II}105$  is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. *Cell*. 87:137-146.
- Dimitri, P., N. Corradini, F. Rossi, and F. Verni. 2005. The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays*. 27:29-41.
- Dorn, A., J. Bollekens, A. Staub, C. Benoist, and D. Mathis. 1987. A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell*. 50:863-72.
- Dou, Y., T.A. Milne, A.J. Tackett, E.R. Smith, A. Fukuda, J. Wysocka, C.D. Allis, B.T. Chait, J.L. Hess, and R.G. Roeder. 2005. Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell*. 121:873-85.
- Doyen, C.M., W. An, D. Angelov, V. Bondarenko, F. Mietton, V.M. Studitsky, A. Hamiche, R.G. Roeder, P. Bouvet, and S. Dimitrov. 2006. Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol*. 26:1156-64.
- Doyon, Y., C. Cayrou, M. Ullah, A.J. Landry, V. Cote, W. Selleck, W.S. Lane, S. Tan, X.J. Yang, and J. Cote. 2006. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell*. 21:51-64.
- Driscoll, R., A. Hudson, and S.P. Jackson. 2007. Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science*. 315:649-52.
- Dubrovskaya, V., A.C. Lavigne, I. Davidson, J. Acker, A. Staub, and L. Tora. 1996. Distinct domains of hTAFII100 are required for functional interaction with transcription factor TFIIF beta (RAP30) and incorporation into the TFIID complex. *Embo J.* 15:3702-12.
- Dumay-Odelot, H., C. Marck, S. Durrieu-Gaillard, O. Lefebvre, S. Jourdain, M. Prochazkova, A. Pflieger, and M. Teichmann. 2007. Identification, molecular cloning, and characterization of the sixth subunit of human transcription factor TFIIIC. J Biol Chem. 282:17179-89.
- Dvir, A., J.W. Conaway, and R.C. Conaway. 2001. Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev.* 11:209-14.
- Elsby, L.M., and S.G. Roberts. 2004. The role of TFIIB conformation in transcriptional regulation. *Biochem Soc Trans*. 32:1098-9.
- Esteller, M. 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 8:286-98.
- Evans, R., J.A. Fairley, and S.G. Roberts. 2001. Activator-mediated disruption of sequencespecific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB. *Genes Dev.* 15:2945-9.
- Falender, A.E., R.N. Freiman, K.G. Geles, K.C. Lo, K. Hwang, D.J. Lamb, P.L. Morris, R. Tjian, and J.S. Richards. 2005. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev.* 19:794-803.
- Fang, J., T. Chen, B. Chadwick, E. Li, and Y. Zhang. 2004. Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem.* 279:52812-5.
- Faraone-Mennella, M.R. 2005. Chromatin architecture and functions: the role(s) of poly(ADP-RIBOSE) polymerase and poly(ADPribosyl)ation of nuclear proteins. *Biochem Cell Biol.* 83:396-404.
- Feng, Q., H. Wang, H.H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, K. Struhl, and Y. Zhang. 2002. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol.* 12:1052-8.
- Fillingham, J., M.C. Keogh, and N.J. Krogan. 2006. GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem Cell Biol*. 84:568-77.

- Fischle, W., B.S. Tseng, H.L. Dormann, B.M. Ueberheide, B.A. Garcia, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, H. Funabiki, and C.D. Allis. 2005. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*. 438:1116-22.
- Fischle, W., Y. Wang, and C.D. Allis. 2003a. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*. 425:475-9.
- Fischle, W., Y. Wang, S.A. Jacobs, Y. Kim, C.D. Allis, and S. Khorasanizadeh. 2003b. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 17:1870-81.
- FitzGerald, P.C., A. Shlyakhtenko, A.A. Mir, and C. Vinson. 2004. Clustering of DNA sequences in human promoters. *Genome Res.* 14:1562-74.
- Flanagan, J.F., L.Z. Mi, M. Chruszcz, M. Cymborowski, K.L. Clines, Y. Kim, W. Minor, F. Rastinejad, and S. Khorasanizadeh. 2005. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*. 438:1181-5.
- Flaus, A., and T. Owen-Hughes. 2001. Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr Opin Genet Dev.* 11:148-54.
- Flemming, W. 1965. Historical Paper. Contributions to the Knowledge of the Cell and Its Vital Processes. *J Cell Biol.* 25:SUPPL:1-69.
- Forneris, F., C. Binda, M.A. Vanoni, E. Battaglioli, and A. Mattevi. 2005. Human histone demethylase LSD1 reads the histone code. *J Biol Chem.* 280:41360-5.
- Fournier, C., Y. Goto, E. Ballestar, K. Delaval, A.M. Hever, M. Esteller, and R. Feil. 2002. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *Embo J.* 21:6560-70.
- Friesen, W.J., S. Massenet, S. Paushkin, A. Wyce, and G. Dreyfuss. 2001. SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol Cell*. 7:1111-7.
- Frontini, M., E. Soutoglou, M. Argentini, C. Bole-Feysot, B. Jost, E. Scheer, and L. Tora. 2005. TAF9b (formerly TAF9L) is a bona fide TAF that has unique and overlapping roles with TAF9. *Mol Cell Biol*. 25:4638-49.
- Fuchs, M., J. Gerber, R. Drapkin, S. Sif, T. Ikura, V. Ogryzko, W.S. Lane, Y. Nakatani, and D.M. Livingston. 2001. The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell*. 106:297-307.
- Gannon, F., K. O'Hare, F. Perrin, J.P. LePennec, C. Benoist, M. Cochet, R. Breathnach, A. Royal, A. Garapin, B. Cami, and P. Chambon. 1979. Organisation and sequences at the 5' end of a cloned complete ovalbumin gene. *Nature*. 278:428-34.
- Gao, L., M.A. Cueto, F. Asselbergs, and P. Atadja. 2002. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem.* 277:25748-55.
- Garcia, B.A., S.B. Hake, R.L. Diaz, M. Kauer, S.A. Morris, J. Recht, J. Shabanowitz, N. Mishra, B.D. Strahl, C.D. Allis, and D.F. Hunt. 2007a. Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *J Biol Chem.* 282:7641-55.
- Garcia, B.A., J. Shabanowitz, and D.F. Hunt. 2007b. Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 11:66-73.
- Gardner, M.K., and D.J. Odde. 2006. Modeling of chromosome motility during mitosis. *Curr Opin Cell Biol*. 18:639-47.
- Gassmann, R., A. Carvalho, A.J. Henzing, S. Ruchaud, D.F. Hudson, R. Honda, E.A. Nigg, D.L. Gerloff, and W.C. Earnshaw. 2004. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J Cell Biol*. 166:179-91.
- Gautier, T., D.W. Abbott, A. Molla, A. Verdel, J. Ausio, and S. Dimitrov. 2004. Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep.* 5:715-20.

- Gazdag, E., A. Rajkovic, M.E. Torres-Padilla, and L. Tora. 2007. Analysis of TATA-binding protein 2 (TBP2) and TBP expression suggests different roles for the two proteins in regulation of gene expression during oogenesis and early mouse development. *Reproduction.* 134:51-62.
- Gegonne, A., J.D. Weissman, M. Zhou, J.N. Brady, and D.S. Singer. 2006. TAF7: a possible transcription initiation check-point regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:602-7.
- Giacinti, C., and A. Giordano. 2006. RB and cell cycle progression. Oncogene. 25:5220-7.
- Giglia-Mari, G., F. Coin, J.A. Ranish, D. Hoogstraten, A. Theil, N. Wijgers, N.G. Jaspers, A. Raams, M. Argentini, P.J. van der Spek, E. Botta, M. Stefanini, J.M. Egly, R. Aebersold, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 2004. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet*. 36:714-9.
- Giglia-Mari, G., C. Miquel, A.F. Theil, P.O. Mari, D. Hoogstraten, J.M. Ng, C. Dinant, J.H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen. 2006. Dynamic interaction of TTDA with TFIIH is stabilized by nucleotide excision repair in living cells. *PLoS Biol.* 4:e156.
- Gill, G. 2005. Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev.* 15:536-41.
- Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 25:6680-4.
- Gineitis, A.A., I.A. Zalenskaya, P.M. Yau, E.M. Bradbury, and A.O. Zalensky. 2000. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol*. 151:1591-8.
- Glotzer, M. 2005. The molecular requirements for cytokinesis. Science. 307:1735-9.
- Gnatt, A.L., P. Cramer, J. Fu, D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg. 2001. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 A resolution. *Science*. 292:1876-82.
- Goll, M.G., F. Kirpekar, K.A. Maggert, J.A. Yoder, C.L. Hsieh, X. Zhang, K.G. Golic, S.E. Jacobsen, and T.H. Bestor. 2006. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*. 311:395-8.
- Goodman, R.H., and S. Smolik. 2000. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 14:1553-77.
- Goto, H., Y. Tomono, K. Ajiro, H. Kosako, M. Fujita, M. Sakurai, K. Okawa, A. Iwamatsu, T. Okigaki, T. Takahashi, and M. Inagaki. 1999. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. J Biol Chem. 274:25543-9.
- Goto, H., Y. Yasui, E.A. Nigg, and M. Inagaki. 2002. Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells*. 7:11-7.
- Govin, J., E. Escoffier, S. Rousseaux, L. Kuhn, M. Ferro, J. Thevenon, R. Catena, I. Davidson, J. Garin, S. Khochbin, and C. Caron. 2007. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. J Cell Biol. 176:283-94.
- Grant, P.A., D. Schieltz, M.G. Pray-Grant, D.J. Steger, J.C. Reese, J.R. Yates, and J.L. Workman. 1998. A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell*. 94:45-53.
- Graveley, B.R. 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet*. 17:100-7.
- Groth, A., W. Rocha, A. Verreault, and G. Almouzni. 2007. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell*. 128:721-33.
- Guelman, S., T. Suganuma, L. Florens, V. Weake, S.K. Swanson, M.P. Washburn, S.M. Abmayr, and J.L. Workman. 2006. The essential gene wda encodes a WD40 repeat

subunit of Drosophila SAGA required for histone H3 acetylation. *Mol Cell Biol.* 26:7178-89.

- Guillemette, B., and L. Gaudreau. 2006. Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochem Cell Biol.* 84:528-35.
- Guo, X.W., J.P. Th'ng, R.A. Swank, H.J. Anderson, C. Tudan, E.M. Bradbury, and M. Roberge. 1995. Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *Embo J.* 14:976-85.
- Gurley, L.R., J.A. D'Anna, S.S. Barham, L.L. Deaven, and R.A. Tobey. 1978. Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem*. 84:1-15.
- Haering, C.H., J. Lowe, A. Hochwagen, and K. Nasmyth. 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell*. 9:773-88.
- Hagstrom, K.A., V.F. Holmes, N.R. Cozzarelli, and B.J. Meyer. 2002. C. elegans condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev.* 16:729-42.
- Haince, J.F., M. Rouleau, and G.G. Poirier. 2006. Transcription. Gene expression needs a break to unwind before carrying on. *Science*. 312:1752-3.
- Hake, S.B., and C.D. Allis. 2006. Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:6428-35.
- Hake, S.B., B.A. Garcia, E.M. Duncan, M. Kauer, G. Dellaire, J. Shabanowitz, D.P. Bazett-Jones, C.D. Allis, and D.F. Hunt. 2006. Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem.* 281:559-68.
- Hake, S.B., B.A. Garcia, M. Kauer, S.P. Baker, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and C.D. Allis. 2005. Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:6344-9.
- Hamamoto, R., Y. Furukawa, M. Morita, Y. Iimura, F.P. Silva, M. Li, R. Yagyu, and Y. Nakamura. 2004. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol*. 6:731-40.
- Hampsey, M., and D. Reinberg. 1999. RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 9:132-9.
- Han, J., H. Zhou, B. Horazdovsky, K. Zhang, R.M. Xu, and Z. Zhang. 2007. Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science*. 315:653-5.
- Hans, F., and S. Dimitrov. 2001. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*. 20:3021-7.
- Hansen, J.C. 2002. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 31:361-92.
- Hashimoto, Y., H. Akita, M. Hibino, K. Kohri, and M. Nakanishi. 2002. Identification and characterization of Nek6 protein kinase, a potential human homolog of NIMA histone H3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:753-8.
- Hassa, P.O., S.S. Haenni, M. Elser, and M.O. Hottiger. 2006. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:789-829.
- Hassan, A.H., P. Prochasson, K.E. Neely, S.C. Galasinski, M. Chandy, M.J. Carrozza, and J.L. Workman. 2002. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*. 111:369-79.

- Hassan, Y.I., and J. Zempleni. 2006. Epigenetic regulation of chromatin structure and gene function by biotin. *J Nutr.* 136:1763-5.
- Hauf, S., R.W. Cole, S. LaTerra, C. Zimmer, G. Schnapp, R. Walter, A. Heckel, J. van Meel, C.L. Rieder, and J.M. Peters. 2003. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*. 161:281-94.
- Heard, E. 2004. Recent advances in X-chromosome inactivation. Curr Opin Cell Biol. 16:247-55.
- Heard, E., and C.M. Disteche. 2006. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev.* 20:1848-67.
- Heitz, E. 1928. Das heterochromatin der moose. Jahrb Wiss Bot. 69:762-818.
- Helmlinger, D., S. Hardy, G. Abou-Sleymane, A. Eberlin, A.B. Bowman, A. Gansmuller, S. Picaud, H.Y. Zoghbi, Y. Trottier, L. Tora, and D. Devys. 2006. Glutamine-expanded ataxin-7 alters TFTC/STAGA recruitment and chromatin structure leading to photoreceptor dysfunction. *PLoS Biol.* 4:e67.
- Helmlinger, D., S. Hardy, S. Sasorith, F. Klein, F. Robert, C. Weber, L. Miguet, N. Potier, A. Van-Dorsselaer, J.M. Wurtz, J.L. Mandel, L. Tora, and D. Devys. 2004. Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Hum Mol Genet*. 13:1257-65.
- Hendzel, M.J., Y. Wei, M.A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B.R. Brinkley, D.P. Bazett-Jones, and C.D. Allis. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 106:348-60.
- Henikoff, S. 2005. Histone modifications: combinatorial complexity or cumulative simplicity? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:5308-9.
- Hentze, M.W., T.A. Rouault, J.B. Harford, and R.D. Klausner. 1989. Oxidation-reduction and the molecular mechanism of a regulatory RNA-protein interaction. *Science*. 244:357-9.
- Hernandez, N. 1993. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes.Dev.* 7:1291-1308.
- Hilfiker, A., D. Hilfiker-Kleiner, A. Pannuti, and J.C. Lucchesi. 1997. mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in Drosophila. *Embo J*. 16:2054-60.
- Hiller, M., X. Chen, M.J. Pringle, M. Suchorolski, Y. Sancak, S. Viswanathan, B. Bolival, T.Y. Lin, S. Marino, and M.T. Fuller. 2004. Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program. *Development*. 131:5297-308.
- Hiragami, K., and R. Festenstein. 2005. Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cell Mol Life Sci.* 62:2711-26.
- Hirano, M., and T. Hirano. 2002. Hinge-mediated dimerization of SMC protein is essential for its dynamic interaction with DNA. *Embo J.* 21:5733-44.
- Hirano, T. 2005. Condensins: organizing and segregating the genome. Curr Biol. 15:R265-75.
- Hirano, T. 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:311-22.
- Hirota, T., J.J. Lipp, B.H. Toh, and J.M. Peters. 2005. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*. 438:1176-80.
- Hobbs, N.K., A.A. Bondareva, S. Barnett, M.R. Capecchi, and E.E. Schmidt. 2002. Removing the vertebrate-specific TBP N terminus disrupts placental beta2m-dependent interactions with the maternal immune system. *Cell*. 110:43-54.
- Hoffmann, A., C.M. Chiang, T. Oelgeschlager, X. Xie, S.K. Burley, Y. Nakatani, and R.G. Roeder. 1996. A histone octamer-like structure within TFIID. *Nature*. 380:356-9.

- Hoffmann, A., T. Oelgeschlager, and R.G. Roeder. 1997. Considerations of transcriptional control mechanisms: do TFIID-core promoter complexes recapitulate nucleosome-like functions? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:8928-35.
- Hoiby, T., D.J. Mitsiou, H. Zhou, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and H.G. Stunnenberg. 2004. Cleavage and proteasome-mediated degradation of the basal transcription factor TFIIA. *Embo J.* 23:3083-91.
- Holmes, M.C., and R. Tjian. 2000. Promoter-selective properties of the TBP-related factor TRF1. *Science*. 288:867-70.
- Holstege, F.C., U. Fiedler, and H.T. Timmers. 1997. Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *Embo J.* 16:7468-80.
- Holstege, F.C., P.C. van der Vliet, and H.T. Timmers. 1996. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J.* 15:1666-1677.
- Hong, L., G.P. Schroth, H.R. Matthews, P. Yau, and E.M. Bradbury. 1993. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem.* 268:305-14.
- Horikoshi, M., C.K. Wang, H. Fujii, J.A. Cromlish, P.A. Weil, and R.G. Roeder. 1989. Cloning and structure of a yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIID that binds to the TATA box. *Nature*. 341:299-303.
- Houben, A., D. Demidov, A.D. Caperta, R. Karimi, F. Agueci, and L. Vlasenko. 2007. Phosphorylation of histone H3 in plants--a dynamic affair. *Biochim Biophys Acta*. 1769:308-15.
- Hougaard, D.M., L. Bolund, K. Fujiwara, and L.I. Larsson. 1987. Endogenous polyamines are intimately associated with highly condensed chromatin in vivo. A fluorescence cytochemical and immunocytochemical study of spermine and spermidine during the cell cycle and in reactivated nuclei. *Eur J Cell Biol*. 44:151-5.
- Hsu, J.Y., Z.W. Sun, X. Li, M. Reuben, K. Tatchell, D.K. Bishop, J.M. Grushcow, C.J. Brame, J.A. Caldwell, D.F. Hunt, R. Lin, M.M. Smith, and C.D. Allis. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*. 102:279-91.
- Huang, Y., J. Fang, M.T. Bedford, Y. Zhang, and R.M. Xu. 2006. Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science*. 312:748-51.
- Huisinga, K.L., B. Brower-Toland, and S.C. Elgin. 2006. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma*. 115:110-22.
- Huyen, Y., O. Zgheib, R.A. Ditullio, Jr., V.G. Gorgoulis, P. Zacharatos, T.J. Petty, E.A. Sheston, H.S. Mellert, E.S. Stavridi, and T.D. Halazonetis. 2004. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*. 432:406-11.
- Iben, S., H. Tschochner, M. Bier, D. Hoogstraten, P. Hozak, J.M. Egly, and I. Grummt. 2002. TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell*. 109:297-306.
- Ichijima, Y., R. Sakasai, N. Okita, K. Asahina, S. Mizutani, and H. Teraoka. 2005. Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun.* 336:807-12.
- Ikura, T., V.V. Ogryzko, M. Grigoriev, R. Groisman, J. Wang, M. Horikoshi, R. Scully, J. Qin, and Y. Nakatani. 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*. 102:463-73.
- Imhof, A., X.J. Yang, V.V. Ogryzko, Y. Nakatani, A.P. Wolffe, and H. Ge. 1997. Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr.Biol.* 7:689-692.
- Ince, T.A., and K.W. Scotto. 1995. A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters. *J Biol Chem*. 270:30249-52.

- Iniguez-Lluhi, J.A. 2006. For a healthy histone code, a little SUMO in the tail keeps the acetyl away. *ACS Chem Biol.* 1:204-6.
- Jack, J., D. Dorsett, Y. Delotto, and S. Liu. 1991. Expression of the cut locus in the Drosophila wing margin is required for cell type specification and is regulated by a distant enhancer. *Development*. 113:735-47.
- Jacq, X., C. Brou, Y. Lutz, I. Davidson, P. Chambon, and L. Tora. 1994. Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell*. 79:107-117.
- Janicki, S.M., T. Tsukamoto, S.E. Salghetti, W.P. Tansey, R. Sachidanandam, K.V. Prasanth, T. Ried, Y. Shav-Tal, E. Bertrand, R.H. Singer, and D.L. Spector. 2004. From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell*. 116:683-98.
- Jeanmougin, F., J.M. Wurtz, B. Le Douarin, P. Chambon, and R. Losson. 1997. The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci.* 22:151-3.
- Jelinic, P., J.C. Stehle, and P. Shaw. 2006. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol.* 4:e355.
- Johansen, K.M., and J. Johansen. 2006. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res.* 14:393-404.
- Johnson, C.N., N.L. Adkins, and P. Georgel. 2005. Chromatin remodeling complexes: ATP-dependent machines in action. *Biochem Cell Biol.* 83:405-17.
- Jones, K.A., J.T. Kadonaga, P.J. Rosenfeld, T.J. Kelly, and R. Tjian. 1987. A cellular DNAbinding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell*. 48:79-89.
- Juven-Gershon, T., J.Y. Hsu, and J.T. Kadonaga. 2006. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Biochem Soc Trans*. 34:1047-50.
- Kanno, T., Y. Kanno, R.M. Siegel, M.K. Jang, M.J. Lenardo, and K. Ozato. 2004. Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol Cell*. 13:33-43.
- Karachentsev, D., M. Druzhinina, and R. Steward. 2007. Free and chromatin-associated mono-, di-, and trimethylation of histone H4-lysine 20 during development and cell cycle progression. *Dev Biol*. 304:46-52.
- Karanam, B., L. Wang, D. Wang, X. Liu, R. Marmorstein, R. Cotter, and P.A. Cole. 2007. Multiple roles for acetylation in the interaction of p300 HAT with ATF-2. *Biochemistry*. 46:8207-16.
- Karras, G.I., G. Kustatscher, H.R. Buhecha, M.D. Allen, C. Pugieux, F. Sait, M. Bycroft, and A.G. Ladurner. 2005. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *Embo J*. 24:1911-20.
- Kaszas, E., and W.Z. Cande. 2000. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J Cell Sci.* 113 (Pt 18):3217-26.
- Kawasaki, H., L. Schiltz, R. Chiu, K. Itakura, K. Taira, Y. Nakatani, and K.K. Yokoyama. 2000. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature*. 405:195-200.
- Keogh, M.C., S.K. Kurdistani, S.A. Morris, S.H. Ahn, V. Podolny, S.R. Collins, M. Schuldiner, K. Chin, T. Punna, N.J. Thompson, C. Boone, A. Emili, J.S. Weissman, T.R. Hughes, B.D. Strahl, M. Grunstein, J.F. Greenblatt, S. Buratowski, and N.J. Krogan. 2005. Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell*. 123:593-605.

- Kim, J., J. Daniel, A. Espejo, A. Lake, M. Krishna, L. Xia, Y. Zhang, and M.T. Bedford. 2006. Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep.* 7:397-403.
- Kim, J., S.B. Hake, and R.G. Roeder. 2005. The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Mol Cell*. 20:759-70.
- Kim, Y., J.H. Geiger, S. Hahn, and P.B. Sigler. 1993. Crystal structure of a yeast TBP/TATAbox complex. *Nature*. 365:512-520.
- Kimmins, S., and P. Sassone-Corsi. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*. 434:583-9.
- Kimura, H., N. Takizawa, E. Allemand, T. Hori, F.J. Iborra, N. Nozaki, M. Muraki, M. Hagiwara, A.R. Krainer, T. Fukagawa, and K. Okawa. 2006. A novel histone exchange factor, protein phosphatase 2Cgamma, mediates the exchange and dephosphorylation of H2A-H2B. *J Cell Biol*. 175:389-400.
- Kimura, K., and T. Hirano. 1997. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell*. 90:625-34.
- Kimura, K., and T. Hirano. 2000. Dual roles of the 11S regulatory subcomplex in condensin functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:11972-7.
- Kimura, K., V.V. Rybenkov, N.J. Crisona, T. Hirano, and N.R. Cozzarelli. 1999. 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation. *Cell*. 98:239-48.
- Kingston, R.E., and G.J. Narlikar. 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13:2339-52.
- Kireeva, N., M. Lakonishok, I. Kireev, T. Hirano, and A.S. Belmont. 2004. Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J Cell Biol*. 166:775-85.
- Kirschner, D.B., E. vom Baur, C. Thibault, S.L. Sanders, Y.G. Gangloff, I. Davidson, P.A. Weil, and L. Tora. 2002. Distinct mutations in yeast TAF(II)25 differentially affect the composition of TFIID and SAGA complexes as well as global gene expression patterns. *Mol Cell Biol*. 22:3178-93.
- Kitajima, S., T. Chibazakura, M. Yonaha, and Y. Yasukochi. 1994. Regulation of the human general transcription initiation factor TFIIF by phosphorylation. *J Biol Chem.* 269:29970-7.
- Klose, R.J., and A.P. Bird. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 31:89-97.
- Kobor, M.S., S. Venkatasubrahmanyam, M.D. Meneghini, J.W. Gin, J.L. Jennings, A.J. Link, H.D. Madhani, and J. Rine. 2004. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.* 2:E131.
- Kobza, K., G. Camporeale, B. Rueckert, A. Kueh, J.B. Griffin, G. Sarath, and J. Zempleni. 2005. K4, K9 and K18 in human histone H3 are targets for biotinylation by biotinidase. *Febs J.* 272:4249-59.
- Kokubo, T., M.J. Swanson, J.I. Nishikawa, A.G. Hinnebusch, and Y. Nakatani. 1998. The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 18:1003-12.
- Komissarova, N., and M. Kashlev. 1997. RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA. *J Biol Chem.* 272:15329-38.
- Kornberg, R.D., and Y. Lorch. 1999. Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 9:148-51.

- Kothapalli, N., G. Camporeale, A. Kueh, Y.C. Chew, A.M. Oommen, J.B. Griffin, and J. Zempleni. 2005. Biological functions of biotinylated histones. J Nutr Biochem. 16:446-8.
- Kouskouti, A., E. Scheer, A. Staub, L. Tora, and I. Talianidis. 2004. Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. *Mol Cell*. 14:175-82.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. Cell. 128:693-705.
- Kozak, M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. 361:13-37.
- Krishnamoorthy, T., X. Chen, J. Govin, W.L. Cheung, J. Dorsey, K. Schindler, E. Winter, C.D. Allis, V. Guacci, S. Khochbin, M.T. Fuller, and S.L. Berger. 2006. Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev.* 20:2580-92.
- Krogan, N.J., M. Kim, A. Tong, A. Golshani, G. Cagney, V. Canadien, D.P. Richards, B.K. Beattie, A. Emili, C. Boone, A. Shilatifard, S. Buratowski, and J. Greenblatt. 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. 23:4207-18.
- Kruhlak, M.J., M.J. Hendzel, W. Fischle, N.R. Bertos, S. Hameed, X.J. Yang, E. Verdin, and D.P. Bazett-Jones. 2001. Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J Biol Chem.* 276:38307-19.
- Kuersten, S., and E.B. Goodwin. 2003. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet*. 4:626-37.
- Kuhn, E.J., and P.K. Geyer. 2003. Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr Opin Cell Biol.* 15:259-65.
- Kutach, A.K., and J.T. Kadonaga. 2000. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters. *Mol Cell Biol*. 20:4754-64.
- Kuzmichev, A., T. Jenuwein, P. Tempst, and D. Reinberg. 2004. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell*. 14:183-93.
- Kwek, K.Y., S. Murphy, A. Furger, B. Thomas, W. O'Gorman, H. Kimura, N.J. Proudfoot, and A. Akoulitchev. 2002. U1 snRNA associates with TFIIH and regulates transcriptional initiation. *Nat Struct Biol.* 9:800-5.
- La Penna, G., S. Furlan, and A. Perico. 2006. Modeling H3 histone N-terminal tail and linker DNA interactions. *Biopolymers*. 83:135-47.
- Lagrange, T., A.N. Kapanidis, H. Tang, D. Reinberg, and R.H. Ebright. 1998. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 12:34-44.
- Lan, F., P.E. Bayliss, J.L. Rinn, J.R. Whetstine, J.K. Wang, S. Chen, S. Iwase, R. Alpatov, I. Issaeva, E. Canaani, T.M. Roberts, H.Y. Chang, and Y. Shi. 2007. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature*.
- Landry, J., A. Sutton, T. Hesman, J. Min, R.M. Xu, M. Johnston, and R. Sternglanz. 2003. Set2-catalyzed methylation of histone H3 represses basal expression of GAL4 in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*. 23:5972-8.
- Le Guezennec, X., M. Vermeulen, A.B. Brinkman, W.A. Hoeijmakers, A. Cohen, E. Lasonder, and H.G. Stunnenberg. 2006. MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol Cell Biol*. 26:843-51.

- Le May, N., S. Dubaele, L. Proietti De Santis, A. Billecocq, M. Bouloy, and J.M. Egly. 2004. TFIIH transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell*. 116:541-50.
- Lee, D.Y., J.J. Hayes, D. Pruss, and A.P. Wolffe. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*. 72:73-84.
- Lee, D.Y., C. Teyssier, B.D. Strahl, and M.R. Stallcup. 2005a. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev.* 26:147-70.
- Lee, J., J. Sayegh, J. Daniel, S. Clarke, and M.T. Bedford. 2005b. PRMT8, a new membranebound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. J Biol Chem. 280:32890-6.
- Lee, S.H., M. Oshige, S.T. Durant, K.K. Rasila, E.A. Williamson, H. Ramsey, L. Kwan, J.A. Nickoloff, and R. Hromas. 2005c. The SET domain protein Metnase mediates foreign DNA integration and links integration to nonhomologous end-joining repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:18075-80.
- Legube, G., and D. Trouche. 2003. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep.* 4:944-7.
- Lehmann, A.R. 2005. The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 4:309-14.
- Lemon, B., and R. Tjian. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 14:2551-69.
- Lens, S.M., G. Vader, and R.H. Medema. 2006. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol.* 18:616-22.
- Leo, C., and J.D. Chen. 2000. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene*. 245:1-11.
- Leppard, J.B., and J.J. Champoux. 2005. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma*. 114:75-85.
- Leurent, C., S. Sanders, C. Ruhlmann, V. Mallouh, P.A. Weil, D.B. Kirschner, L. Tora, and P. Schultz. 2002. Mapping histone fold TAFs within yeast TFIID. *Embo J.* 21:3424-33.
- Leurent, C., S.L. Sanders, M.A. Demeny, K.A. Garbett, C. Ruhlmann, P.A. Weil, L. Tora, and P. Schultz. 2004. Mapping key functional sites within yeast TFIID. *Embo J*. 23:719-27.
- Lewis, B.A., T.K. Kim, and S.H. Orkin. 2000. A downstream element in the human betaglobin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:7172-7.
- Lewis, J.D., D.W. Abbott, and J. Ausio. 2003. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol*. 81:131-40.
- Li, B., M. Carey, and J.L. Workman. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 128:707-19.
- Li, H., S. Ilin, W. Wang, E.M. Duncan, J. Wysocka, C.D. Allis, and D.J. Patel. 2006. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*. 442:91-5.
- Li, X., G. Sakashita, H. Matsuzaki, K. Sugimoto, K. Kimura, F. Hanaoka, H. Taniguchi, K. Furukawa, and T. Urano. 2004. Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. J Biol Chem. 279:47201-11.
- Lim, C.Y., B. Santoso, T. Boulay, E. Dong, U. Ohler, and J.T. Kadonaga. 2004. The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev*. 18:1606-17.
- Lipp, J.J., T. Hirota, I. Poser, and J.M. Peters. 2007. Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J Cell Sci.* 120:1245-55.

- Liu, D., R. Ishima, K.I. Tong, S. Bagby, T. Kokubo, D.R. Muhandiram, L.E. Kay, Y. Nakatani, and M. Ikura. 1998. Solution structure of a TBP-TAF(II)230 complex: protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP. *Cell*. 94:573-83.
- Lo, K., and S.T. Smale. 1996. Generality of a functional initiator consensus sequence. *Gene*. 182:13-22.
- Lo, W.S., E.R. Gamache, K.W. Henry, D. Yang, L. Pillus, and S.L. Berger. 2005. Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms. *Embo J.* 24:997-1008.
- Long, J.J., A. Leresche, R.W. Kriwacki, and J.M. Gottesfeld. 1998. Repression of TFIIH transcriptional activity and TFIIH-associated cdk7 kinase activity at mitosis. *Mol Cell Biol.* 18:1467-76.
- Losada, A., and T. Hirano. 2001. Intermolecular DNA interactions stimulated by the cohesin complex in vitro: implications for sister chromatid cohesion. *Curr Biol.* 11:268-72.
- Losada, A., and T. Hirano. 2005. Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev.* 19:1269-87.
- Lu, C., F. Zhu, Y.Y. Cho, F. Tang, T. Zykova, W.Y. Ma, A.M. Bode, and Z. Dong. 2006. Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell*. 23:121-32.
- Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature*. 389:251-60.
- Lusser, A., and J.T. Kadonaga. 2003. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays*. 25:1192-200.
- Maas, N.L., K.M. Miller, L.G. DeFazio, and D.P. Toczyski. 2006. Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol Cell*. 23:109-19.
- MacCallum, D.E., A. Losada, R. Kobayashi, and T. Hirano. 2002. ISWI remodeling complexes in Xenopus egg extracts: identification as major chromosomal components that are regulated by INCENP-aurora B. *Mol Biol Cell*. 13:25-39.
- Macdonald, N., J.P. Welburn, M.E. Noble, A. Nguyen, M.B. Yaffe, D. Clynes, J.G. Moggs, G. Orphanides, S. Thomson, J.W. Edmunds, A.L. Clayton, J.A. Endicott, and L.C. Mahadevan. 2005. Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell*. 20:199-211.
- Maile, T., S. Kwoczynski, R.J. Katzenberger, D.A. Wassarman, and F. Sauer. 2004. TAF1 activates transcription by phosphorylation of serine 33 in histone H2B. *Science*. 304:1010-4.
- Maillet, I., J.M. Buhler, A. Sentenac, and J. Labarre. 1999. Rpb4p is necessary for RNA polymerase II activity at high temperature. *J Biol Chem.* 274:22586-90.
- Maldonado, E., and J.E. Allende. 1999. Phosphorylation of yeast TBP by protein kinase CK2 reduces its specific binding to DNA. *FEBS Lett.* 443:256-60.
- Malik, S., and R.G. Roeder. 2005. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci.* 30:256-63.
- Malmanche, N., A. Maia, and C.E. Sunkel. 2006. The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett*. 580:2888-95.
- Marfella, C.G., Y. Ohkawa, A.H. Coles, D.S. Garlick, S.N. Jones, and A.N. Imbalzano. 2007. Marfella CG, Ohkawa Y, Coles AH, Garlick DS, Jones SN, Imbalzano AN. 2006. Mutation of the SNF2 family member Chd2 affects mouse development and survival. J Cell Physiol 209:162-171. J Cell Physiol. 212:562.
- Margueron, R., P. Trojer, and D. Reinberg. 2005. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*. 15:163-76.

- Marmorstein, R. 2001. Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci.* 58:693-703.
- Martens, J.A., and F. Winston. 2003. Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 13:136-42.
- Martianov, I., S. Brancorsini, A. Gansmuller, M. Parvinen, I. Davidson, and P. Sassone-Corsi. 2002. Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development*. 129:945-55.
- Martin, C., and Y. Zhang. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:838-49.
- Martin, J., R. Halenbeck, and J. Kaufmann. 1999. Human transcription factor hTAF(II)150 (CIF150) is involved in transcriptional regulation of cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 19:5548-56.
- Martinez, E. 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol.* 50:925-47.
- Martinez, E., T.K. Kundu, J. Fu, and R.G. Roeder. 1998. A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J.Biol Chem.* 273:23781-23785.
- Mateescu, B., P. England, F. Halgand, M. Yaniv, and C. Muchardt. 2004. Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep.* 5:490-6.
- McKittrick, E., P.R. Gafken, K. Ahmad, and S. Henikoff. 2004. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:1525-30.
- McManus, K.J., V.L. Biron, R. Heit, D.A. Underhill, and M.J. Hendzel. 2006. Dynamic changes in histone H3 lysine 9 methylations: identification of a mitosis-specific function for dynamic methylation in chromosome congression and segregation. *J Biol Chem.* 281:8888-97.
- McManus, K.J., and M.J. Hendzel. 2006. The relationship between histone H3 phosphorylation and acetylation throughout the mammalian cell cycle. *Biochem Cell Biol.* 84:640-57.
- Meinhart, A., T. Kamenski, S. Hoeppner, S. Baumli, and P. Cramer. 2005. A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.* 19:1401-15.
- Mello, C.C., and D. Conte, Jr. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 431:338-42.
- Mellor, J. 2006a. Imitation switch complexes. Ernst Schering Res Found Workshop:61-87.
- Mellor, J. 2006b. It takes a PHD to read the histone code. Cell. 126:22-4.
- Metzger, D., E. Scheer, A. Soldatov, and L. Tora. 1999. Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes. *Embo J*. 18:4823-34.
- Metzger, E., M. Wissmann, N. Yin, J.M. Muller, R. Schneider, A.H. Peters, T. Gunther, R. Buettner, and R. Schule. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*. 437:436-9.
- Millward, T.A., S. Zolnierowicz, and B.A. Hemmings. 1999. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci.* 24:186-91.
- Milne, T.A., S.D. Briggs, H.W. Brock, M.E. Martin, D. Gibbs, C.D. Allis, and J.L. Hess. 2002. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell*. 10:1107-17.

- Minc, E., Y. Allory, H.J. Worman, J.C. Courvalin, and B. Buendia. 1999. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma*. 108:220-34.
- Mizuguchi, G., X. Shen, J. Landry, W.H. Wu, S. Sen, and C. Wu. 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*. 303:343-8.
- Mizzen, C.A., X.J. Yang, T. Kokubo, J.E. Brownell, A.J. Bannister, T. Owen-Hughes, J. Workman, L. Wang, S.L. Berger, T. Kouzarides, Y. Nakatani, and C.D. Allis. 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*. 87:1261-1270.
- Mohan, I.W., E. Scheer, O. Wendling, D. Metzger, and L. Tora. 2003. TAF10 (TAF(II)30) Is Necessary for TFIID Stability and Early Embryogenesis in Mice. *Mol Cell Biol*. 23:4307-18.
- Mollinari, C., C. Reynaud, S. Martineau-Thuillier, S. Monier, S. Kieffer, J. Garin, P.R. Andreassen, A. Boulet, B. Goud, J.P. Kleman, and R.L. Margolis. 2003. The mammalian passenger protein TD-60 is an RCC1 family member with an essential role in prometaphase to metaphase progression. *Dev Cell*. 5:295-307.
- Morgan, H.D., F. Santos, K. Green, W. Dean, and W. Reik. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*. 14 Spec No 1:R47-58.
- Morrison, A.J., J. Highland, N.J. Krogan, A. Arbel-Eden, J.F. Greenblatt, J.E. Haber, and X. Shen. 2004. INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell*. 119:767-75.
- Muhlbacher, F., H. Schiessel, and C. Holm. 2006. Tail-induced attraction between nucleosome core particles. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 74:031919.
- Muller, F., M.A. Demeny, and L. Tora. 2007. New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors. *J Biol Chem.* 282:14685-9.
- Muller, F., and L. Tora. 2004. The multicoloured world of promoter recognition complexes. *Embo J.* 23:2-8.
- Muller, J., C.M. Hart, N.J. Francis, M.L. Vargas, A. Sengupta, B. Wild, E.L. Miller, M.B. O'Connor, R.E. Kingston, and J.A. Simon. 2002. Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell*. 111:197-208.
- Muller, W.G., D. Rieder, G. Kreth, C. Cremer, Z. Trajanoski, and J.G. McNally. 2004. Generic features of tertiary chromatin structure as detected in natural chromosomes. *Mol Cell Biol*. 24:9359-70.
- Muratoglu, S., S. Georgieva, G. Papai, E. Scheer, I. Enunlu, O. Komonyi, I. Cserpan, L. Lebedeva, E. Nabirochkina, A. Udvardy, L. Tora, and I. Boros. 2003. Two different Drosophila ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Mol Cell Biol*. 23:306-21.
- Murnion, M.E., R.R. Adams, D.M. Callister, C.D. Allis, W.C. Earnshaw, and J.R. Swedlow. 2001. Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem.* 276:26656-65.
- Myers, L.C., and R.D. Kornberg. 2000. Mediator of transcriptional regulation. Annu Rev Biochem. 69:729-49.
- Nagy, Z., and L. Tora. 2007. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as coactivators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*. 26:5341-57.
- Nathan, D., K. Ingvarsdottir, D.E. Sterner, G.R. Bylebyl, M. Dokmanovic, J.A. Dorsey, K.A. Whelan, M. Krsmanovic, W.S. Lane, P.B. Meluh, E.S. Johnson, and S.L. Berger. 2006. Histone sumoylation is a negative regulator in Saccharomyces cerevisiae and

shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev.* 20:966-76.

- Nelson, C.J., H. Santos-Rosa, and T. Kouzarides. 2006. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell*. 126:905-16.
- Ng, H.H., F. Robert, R.A. Young, and K. Struhl. 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell*. 11:709-19.
- Nicolas, E., C. Roumillac, and D. Trouche. 2003. Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol*. 23:1614-22.
- Nielsen, A.L., J.A. Ortiz, J. You, M. Oulad-Abdelghani, R. Khechumian, A. Gansmuller, P. Chambon, and R. Losson. 1999. Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *Embo J.* 18:6385-95.
- Nielsen, A.L., M. Oulad-Abdelghani, J.A. Ortiz, E. Remboutsika, P. Chambon, and R. Losson. 2001. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell*. 7:729-39.
- Nikolov, D.B., H. Chen, E.D. Halay, A.A. Usheva, K. Hisatake, D.K. Lee, R.G. Roeder, and S.K. Burley. 1995. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature*. 377:119-128.
- Nishioka, K., J.C. Rice, K. Sarma, H. Erdjument-Bromage, J. Werner, Y. Wang, S. Chuikov, P. Valenzuela, P. Tempst, R. Steward, J.T. Lis, C.D. Allis, and D. Reinberg. 2002.
  PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell*. 9:1201-13.
- Nowak, S.J., and V.G. Corces. 2004. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*. 20:214-20.
- Nowak, S.J., C.Y. Pai, and V.G. Corces. 2003. Protein phosphatase 2A activity affects histone H3 phosphorylation and transcription in Drosophila melanogaster. *Mol Cell Biol*. 23:6129-38.
- Nurse, P. 2000. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. Cell. 100:71-8.
- O'Brien, T., and R. Tjian. 1998. Functional analysis of the human TAFII250 N-terminal kinase domain. *Mol Cell*. 1:905-911.
- O'Connell, M.J., N.C. Walworth, and A.M. Carr. 2000. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol*. 10:296-303.
- O'Shea-Greenfield, A., and S.T. Smale. 1992. Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *J.Biol.Chem.* 267:1391-1402.
- Oei, S.L., J. Griesenbeck, M. Schweiger, and M. Ziegler. 1998. Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosyl)ation of transcription factors. *J Biol Chem.* 273:31644-7.
- Ogryzko, V.V. 2001. Mammalian histone acetyltransferases and their complexes. *Cell Mol Life Sci*. 58:683-92.
- Ogryzko, V.V., T. Kotani, X. Zhang, R.L. Schlitz, T. Howard, X.J. Yang, B.H. Howard, J. Qin, and Y. Nakatani. 1998. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex *Cell*. 94:35-44.
- Ohkuma, Y., and R.G. Roeder. 1994. Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature*. 368:160-3.
- Ohler, U., G.C. Liao, H. Niemann, and G.M. Rubin. 2002. Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome. *Genome Biol.* 3:RESEARCH0087-7.
- Ohsumi, K., C. Katagiri, and T. Kishimoto. 1993. Chromosome condensation in Xenopus mitotic extracts without histone H1. *Science*. 262:2033-5.
- Ono, T., Y. Fang, D.L. Spector, and T. Hirano. 2004. Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol Biol Cell*. 15:3296-308.
- Orphanides, G., T. Lagrange, and D. Reinberg. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10:2657-2683.
- Ossipow, V., J.P. Tassan, E.A. Nigg, and U. Schibler. 1995. A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell*. 83:137-46.
- Ouararhni, K., R. Hadj-Slimane, S. Ait-Si-Ali, P. Robin, F. Mietton, A. Harel-Bellan, S. Dimitrov, and A. Hamiche. 2006. The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes Dev.* 20:3324-36.
- Pal, S., and S. Sif. 2007. Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J Cell Physiol*. 213:306-315.
- Palancade, B., and O. Bensaude. 2003. Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem*. 270:3859-70.
- Paoloni-Giacobino, A. 2007. Epigenetics in reproductive medicine. Pediatr Res. 61:51R-57R.
- Paro, R., and D.S. Hogness. 1991. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:263-7.
- Parvin, J.D., B.M. Shykind, R.E. Meyers, J. Kim, and P.A. Sharp. 1994. Multiple sets of basal factors initiate transcription by RNA polymerase II. *J Biol Chem*. 269:18414-21.
- Paulson, J.R., and U.K. Laemmli. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*. 12:817-28.
- Paulson, J.R., and S.S. Taylor. 1982. Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. *J Biol Chem.* 257:6064-72.
- Pehrson, J.R., and V.A. Fried. 1992. MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science*. 257:1398-400.
- Perche, P.Y., M. Robert-Nicoud, S. Khochbin, and C. Vourc'h. 2003. [Nucleosome differentiation: role of histone H2A variants]. *Med Sci (Paris)*. 19:1137-45.
- Perkins, N.D. 2006. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*. 25:6717-30.
- Peters, A.H., S. Kubicek, K. Mechtler, R.J. O'Sullivan, A.A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J.H. Martens, and T. Jenuwein. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell*. 12:1577-89.
- Peters, A.H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia, and T. Jenuwein. 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*. 107:323-37.
- Pham, A.D., and F. Sauer. 2000. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila. *Science*. 289:2357-60.
- Pietrogrande, M.C., N. Marchetti, F. Dondi, and P.G. Righetti. 2006. Decoding 2D-PAGE complex maps: relevance to proteomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 833:51-62.
- Pines, J. 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J*. 308 (Pt 3):697-711.

- Pointud, J.C., G. Mengus, S. Brancorsini, L. Monaco, M. Parvinen, P. Sassone-Corsi, and I. Davidson. 2003. The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J Cell Sci.* 116:1847-58.
- Pokholok, D.K., C.T. Harbison, S. Levine, M. Cole, N.M. Hannett, T.I. Lee, G.W. Bell, K. Walker, P.A. Rolfe, E. Herbolsheimer, J. Zeitlinger, F. Lewitter, D.K. Gifford, and R.A. Young. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. 122:517-27.
- Polioudaki, H., Y. Markaki, N. Kourmouli, G. Dialynas, P.A. Theodoropoulos, P.B. Singh, and S.D. Georgatos. 2004. Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett.* 560:39-44.
- Pollard, T.D., and W.C. Earnshaw. 2004. Biologie Cellulaire.
- Poux, A.N., and R. Marmorstein. 2003. Molecular basis for Gcn5/PCAF histone acetyltransferase selectivity for histone and nonhistone substrates. *Biochemistry*. 42:14366-74.
- Preuss, U., G. Landsberg, and K.H. Scheidtmann. 2003. Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res.* 31:878-85.
- Prigent, C., and S. Dimitrov. 2003. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? J Cell Sci. 116:3677-85.
- Pugh, B.F. 2000. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene*. 255:1-14.
- Pugh, B.F., and R. Tjian. 1990. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell*. 61:1187-1197.
- Pusarla, R.H., and P. Bhargava. 2005. Histones in functional diversification. Core histone variants. *Febs J.* 272:5149-68.
- Qin, S., and M.R. Parthun. 2006. Recruitment of the type B histone acetyltransferase Hat1p to chromatin is linked to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 26:3649-58.
- Raijmakers, R., A.J. Zendman, W.V. Egberts, E.R. Vossenaar, J. Raats, C. Soede-Huijbregts, F.P. Rutjes, P.A. van Veelen, J.W. Drijfhout, and G.J. Pruijn. 2007. Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro. *J Mol Biol*. 367:1118-29.
- Ramaswamy, A., I. Bahar, and I. Ioshikhes. 2005. Structural dynamics of nucleosome core particle: comparison with nucleosomes containing histone variants. *Proteins*. 58:683-96.
- Ramji, D.P., and P. Foka. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 365:561-75.
- Rangasamy, D., I. Greaves, and D.J. Tremethick. 2004. RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol*. 11:650-5.
- Rani, P.G., J.A. Ranish, and S. Hahn. 2004. RNA polymerase II (Pol II)-TFIIF and Pol IImediator complexes: the major stable Pol II complexes and their activity in transcription initiation and reinitiation. *Mol Cell Biol*. 24:1709-20.
- Ranish, J.A., N. Yudkovsky, and S. Hahn. 1999. Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev.* 13:49-63.
- Rawling, J.M., and R. Alvarez-Gonzalez. 1997. TFIIF, a basal eukaryotic transcription factor, is a substrate for poly(ADP-ribosyl)ation. *Biochem J.* 324 (Pt 1):249-53.
- Razin, A., and B. Kantor. 2005. DNA methylation in epigenetic control of gene expression. *Prog Mol Subcell Biol.* 38:151-67.

- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis, and T. Jenuwein. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 406:593-9.
- Reines, D., R.C. Conaway, and J.W. Conaway. 1999. Mechanism and regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr Opin Cell Biol*. 11:342-6.
- Rice, J.C., S.D. Briggs, B. Ueberheide, C.M. Barber, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, Y. Shinkai, and C.D. Allis. 2003. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell*. 12:1591-8.
- Rice, J.C., K. Nishioka, K. Sarma, R. Steward, D. Reinberg, and C.D. Allis. 2002. Mitoticspecific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev.* 16:2225-30.
- Riedl, T., F. Hanaoka, and J.M. Egly. 2003. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J.* 22:5293-303.
- Ringrose, L., and R. Paro. 2004. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet*. 38:413-43.
- Robinson, P.J., L. Fairall, V.A. Huynh, and D. Rhodes. 2006. EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:6506-11.
- Rossignol, M., A. Keriel, A. Staub, and J.M. Egly. 1999. Kinase activity and phosphorylation of the largest subunit of TFIIF transcription factor. *J Biol Chem.* 274:22387-92.
- Roy, A.L., M. Meisterernst, P. Pognonec, and R.G. Roeder. 1991. Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature*. 354:245-248.
- Ruchaud, S., M. Carmena, and W.C. Earnshaw. 2007. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Rudd, M.D., M.G. Izban, and D.S. Luse. 1994. The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:8057-61.
- Rundquist, I., and H.H. Lindner. 2006. Analyses of linker histone--chromatin interactions in situ. *Biochem Cell Biol*. 84:427-36.
- Russell, P. 1998. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem Sci.* 23:399-402.
- Sandelin, A., P. Carninci, B. Lenhard, J. Ponjavic, Y. Hayashizaki, and D.A. Hume. 2007. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet*. 8:424-36.
- Santos-Rosa, H., R. Schneider, A.J. Bannister, J. Sherriff, B.E. Bernstein, N.C. Emre, S.L. Schreiber, J. Mellor, and T. Kouzarides. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 419:407-11.
- Sarcinella, E., P.C. Zuzarte, P.N. Lau, R. Draker, and P. Cheung. 2007. Monoubiquitylation of H2A.Z distinguishes its association with euchromatin or facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol*. 27:6457-68.
- Sarg, B., W. Helliger, H. Talasz, B. Forg, and H.H. Lindner. 2006. Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1. *J Biol Chem.* 281:6573-80.
- Sassone-Corsi, P., C.A. Mizzen, P. Cheung, C. Crosio, L. Monaco, S. Jacquot, A. Hanauer, and C.D. Allis. 1999. Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science*. 285:886-91.
- Sauve, D.M., H.J. Anderson, J.M. Ray, W.M. James, and M. Roberge. 1999. Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH2-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol*. 145:225-35.

- Sawa, C., E. Nedea, N. Krogan, T. Wada, H. Handa, J. Greenblatt, and S. Buratowski. 2004. Bromodomain factor 1 (Bdf1) is phosphorylated by protein kinase CK2. *Mol Cell Biol*. 24:4734-42.
- Schalch, T., S. Duda, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*. 436:138-41.
- Schneider, J., P. Bajwa, F.C. Johnson, S.R. Bhaumik, and A. Shilatifard. 2006. Rtt109 is required for proper H3K56 acetylation: a chromatin mark associated with the elongating RNA polymerase II. *J Biol Chem.* 281:37270-4.
- Schotta, G., M. Lachner, K. Sarma, A. Ebert, R. Sengupta, G. Reuter, D. Reinberg, and T. Jenuwein. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18:1251-62.
- Schurter, B.T., S.S. Koh, D. Chen, G.J. Bunick, J.M. Harp, B.L. Hanson, A. Henschen-Edman, D.R. Mackay, M.R. Stallcup, and D.W. Aswad. 2001. Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry*. 40:5747-56.
- Seet, B.T., I. Dikic, M.M. Zhou, and T. Pawson. 2006. Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:473-83.
- Segil, N., M. Guermah, A. Hoffmann, R.G. Roeder, and N. Heintz. 1996. Mitotic regulation of TFIID: inhibition of activator-dependent transcription and changes in subcellular localization. *Genes Dev.* 10:2389-400.
- Sekiguchi, T., Y. Nohiro, Y. Nakamura, N. Hisamoto, and T. Nishimoto. 1991. The human CCG1 gene, essential for progression of the G1 phase, encodes a 210-kilodalton nuclear DNA-binding protein. *Mol.Cell Biol.* 11:3317-3325.
- Seo, J., and K.J. Lee. 2004. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol*. 37:35-44.
- Sessa, F., M. Mapelli, C. Ciferri, C. Tarricone, L.B. Areces, T.R. Schneider, P.T. Stukenberg, and A. Musacchio. 2005. Mechanism of Aurora B activation by INCENP and inhibition by hesperadin. *Mol Cell*. 18:379-91.
- Shao, H., M. Revach, S. Moshonov, Y. Tzuman, K. Gazit, S. Albeck, T. Unger, and R. Dikstein. 2005. Core promoter binding by histone-like TAF complexes. *Mol Cell Biol*. 25:206-19.
- Shen, X., L. Yu, J.W. Weir, and M.A. Gorovsky. 1995. Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell*. 82:47-56.
- Shi, X., T. Hong, K.L. Walter, M. Ewalt, E. Michishita, T. Hung, D. Carney, P. Pena, F. Lan, M.R. Kaadige, N. Lacoste, C. Cayrou, F. Davrazou, A. Saha, B.R. Cairns, D.E. Ayer, T.G. Kutateladze, Y. Shi, J. Cote, K.F. Chua, and O. Gozani. 2006. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*. 442:96-9.
- Shi, Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J.R. Whetstine, P.A. Cole, R.A. Casero, and Y. Shi. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 119:941-53.
- Shi, Y., and J.R. Whetstine. 2007. Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*. 25:1-14.
- Shi, Y.J., C. Matson, F. Lan, S. Iwase, T. Baba, and Y. Shi. 2005. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell*. 19:857-64.
- Shiio, Y., and R.N. Eisenman. 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13225-30.
- Shilatifard, A. 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem*. 75:243-69.
- Shilatifard, A., R.C. Conaway, and J.W. Conaway. 2003. The RNA polymerase II elongation complex. *Annu Rev Biochem*. 72:693-715.

- Shintomi, K., and T. Hirano. 2007. How are cohesin rings opened and closed? *Trends Biochem Sci.* 32:154-7.
- Shogren-Knaak, M., H. Ishii, J.M. Sun, M.J. Pazin, J.R. Davie, and C.L. Peterson. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*. 311:844-7.
- Shukla, A., N. Stanojevic, Z. Duan, T. Shadle, and S.R. Bhaumik. 2006. Functional analysis of H2B-Lys-123 ubiquitination in regulation of H3-Lys-4 methylation and recruitment of RNA polymerase II at the coding sequences of several active genes in vivo. J Biol Chem. 281:19045-54.
- Sif, S. 2004. ATP-dependent nucleosome remodeling complexes: enzymes tailored to deal with chromatin. *J Cell Biochem*. 91:1087-98.
- Smale, S.T., and J.T. Kadonaga. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*. 72:449-79.
- Smirnov, I.V., S.I. Dimitrov, and V.L. Makarov. 1988. Polyamine-DNA interactions. Condensation of chromatin and naked DNA. *J Biomol Struct Dyn*. 5:1149-61.
- Solow, S., M. Salunek, R. Ryan, and P.M. Lieberman. 2001. Taf(II) 250 phosphorylates human transcription factor IIA on serine residues important for TBP binding and transcription activity. *J Biol Chem.* 276:15886-92.
- Solow, S.P., L. Lezina, and P.M. Lieberman. 1999. Phosphorylation of TFIIA stimulates TATA binding protein-TATA interaction and contributes to maximal transcription and viability in yeast. *Mol Cell Biol*. 19:2846-52.
- Song, L., D. Li, R. Liu, H. Zhou, J. Chen, and X. Huang. 2007. Ser-10 phosphorylated histone H3 is involved in cytokinesis as a chromosomal passenger. *Cell Biol Int*. 31:1184-90.
- Sterner, D.E., D. Nathan, A. Reindle, E.S. Johnson, and S.L. Berger. 2006. Sumoylation of the yeast Gcn5 protein. *Biochemistry*. 45:1035-42.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-5.
- Stucki, M., J.A. Clapperton, D. Mohammad, M.B. Yaffe, S.J. Smerdon, and S.P. Jackson. 2005. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. 123:1213-26.
- Suetake, I., F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima, and S. Tajima. 2004. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem.* 279:27816-23.
- Sugiyama, K., K. Sugiura, T. Hara, K. Sugimoto, H. Shima, K. Honda, K. Furukawa, S. Yamashita, and T. Urano. 2002. Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene*. 21:3103-11.
- Sullivan, K.F. 2001. A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 11:182-8.
- Sumara, I., E. Vorlaufer, C. Gieffers, B.H. Peters, and J.M. Peters. 2000. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. J Cell Biol. 151:749-62.
- Svejstrup, J.Q. 2004. The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. *Biochim Biophys Acta*. 1677:64-73.
- Svejstrup, J.Q. 2007. Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation. *Trends Biochem Sci.* 32:165-71.
- Swain, J.E., J. Ding, D.L. Brautigan, E. Villa-Moruzzi, and G.D. Smith. 2007. Proper chromatin condensation and maintenance of histone H3 phosphorylation during mouse oocyte meiosis requires protein phosphatase activity. *Biol Reprod.* 76:628-38.

- Swank, R.A., J.P. Th'ng, X.W. Guo, J. Valdez, E.M. Bradbury, and L.R. Gurley. 1997. Four distinct cyclin-dependent kinases phosphorylate histone H1 at all of its growth-related phosphorylation sites. *Biochemistry*. 36:13761-8.
- Swedlow, J.R., and T. Hirano. 2003. The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol Cell*. 11:557-69.
- Szutorisz, H., N. Dillon, and L. Tora. 2005. The role of enhancers as centres for general transcription factor recruitment. *Trends Biochem Sci.*
- Tachibana, M., K. Sugimoto, T. Fukushima, and Y. Shinkai. 2001. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem*. 276:25309-17.
- Takada, S., J.T. Lis, S. Zhou, and R. Tjian. 2000. A TRF1:BRF complex directs Drosophila RNA polymerase III transcription. *Cell*. 101:459-69.
- Takagi, Y., and R.D. Kornberg. 2006. Mediator as a general transcription factor. *J Biol Chem.* 281:80-9.
- Talasz, H., W. Helliger, B. Puschendorf, and H. Lindner. 1996. In vivo phosphorylation of histone H1 variants during the cell cycle. *Biochemistry*. 35:1761-7.
- Tamkun, J.W., R. Deuring, M.P. Scott, M. Kissinger, A.M. Pattatucci, T.C. Kaufman, and J.A. Kennison. 1992. brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*. 68:561-72.
- Tan, E., P.G. Besant, X.L. Zu, C.W. Turck, M.A. Bogoyevitch, S.G. Lim, P.V. Attwood, and G.C. Yeoh. 2004. Histone H4 histidine kinase displays the expression pattern of a liver oncodevelopmental marker. *Carcinogenesis*. 25:2083-8.
- Taverna, S.D., B.M. Ueberheide, Y. Liu, A.J. Tackett, R.L. Diaz, J. Shabanowitz, B.T. Chait, D.F. Hunt, and C.D. Allis. 2007. Long-distance combinatorial linkage between methylation and acetylation on histone H3 N termini. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:2086-91.
- Thambirajah, A.A., D. Dryhurst, T. Ishibashi, A. Li, A.H. Maffey, and J. Ausio. 2006. H2A.Z stabilizes chromatin in a way that is dependent on core histone acetylation. *J Biol Chem.* 281:20036-44.
- Thiagalingam, S., K.H. Cheng, H.J. Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam, and J.F. Ponte. 2003. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci.* 983:84-100.
- Thompson, P.R., and W. Fast. 2006. Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS Chem Biol.* 1:433-41.
- Thomson, S., A.L. Clayton, C.A. Hazzalin, S. Rose, M.J. Barratt, and L.C. Mahadevan. 1999. The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *Embo J.* 18:4779-93.
- Timmermann, S., H. Lehrmann, A. Polesskaya, and A. Harel-Bellan. 2001. Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci.* 58:728-36.
- Timmers, H.T., and L. Tora. 2005. SAGA unveiled. Trends Biochem Sci. 30:7-10.
- Tokusumi, Y., Y. Ma, X. Song, R.H. Jacobson, and S. Takada. 2007. The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters. *Mol Cell Biol.* 27:1844-58.
- Tora, L. 2002. A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 16:673-5.

- Torres-Padilla, M.E., D.E. Parfitt, T. Kouzarides, and M. Zernicka-Goetz. 2007. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature*. 445:214-8.
- Tremethick, D.J. 2007. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*. 128:651-4.
- Trewick, S.C., P.J. McLaughlin, and R.C. Allshire. 2005. Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep.* 6:315-20.
- Trievel, R.C. 2004. Structure and function of histone methyltransferases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 14:147-69.
- Trojer, P., G. Li, R.J. Sims, 3rd, A. Vaquero, N. Kalakonda, P. Boccuni, D. Lee, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S.D. Nimer, Y.H. Wang, and D. Reinberg. 2007. L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell*. 129:915-28.
- Tsukada, Y., J. Fang, H. Erdjument-Bromage, M.E. Warren, C.H. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*. 439:811-6.
- Turner, B.M. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*. 22:836-45.
- Turner, B.M. 2005. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol.* 12:110-2.
- Uhlmann, F., F. Lottspeich, and K. Nasmyth. 1999. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature*. 400:37-42.
- Uptain, S.M., C.M. Kane, and M.J. Chamberlin. 1997. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem*. 66:117-72.
- Usheva, A., and T. Shenk. 1994. TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell*. 76:1115-1121.
- Utley, R.T., and J. Cote. 2003. The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 274:203-36.
- Vader, G., R.H. Medema, and S.M. Lens. 2006. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol*. 173:833-7.
- Vakoc, C.R., S.A. Mandat, B.A. Olenchock, and G.A. Blobel. 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*. 19:381-91.
- Van Hooser, A., D.W. Goodrich, C.D. Allis, B.R. Brinkley, and M.A. Mancini. 1998. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci.* 111 (Pt 23):3497-506.
- van Leeuwen, F., P.R. Gafken, and D.E. Gottschling. 2002. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell*. 109:745-56.
- Vaquero, A., M.B. Scher, D.H. Lee, A. Sutton, H.L. Cheng, F.W. Alt, L. Serrano, R. Sternglanz, and D. Reinberg. 2006. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* 20:1256-61.
- Vaughn, M.W., and R.A. Martienssen. 2005. Finding the right template: RNA Pol IV, a plantspecific RNA polymerase. *Mol Cell*. 17:754-6.
- Verdecia, M.A., H. Huang, E. Dutil, D.A. Kaiser, T. Hunter, and J.P. Noel. 2000. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol.* 7:602-8.
- Verdone, L., M. Caserta, and E. Di Mauro. 2005. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol.* 83:344-53.
- Verrijzer, C.P., and R. Tjian. 1996. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends.Biochem.Sci.* 21:338-342.

- Volkel, P., and P.O. Angrand. 2007. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*. 89:1-20.
- Waddington, C.H. 1952. Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature*. 169:278.
- Waizenegger, I.C., S. Hauf, A. Meinke, and J.M. Peters. 2000. Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell*. 103:399-410.
- Wang, H., R. Cao, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, C. Borchers, P. Tempst, and Y. Zhang. 2001a. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell*. 8:1207-17.
- Wang, H., Z.Q. Huang, L. Xia, Q. Feng, H. Erdjument-Bromage, B.D. Strahl, S.D. Briggs, C.D. Allis, J. Wong, P. Tempst, and Y. Zhang. 2001b. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*. 293:853-7.
- Wang, H., L. Zhai, J. Xu, H.Y. Joo, S. Jackson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, Y. Xiong, and Y. Zhang. 2006. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell*. 22:383-94.
- Wang, Y., J. Wysocka, J. Sayegh, Y.H. Lee, J.R. Perlin, L. Leonelli, L.S. Sonbuchner, C.H. McDonald, R.G. Cook, Y. Dou, R.G. Roeder, S. Clarke, M.R. Stallcup, C.D. Allis, and S.A. Coonrod. 2004. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination. *Science*. 306:279-83.
- Wassarman, D.A., and F. Sauer. 2001. TAF(II)250: a transcription toolbox. J Cell Sci. 114:2895-902.
- Watanabe, T., K. Hayashi, A. Tanaka, T. Furumoto, F. Hanaoka, and Y. Ohkuma. 2003. The carboxy terminus of the small subunit of TFIIE regulates the transition from transcription initiation to elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. 23:2914-26.
- Weber, M., and D. Schubeler. 2007. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol*. 19:273-80.
- Wei, Y., C.A. Mizzen, R.G. Cook, M.A. Gorovsky, and C.D. Allis. 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:7480-4.
- Wei, Y., L. Yu, J. Bowen, M.A. Gorovsky, and C.D. Allis. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*. 97:99-109.
- Weis, L., and D. Reinberg. 1992. Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB.J.* 6:3300-3309.
- Wendt, K.D., and A. Shilatifard. 2006. Packing for the germy: the role of histone H4 Ser1 phosphorylation in chromatin compaction and germ cell development. *Genes Dev*. 20:2487-91.
- Wheatley, S.P., A.J. Henzing, H. Dodson, W. Khaled, and W.C. Earnshaw. 2004. Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. J Biol Chem. 279:5655-60.
- Whetstine, J.R., A. Nottke, F. Lan, M. Huarte, S. Smolikov, Z. Chen, E. Spooner, E. Li, G. Zhang, M. Colaiacovo, and Y. Shi. 2006. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*. 125:467-81.
- Wieczorek, E., M. Brand, X. Jacq, and L. Tora. 1998. Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature*. 393:187-191.
- Witt, O., W. Albig, and D. Doenecke. 1996. Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Exp Cell Res*. 229:301-6.

- Woodcock, C.L., A.I. Skoultchi, and Y. Fan. 2006. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res.* 14:17-25.
- Wu, R.S., S. Tsai, and W.M. Bonner. 1982. Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell*. 31:367-74.
- Wu, S., R.C. Trievel, and J.C. Rice. 2007. Human SFMBT is a transcriptional repressor protein that selectively binds the N-terminal tail of histone H3. *FEBS Lett.* 581:3289-96.
- Wu, Y., Y. Lu, Y. Hu, and R. Li. 2005. Cyclic AMP-dependent modification of gonadselective TAF(II)105 in a human ovarian granulosa cell line. J Cell Biochem. 96:751-9.
- Wysocka, J. 2006. Identifying novel proteins recognizing histone modifications using peptide pull-down assay. *Methods*. 40:339-43.
- Wysocka, J., T. Swigut, T.A. Milne, Y. Dou, X. Zhang, A.L. Burlingame, R.G. Roeder, A.H. Brivanlou, and C.D. Allis. 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell*. 121:859-72.
- Wysocka, J., T. Swigut, H. Xiao, T.A. Milne, S.Y. Kwon, J. Landry, M. Kauer, A.J. Tackett, B.T. Chait, P. Badenhorst, C. Wu, and C.D. Allis. 2006. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*. 442:86-90.
- Xiao, T., H. Hall, K.O. Kizer, Y. Shibata, M.C. Hall, C.H. Borchers, and B.D. Strahl. 2003. Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Genes Dev.* 17:654-63.
- Xu, F., K. Zhang, and M. Grunstein. 2005. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell*. 121:375-85.
- Yamaguchi, Y., N. Inukai, T. Narita, T. Wada, and H. Handa. 2002. Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol.* 22:2918-27.
- Yamamoto, Y., U.N. Verma, S. Prajapati, Y.T. Kwak, and R.B. Gaynor. 2003. Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*. 423:655-9.
- Yamane, K., C. Toumazou, Y. Tsukada, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. Wong, and Y. Zhang. 2006. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*. 125:483-95.
- Yan, Q., R.J. Moreland, J.W. Conaway, and R.C. Conaway. 1999. Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem*. 274:35668-75.
- Yang, X.J. 2004. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays*. 26:1076-87.
- Yang, X.J., and S. Gregoire. 2005. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol*. 25:2873-84.
- Yang, Z., C. Zheng, and J.J. Hayes. 2007. The core histone tail domains contribute to sequence-dependent nucleosome positioning. *J Biol Chem.* 282:7930-8.
- Yasui, Y., T. Urano, A. Kawajiri, K. Nagata, M. Tatsuka, H. Saya, K. Furukawa, T. Takahashi, I. Izawa, and M. Inagaki. 2004. Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J Biol Chem.* 279:12997-3003.
- Yokoyama, A., Z. Wang, J. Wysocka, M. Sanyal, D.J. Aufiero, I. Kitabayashi, W. Herr, and M.L. Cleary. 2004. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol*. 24:5639-49.

- Yonaha, M., T. Tsuchiya, and Y. Yasukochi. 1997. Cell-cycle-dependent phosphorylation of the basal transcription factor RAP74. *FEBS Lett.* 410:477-80.
- Young, R.A. 1991. RNA polymerase II. Annu Rev Biochem. 60:689-715.
- Yu, E.Y., O. Steinberg-Neifach, A.T. Dandjinou, F. Kang, A.J. Morrison, X. Shen, and N.F. Lue. 2007. Regulation of Telomere Structure and Functions by Subunits of the INO80 Chromatin Remodeling Complex. *Mol Cell Biol.* 27:5639-49.
- Yudkovsky, N., J.A. Ranish, and S. Hahn. 2000. A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature*. 408:225-9.
- Zalensky, A.O., J.S. Siino, A.A. Gineitis, I.A. Zalenskaya, N.V. Tomilin, P. Yau, and E.M. Bradbury. 2002. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem.* 277:43474-80.
- Zawel, L., K.P. Kumar, and D. Reinberg. 1995. Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 9:1479-90.
- Zawel, L., and D. Reinberg. 1993. Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multistep process. *Prog.Nucleic Acid.Res.Mol.Biol.* 44:67-108.
- Zeitlin, S.G., R.D. Shelby, and K.F. Sullivan. 2001. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol*. 155:1147-57.
- Zheng, C., and J.J. Hayes. 2003. Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers*. 68:539-46.
- Zhong, S., Y. Zhang, C. Jansen, H. Goto, M. Inagaki, and Z. Dong. 2001. MAP kinases mediate UVB-induced phosphorylation of histone H3 at serine 28. *J Biol Chem*. 276:12932-7.
- Zong, H., Z. Li, L. Liu, Y. Hong, X. Yun, J. Jiang, Y. Chi, H. Wang, X. Shen, Y. Hu, Z. Niu, and J. Gu. 2005. Cyclin-dependent kinase 11(p58) interacts with HBO1 and enhances its histone acetyltransferase activity. *FEBS Lett.* 579:3579-88.
- Zurita, M., and C. Merino. 2003. The transcriptional complexity of the TFIIH complex. *Trends Genet.* 19:578-84.

# ANNEXE

## Glutamine-Expanded Ataxin-7 Alters TFTC/STAGA Recruitment and Chromatin Structure Leading to Photoreceptor Dysfunction

Dominique Helmlinger<sup>1¤</sup>, Sara Hardy<sup>2©</sup>, Gretta Abou-Sleymane<sup>1,3©</sup>, Adrien Eberlin<sup>2</sup>, Aaron B. Bowman<sup>4</sup>, Anne Gansmüller<sup>5</sup>, Serge Picaud<sup>6</sup>, Huda Y. Zoghbi<sup>4</sup>, Yvon Trottier<sup>1,3</sup>, Làszlò Tora<sup>2\*</sup>, Didier Devys<sup>1,2\*</sup>

1 Department of Molecular Pathology, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, Illkirch, France, 2 Department of Transcription, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, Illkirch, France, 3 Chaire de Génétique Humaine, Collège de France, Paris, France, 4 Howard Hughes Medical Institute, Department of Molecular and Human Genetics, and Department of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, United States of America, 5 Imaging Technology Platform, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, Strasbourg, France, 6 Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine, INSERM U-592, UPMC, Paris, France

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) is one of several inherited neurodegenerative disorders caused by a polyglutamine (polyQ) expansion, but it is the only one in which the retina is affected. Increasing evidence suggests that transcriptional alterations contribute to polyQ pathogenesis, although the mechanism is unclear. We previously demonstrated that the *SCA7* gene product, ataxin-7 (ATXN7), is a subunit of the GCN5 histone acetyltransferase-containing coactivator complexes TFTC/STAGA. We show here that TFTC/STAGA complexes purified from SCA7 mice have normal TRRAP, GCN5, TAF12, and SPT3 levels and that their histone or nucleosomal acetylation activities are unaffected. However, rod photoreceptors from SCA7 mouse models showed severe chromatin decondensation. In agreement, polyQ-expanded ataxin-7 induced histone H3 hyperacetylation, resulting from an increased recruitment of TFTC/STAGA to specific promoters. Surprisingly, hyperacetylated genes were transcriptionally down-regulated, and expression analysis revealed that nearly all rod-specific genes were affected, leading to visual impairment in SCA7 mice. In conclusion, we describe here a set of events accounting for SCA7 pathogenesis in the retina, in which polyQ-expanded ATXN7 deregulated TFTC/STAGA recruitment to a subset of genes specifically expressed in rod photoreceptors, leading to chromatin alterations and consequent progressive loss of rod photoreceptor function.

Citation: Helmlinger D, Hardy S, Abou-Sleymane G, Eberlin A, Bowman AB, et al. (2006) Glutamine-expanded ataxin-7 alters TFTC/STAGA recruitment and chromatin structure leading to photoreceptor dysfunction. PLoS Biol 4(3): e67.

#### Introduction

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by expansion of an unstable CAG trinucleotide repeat encoding a polyglutamine (polyQ) stretch [1,2]. The expansion of a translated CAG repeat causes eight other progressive neurodegenerative diseases, including Huntington disease [3]. Expanded polyQ confers a toxic gain of function to otherwise unrelated proteins. Aggregation of expanded polyQ-containing proteins in the nucleus is a hallmark of these diseases. Despite these common properties, polyQ diseases also show distinctive features, which may reflect the unique protein context of the polyQ expansion in each disease. SCA7 can be distinguished from other polyQ diseases, as it is the only one affecting the retina leading to visual impairment and eventually to blindness [4].

We recently demonstrated that ataxin-7 (ATXN7), the protein mutated in SCA7, is a bona fide subunit of TFTC, the TATA-binding protein (TBP)-free TBP-associated factor (TAF)-containing complex, and STAGA, the SPT3/TAF9/GCN5 acetyltransferase complex [5]. These transcriptional co-activator complexes were shown to preferentially acetylate histone H3 in both free and nucleosomal contexts and to activate transcription on chromatin templates [6–8]. TFTC/STAGA complexes contain the GCN5 histone acetyltransferase (HAT), TRRAP, SPT, ADA proteins, and a subset of TAFs,

but clearly lack TBP [9]. In contrast, the general transcription factor TFIID contains TBP and 14 TAFs, some of which are shared with TFTC/STAGA. TFTC/STAGA complexes are the mammalian homologs of the yeast SAGA (Spt/Ada/Gcn5) complex [10,11]. Genome-wide expression studies indicate that transcriptional regulation of approximately 10% of the yeast genome is predominantly regulated by SAGA and 90% by TFIID. Most SAGA-dominated genes were found stress inducible and highly regulated although TFIID controlled the

Academic Editor: Jim Kadonaga, University of California San Diego, United States of America

Received June 24, 2005; Accepted January 04, 2006; Published February 28, 2006

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067

**Copyright:** © 2006 Helmlinger et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abbreviations: ChIP, chromatin immunoprecipitation; FISH, fluorescent in situ hybridization; HAT, histone acetyltransferase; IP, immunoprecipitation; mAb, monoclonal antibody; NI, nuclear inclusion; ONL, outer nuclear layer; polyQ, polyglutamine; SCA7, spinocerebellar ataxia type 7; SEM, standard error of the mean; TAF, TBP-associated factor; TBP, TATA-binding protein; WT, wild-type

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: devys@igbmc.u-strasbg.fr (DD), laszlo@igbmc.u-strasbg.fr (LT)

These authors contributed equally to this work.

¤ Current address: Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America

expression of housekeeping genes [12]. In comparison with yeast SAGA, the mechanisms by which mammalian TFTC-like complexes regulate RNA polymerase II (Pol II) transcription remain elusive.

Early and severe transcriptional alterations were detected in various polyQ models [13]. Expanded polyQ-containing proteins have been proposed to interfere with the normal function of several transcription factors, notably by sequestering them to nuclear inclusions (NIs), but the exact mechanisms leading to transcriptional deregulation remain largely unknown. The mouse retina is a suitable neuronal tissue to perform transcriptional studies as rods represent around 97% of photoreceptors and more than 70% of all retinal cells [14]. In wild-type (WT) mice, the nuclei of rod photoreceptors display a very peculiar organization different from that of any other retinal neurons, with a thin rim of euchromatin surrounding a large heterochromatin territory [15]. Chromatin plays a pivotal role in regulating transcription, suggesting that rod nuclear organization specifies its gene expression profile. In particular, genes encoding components of the phototransduction cascade are expressed specifically in rods, at remarkably high levels due to constant renewal of rod outer segments.

We previously generated transgenic mice specifically expressing normal (10Q) or mutant (90Q) ATXN7 in rod photoreceptors (hereafter called R7N and R7E lines, respectively) [16]. Mutant ATXN7 induced a progressive loss of segments and dramatic reduction of rod electrophysiological activity in R7E mice. Segment loss paralleled a progressive and severe down-regulation of Rho (rhodopsin), which was the earliest molecular anomaly detectable in these mice [17]. Similar observations were made in a SCA7 knock-in mouse model, which expresses mutant ATXN7 at endogenous levels [18], suggesting that loss of photoreceptor-specific gene expression is relevant to SCA7 retinopathy. Finally, recent studies performed in yeast or in transfected cells suggest that polyQ-expanded ATXN7 incorporation in TFTC/STAGA alters their composition and inhibits their nucleosomal HAT activity [19,20].

Here, we investigated the composition and activity of TFTC/STAGA complexes in vivo. We discovered that, in the retina of SCA7 mice, mutant TFTC/STAGA HAT complexes induced histone H3 hyperacetylation through their aberrant recruitment to promoters of rod photoreceptor-specific genes. Furthermore, rod nuclei showed chromatin decondensation which, surprisingly, correlated with severe transcriptional repression of the corresponding genes. Alteration of rod highly organized nuclear architecture disrupted the rod-specific expression profile through down-regulation of most genes whose expression is normally high and restricted to rods. Finally, loss of expression of most genes required for phototransduction provides a molecular explanation for the retinal degeneration observed in SCA7 mice.

#### Results

#### Severe Alteration of Rod Photoreceptor Nuclear Architecture in SCA7 Mice

R7E mice, which express mutant (90Q) ATXN7 under control of the rhodopsin promoter, have a normal lifespan due to restricted transgene expression in rod photoreceptors. This allowed us to show that mutant ATXN7-induced retinopathy is characterized by long-term and complete dysfunction of rods [17]. We have now investigated more thoroughly the ultrastructural changes accompanying prolonged rod dysfunction by electron microscopy of WT, R7N, and R7E retinas at different ages. Transgenic lines R7N.C and R7E.A were used throughout this study [16].

The most surprising abnormality was a striking modification of rod nuclear architecture (Figure 1). In WT mice, rods have small nuclei (4-5 µm diameter) with a characteristic polyhedral shape and contain a single, large clump of heterochromatin surrounded by a sparse rim of euchromatin (Figure 1C, panels a and d). R7N rod photoreceptors were indistinguishable from those of WT mice (Figure 1A, panel a), consistent with the absence of phenotype in this line [16,17]. In marked contrast, rods from R7E mice showed a dramatic chromatin decondensation, associated with a massive increase in nuclear volume (Figure 1A, panels b and c). Consequently, rod nuclei from R7E mice showed much more euchromatin and resembled cone nuclei or that of neurons from the inner nuclear layer. However, these abnormal photoreceptors were undoubtedly identified as rods because a fibrillar structure was observed in the decondensed chromatin territory (arrows in Figure 1A, panels b and c), which likely corresponded to aggregated mutant ATXN7. Immunofluorescence staining confirmed the presence of a single NI in weakly DAPI-stained territories in rods from aged R7E mice (Figure S1A). This aberrant chromatin alteration was a progressive phenomenon as it was already observable in 2-mo-old R7E mice, although less prominent and heterogeneous (Figure 1B, panel b). At 2 y of age, almost all nuclei were larger and rounder, and the spacing between nuclei was greater than in WT retina (Figure 1B, panel c). Finally, we noticed a normal retinal epithelium appearance despite dramatic loss of segments (Figure S2), indicating that rods from R7E mice are defective in segment renewal.

#### Comparable Chromatin Remodeling in Rods from SCA7 Knock-In Mice

We then tested whether this nuclear phenotype was relevant to SCA7 retinopathy or due to overexpression of mutant ATXN7 in R7E mice. We performed electron microscopy of retina from 3-mo-old SCA7 heterozygous knock-in mice (Sca<sup>7266Q/5Q</sup>) which present a retinopathy comparable to that occurring in R7E animals [18]. Rod nuclear architecture was altered in Sca7266Q/5Q mice when compared to WT littermates (Figure 1C). Rod nuclei from Sca<sup>7266Q/5Q</sup> mice contained more euchromatin and displayed a reduced and disorganized heterochromatin territory (compare panels b, c, e, and f with panels a and d in Figure 1C). We could observe a small, pale fibrillar structure in the decondensed chromatin territory (Figure S3), which likely resulted from aggregation of mutant ATXN7 into NIs. Although comparable, chromatin decondensation appeared less severe in heterozygous Sca<sup>7266Q/5Q</sup> animals than in age-matched R7E mice. Premature death of Sca<sup>7266Q/5Q</sup> mice precluded analysis of the extent of chromatin remodeling at later stages, when the nuclear phenotype was prominent in R7E mice. These data together show that significant chromatin alterations occurred in rod nuclei of both SCA7 transgenic and knock-in mouse models, further suggesting that this aberrant nuclear phenotype is relevant to polyQ-expanded ATXN7-induced retinopathy.



Figure 1. Severe Reorganization of Chromatin Territories in Rod Photoreceptors from SCA7 Mice

(A) Ultrastructure of rod nuclei in R7E mice. Electron microscopy micrographs from 2-y-old R7N (panel a) and two distinct R7E (panels b and c) animals are shown. In R7N mice, rod nuclei are characterized by a large territory of centrally located heterochromatin. In R7E mice, rod nuclei were bigger and rounder, and displayed much more euchromatin, which appears lightly stained by electrons. Arrows indicate pale grey structures likely resulting from aggregation of mutant ATXN7 in rods from R7E mice. Scale bar represents 1 µm.

(B) Ultrastructure of photoreceptor nuclei during disease progression in R7E mice. Electron microscopy micrographs from 2-y-old R7N (panel a), 2-moold R7E (panel b), and 2-y-old R7E (panel c) animals are shown. This time-course analysis revealed that alterations of rod nuclear architecture progressively worsened as retinopathy progressed in R7E mice. Cone photoreceptor nuclei (c), which are found in the outermost part of the ONL adjacent to inner segments (is), present a different architecture with several heterochromatin clumps surrounded by more euchromatin. As evidenced in panel c, rod nuclei in R7E mice look highly similar to cone nuclei. Scale bar represents 5 μm.

(C) Ultrastructure of photoreceptor nuclei in SCA7 knock-in mice. Electron microsocopy micrographs from 3-mo-old WT (panels a and d) and two distinct age-matched SCA<sup>7266Q/5Q</sup> (panels b, c, e, and f) animals are shown. Morphological appearance of the central densely stained heterochromatin territory is altered in mutant mice. At higher magnification (lower panels [e–f]), rod nuclei from heterozygous knock-in animals are slightly larger and contain more euchromatin than nuclei from control mice. Cone nuclei (c) and photoreceptor inner segments (is) are depicted. Scale bars represent 2  $\mu$ m in upper panels (a–c) and 0.5  $\mu$ m in lower panels (e–f). DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.g001

### Aberrant Rod Chromatin Remodeling Is Correlated with Rod Dysfunction

In early stages of the R7E retinal phenotype (at 2 mo), different degrees of chromatin decondensation were observed by electron microscopy (Figure 1B) and by histological examination of toluidin-blue stained sections (Figure 2A). Strikingly, normal condensed rod nuclei were always connected with preserved inner and outer segments, whereas areas with abnormal decondensed rod nuclei were associated with segment thinning (Figure 2A, bottom right panel). Interestingly, areas with remaining segments were occasionally found associated with slightly decondensed nuclei, wheres areas without any segments left were never associated with normal condensed nuclei. Furthermore, mild alterations of chromatin condensation could be detected on toluidin blue-stained sections of 4-wk-old animals (Figure S1B), before the onset of R7E retinopathy. These two observations suggested that the aberrant chromatin decondensation might be a primary event preceding the loss of segments and rod dysfunction.

Immunohistology using an anti-rhodopsin antibody revealed a striking, patchy down-regulation of *Rho* expression in 2-mo-old R7E mice (Figure 2B). Immunofluorescence showed that nuclei of rhodopsin-negative rods always displayed severe chromatin decondensation (Figure 2C and arrowheads in Figure 2D), whereas nuclei from immunopositive rods had a preserved chromatin architecture (Figure 2C and arrows in Figure 2D). Thus, rods undergoing chromatin decondensation have completely silenced rhodopsin expression, and the 10% residual *Rho* mRNA levels detected by RT-PCR (Figure 3) at 2 mo of age are likely due to a small proportion of rods with a preserved chromatin structure. Altogether these results demonstrate that polyQ-expanded ATXN7 induces a dramatic chromatin alteration that correlates with extinction of *Rho* expression.

#### Reduced mRNA Levels of Rod-Specific Genes in SCA7 Mice

Activation of transcription is usually associated with chromatin decondensation. However, we found that *Rho* down-regulation correlated with chromatin decondensation. We thus tested to what extent such an important change in chromatin organization would affect the gene expression profile of rod photoreceptors. Because the rod nuclear architecture in aged R7E mice was similar to that normally



Figure 2. Chromatin Remodeling in Rod Nuclei Paralleled Segment Loss and Rho Down-Regulation in SCA7 Mice

(A) Histological examination of retina from 2-mo-old R7N (panels 1 and 3) and R7E (panels 2 and 4) mice. Toluidin-blue staining of semi-thin sections revealed a discontinuous pattern of segment loss which paralleled an irregular appearance of rod chromatin decondensation in R7E animals (upper panels). High magnification micrographs (lower panels) showed that rods with preserved nuclear morphology are connected with inner segments of normal appearance. Scale bars represent 20  $\mu$ m in upper panels and 10  $\mu$ m in lower panels. (B-D) Rhodopsin immunolocalization in 2-mo-old R7N and R7E retina.

(B) Immunohistochemistry of paraffin-embedded sections was performed using an anti-rhodopsin antibody (4D2). In R7E retina, residual staining was observed in the innermost part of the ONL and in folds in which normal condensed rod nuclei were typically located. Scale bar represents 10 µm. (C and D) Immunofluorescence of retinal cryosections were performed using an anti-rhodopsin antibody (4D2) and DAPI to visualize rod nuclei. Images were collected by confocal imaging analysis, and merged images (rhodopsin in red, DAPI in grey scale) are shown. (C) Very few cells retained rhodopsin staining, which circumscribes the nucleus in the ONL. (D) Higher magnification images demonstrated that residual staining was exclusively found in rods showing a preserved nuclear morphology (arrows), whereas no rhodopsin could be detected in rods showing an altered chromatin organization (arrowheads). Scale bar represents 5 µm.

INL, inner nuclear layer; IS, inner segments; RPE, retinal pigment epithelium. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.g002



**Figure 3.** Comprehensive Characterization of Specific Transcriptional Alterations in the Retina from SCA7 Mice

mRNA levels were quantified by real-time PCR of reverse transcribed RNA from 2-mo-old WT and R7E retina. Expression levels are represented as a percentage of the mean of WT littermate mice after normalization to *Ppia* or *Arbp* levels. In each panel, each bar represents the mean value  $\pm$  the standard error of the mean (SEM) (n = 3-6).

(A) Down-regulation of genes encoding transcription factors, *Crx, Nrl,* and *Nr2e3*, involved in photoreceptor differentiation and maintenance.
 (B) Expression analysis of cone-specific genes, *Bcp, Gnat2*, and *Carr*, in WT and R7E animals.

(C) Severe down-regulation of rod-specific genes, *Rho, Gnat1, Pde6b, Rhok, Rom,* and *Rbp3,* encoding components of the phototransduction machinery.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.g003

seen in cone photoreceptors (Figure 1B), we analyzed expression levels of transcription factors specifically expressed and involved in rod versus cone fate specification. Crx, a homeobox transcription activator, Nrl, a basic motifleucine zipper transcription activator, and Nr2e3, an orphan nuclear receptor, are essential for rod and cone differentiation by controlling photoreceptor gene expression [21-26]. Quantitative RT-PCR revealed decreased mRNA levels of Crx (2-fold, 55% residual mRNA levels), Nrl (3-fold, 31%), and Nr2e3 (5-fold, 21%) in 2-mo-old R7E retina (Figure 3A), suggesting an alteration of photoreceptor differentiation in adult R7E mice. We then quantified mRNA levels of genes encoding cone- or rod-specific markers, but we did not observe a consistent up-regulation of genes encoding components of cone phototransduction cascade. In 2-mo-old R7E mice, blue cone opsin (Bcp) and cone arrestin (Carr) were downregulated (43% and 65% residual levels, respectively), whereas cone transducin (Gnat2) was up-regulated by 113% (Figure 3B).

Importantly however, we found a severe down-regulation of most rod-specific genes tested (12 out of 13). In 2-mo-old R7E mice, quantitative RT-PCR showed a down-regulation of rhodopsin (*Rho*, 13% residual mRNA levels), rod transducin (*Gnat1*, 3%), rod phosphodiesterase  $\beta$ -subunit (*Pde6b*, 10%), rhodopsin kinase (*Rhok*, 28%), Rom-1 (*Rom*, 23%), and Irbp (*Rbp3*, 52%) (Figure 3C and Table S1). Moreover, using Northern blot experiments, we observed comparable reduction of other rod-specific mRNA levels (Table S1), namely phosducin (*Pdc*), rod cGMP-gated channel (*Cncg*), rod arrestin (*Sag*), guanylate cyclase activator (*Guca*), recoverin (*Rcvrn*), and peripherin 2 (*Prph2*). Five distinct housekeeping genes (*Ppia*, *Gapd*, *Arbp*, *Tuba1*, and *Hprt*) showed no differential expression between R7E and WT mice (see figure legends; data not shown).

Finally, we extended our analysis of transcriptional deregulation to the level of the whole transcriptome. Hybridization of MOE 430A Affymetrix microarrays that contained approximately 22,000 mouse transcripts using total RNA extracted from WT, R7N, and R7E mice at 2 mo of age, revealed that polyQ-expanded ATXN7 does not induce a global alteration of mRNA levels, as less than 1% of genes were deregulated with a 2-fold threshold ( $p \leq 0.015$ , Mann-Whitney test) [27]. Importantly, when down-regulated genes were classified according to their expression levels in control retina, 29 of the 50 most highly expressed genes were found to be only expressed in the retina. Thus, polyQ-expanded ATXN7 preferentially down-regulated genes with a retinarestricted expression pattern, accounting for the visual impairment observed in SCA7 mice [17,18]. Finally, we did not find up-regulation of genes encoding factors regulating chromatin structure or accessibility. This aberrant expression profile suggests that rods from R7E mice have completely lost their differentiated state, but did not trans-differentiate into mature cone photoreceptors.

#### Down-Regulated Rod-Specific Genes Are Transcriptionally Altered in SCA7 Mice

Because chromatin decondensation has been typically associated with active transcription, we tested whether the decreased mRNA levels of rod-specific genes were indeed due to a reduced transcriptional activity of these genes. We performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments using formaldehyde cross-linked chromatin extracts prepared from 2-mo-old control (WT or R7N) and R7E retina. We used an antibody raised against the C-terminal domain of the largest subunit of RNA Pol II in ChIP experiments to quantify the relative RNA Pol II occupancy at promoters and coding regions of down-regulated genes. Immunoprecipitated or input DNA amounts were quantified by real-time PCR using primers covering promoter regions from five rod-specific genes (*Rho, Pde6b, Rbp3, Crx,* and *Nrl*) and from a ubiquitously expressed gene, *Ncl* (nucleolin).

All down-regulated genes analyzed showed reduction of RNA Pol II occupancy at the corresponding promoter regions (Figure 4A–E). Furthermore, RNA Pol II recruitment at the *Rho* enhancer region [28], at the coding sequence (exon 4) and at the 3'UTR of *Rho*, was strongly reduced in R7E mice (Figure 4A). No differences were detected in the coding region of a house-keeping gene (*Ncl*), encoding nucleolin (Figure 4F). Thus, the observed reduction of rod-specific mRNA levels resulted from decreased transcriptional activity of these genes.

#### Specific Compartmentalization of Expressed Genes in Rod Photoreceptor Nuclei

Surprisingly, the severe chromatin decondensation in R7E retina did not induce a global alteration of the rod transcriptome, but rather a specific defect in expression of a small subset of genes. We hypothesized that these genes, normally highly expressed, would localize to peripheral euchromatin in normal rods and that this specific compartmentalization would be disrupted by the chromatin alter-



**Figure 4.** Decreased RNA Polymerase II Occupancy at Promoters and Coding Regions of Genes Down-Regulated in SCA7 Mice (A–F) ChIP assays were performed using formaldehyde-fixed chromatin extracts of retina from 2-mo-old control (WT or R7N; dark grey) and R7E (light grey) mice. Specific regions within the different genes were analyzed, as depicted; within the *Rho* gene, each amplified regions were separated by 1.5 kb at least. Each bar represents the mean value  $\pm$  SEM (n = 4-6). RNA polymerase II occupancy, and thus transcriptional activity, was assessed using an antibody directed against the heptapeptide repeat of its C-terminal domain (Po II CTD). All genes down-regulated at the mRNA level in R7E retina (*Rho, Pde6b, Rbp3, Nrl,* and *Crx*) showed marked decrease in Pol II occupancy at their promoters. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.g004

ations that occur in rods from SCA7 mice. Accordingly, immunostaining of WT retina using antibodies against transcription factors (ATXN7, RNA Pol II, TBP, TAF10, Crx, and CBP) and chromatin-associated proteins (HP1 $\gamma$ , HMGI(Y), Rb1, and acetyl-histone H3) revealed that these proteins were always excluded from the heterochromatic region, showing a characteristic ring-like appearance (Figure S4, and see [29]).

We used interphase fluorescent in situ hybridization (FISH) of mouse retina sections to investigate the nuclear localization of the gene encoding rhodopsin (Rho) versus a gene not expressed in rods, the vascular smooth muscle alpha-actin gene (Acta2). BAC probe specificity was confirmed by hybridization of metaphase chromosome spreads from mouse embryonic stem cells (Figure S5). Rho and Acta2 probes were hybridized to retinal sections from 2-mo-old WT and R7E mice, and each probe revealed one or two specific spots in virtually all nuclei (Figure 5). Confocal analysis revealed that the Rho gene was almost never found inside the central, densely DAPI-stained chromatin territory in WT rod nuclei (Figure 5A and 5B). In contrast, the Acta2 gene could be reproducibly detected within this region (arrowheads in Figure 5D and 5E). Quantitative estimates of heterochromatin localization clearly differentiated the location of the Acta2 and Rho genes, showing  $15.1 \pm 2.8\%$  and  $2.4 \pm 1.1\%$  of signals centrally located, respectively (Figure 5G). This difference is likely underestimated as the section treatment slightly modified the rod nuclear structure (see Materials and Methods).

This highly specific distribution was strikingly altered in rod nuclei from 2-mo-old R7E mice (Figure 5C and 5F). Indeed, a similar proportion of FISH signals corresponding to *Rho* and *Acta2* genes could be detected in the densely DAPI-stained area (Figure 5G), indicating a. random, non-specific distribution of both expressed and non-expressed genes. We do not know at this point whether the proportion of rods showing a central FISH signal (around 16%) reflects the actual situation in vivo or is due to the intrinsic limit of the FISH technique. Altogether, these results suggested that the rod nuclear organization normally compartmentalizes rod-specific genes in peripheral euchromatin. However, in R7E mice, alteration of this compartmentalization presumably contributes to loss of the rod-specific gene expression profile.

#### PolyQ-Expanded ATXN7 Incorporation in TFTC/STAGA Complexes Does Not Modify Their HAT Activity

The discrepancy between chromatin and transcriptional abnormalities in R7E mice prompted us to analyze the effect of the polyQ expansion in ATXN7 on the TFTC HAT complex composition and activity. We previously reported that both normal and mutant ATXN7 can incorporate into TFTC using transfected HEK293T [5]. We have now extended this result by analyzing TFTC-type complexes purified from the retina of R7N and R7E transgenic animals, where the pathology normally appears in SCA7 patients. Co-immunoprecipitation experiments were performed using whole retinal extracts from 4-wk-old mice, an age at which mutant



Figure 5. Loss of a Specific Gene Compartmentalization in Rods from SCA7 Mice

(A–F) BAC probes containing *Rho* (A–C) or *Acta2* (D–F) genes were hybridized to retinal cryosections from 2-mo-old WT (A), (B), (D), and (E) or R7E (C) and (F) animals. FISH signals appear in green whereas DAPI-stained photoreceptor nuclei were pseudo-colored in red for better visualization. Merged images were collected by confocal imaging analysis and showed co-localization of *Acta2* within the densely DAPI-stained heterochromatin region in WT rod nuclei (arrowheads in [D] and [E]). By contrast, *Rho* was excluded from this compact heterochromatin region. In R7E rod nuclei, *Rho* and *Acta2* showed a comparable random pattern of intranuclear distribution. Both could be found co-localizing within the central densely DAPI-stained region (arrowheads in [C] and [F]). Scale bars represent 2 µm.

(G) Distribution of *Rho* and *Acta2* between heterochromatin and euchromatin territories in WT and R7E rod nuclei was estimated by counting the number of spots detected in the densely DAPI-stained region. Counting was performed on the projection of four consecutive *z* stacks (1.2  $\mu$ m between each stack) taken through the retinal section such that only entire rod nuclei were included in the counting. More than 500 nuclei were analyzed, and each bar represents the mean value  $\pm$  SEM of three independent experiments performed on two different animals. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.g005

ATXN7 is soluble and not proteolytically processed [16]. First an anti-ATXN7 immunoprecipitation (IP) using R7N or R7E mice retinal extracts, retrieved bona fide TFTC subunits, such as Gcn5, Trrap, Taf10, and Taf12, together with normal or polyQ-expanded ATXN7 (Figure 6A, and data not shown). Reciprocally, when anti-TRRAP or anti-SPT3 antibodies were used, normal and mutant ATXN7 were equally incorporated into the Trrap- and Spt3-containing complexes (Figure 6B, lanes 3 and 4, and Figure 6C, lanes 5-9). We also tested whether the presence of mutant ATXN7 changed the incorporation of the histone acetylase subunit Gcn5 or of other subunits known to regulate TFTC HAT activity, such as Taf12 [30]. TFTC complexes prepared by an anti-ATXN7 or an anti-TRRAP IP from R7N and R7E mice contained about equal levels of Gcn5 and Taf12, as shown by Western blot analysis of immunopurified fractions (Figure 6A, lanes 3 and 6, and Figure 6D, lanes 3 and 6). Importantly, Gcn5 incorporation was not altered even in 10-wk-old mice (Figure 6D), an age at which severe chromatin changes were observed.

Next we tested whether the above-purified HAT complexes, containing either normal or mutant ATXN7 (Figure 6A–D), differentially acetylate free or nucleosomal histones in an in vitro acetylation test. TFTC-type complexes purified by an anti-AXN7 IP from the retina of R7N mice have the expected HAT activity, since they acetylate mainly histone H3 and, weakly, H4 as does the highly purified TFTC (Figure 6E, and see [6]). Histone acetylation pattern of complexes immuno-purified from R7N or R7E retina were indistinguishable (Figure 6E, lanes 3–6). When Spt3- or Trrap-containing complexes were tested for their acetylation activity we did not observe a significant difference between complexes

purified from retina of R7N or R7E mice at either 4 or 10 wk of age (Figure 6F, lanes 1–4, and Figure 6G, lanes 2–5). Quantification of the HAT activities of ATXN7- and Trrapcontaining complexes revealed an equal histone acetylation activity of TFTC-type complexes purified from R7N and R7E retina (Figure S6A). Using an anti-SPT3 antibody, we observed a slight decrease (0.25-fold) of TFTC HAT activity in R7E mice (Figure S6A). We then carried out these assays using nucleosomal histones and consistently observed no significant differences between the HAT activities of complexes prepared from either R7N or R7E mice (Figure S6B and S6C). These data together suggest that polyQ-expanded ATXN7 does not significantly alter the in vitro HAT activity of TFTC-type complexes.

### Aberrant TFTC Recruitment to Promoters of Rod-Specific Genes in SCA7 Mice

We then tested whether the abnormal chromatin remodeling could result from a deregulation of TFTC recruitment to specific genes in rods from SCA7 mice. We performed ChIP experiments using chromatin extracts prepared from 2-moold control (WT or R7N) and R7E retina to quantify TFTC recruitment at genes down-regulated (*Rho, Pde6b, Rbp3, Crx,* and *Nrl*) or unmodified (*Ncl*) in R7E mice.

To monitor TFTC recruitment, we used an antibody raised against SPT3 [31] and found a specific increase (2- to 3-fold) of Spt3 occupancy at the promoters from the *Rho*, *Pde6b*, and *Rbp3* genes in R7E mice, as compared to control mice (Figure 7A). In contrast, Spt3 recruitment was not modified at the *Crx* and *Nrl* promoters (Figure 7B). Similarly, the housekeeping gene *Ncl* did not show any differences in Spt3 binding (Figure



Figure 6. TFTC Subunit Composition and HAT Activity Are Not Altered by PolyQ-Expanded ATXN7 in R7E Retina

(A) Western blot analysis of TFTC-type complexes immunopurified from 4-wk-old R7N or R7E retinal homogenates using an anti-ATXN7 antibody. ATXN7 IPs revealed comparable levels of Trrap, Gcn5, and Taf12 in complexes purified from R7N or R7E retina.

(B and C) Whole retinal extracts from 4-wk-old R7N and R7E animals were immunoprecipitated with an anti-SPT3 (B) and anti-TRRAP antibody (C). Using the same antibodies, complexes were also immunoprecipitated from HeLa cell nuclear extract as positive controls. The retinal extracts (Input) and the immunopurified complexes were analyzed by immunoblotting with an anti-ATXN7 antibody. Complexes contained similar amounts of normal or mutant ATXN7.

(D) Western blot analysis using anti-TRRAP and anti-GCN5 antibodies on complexes immunoprecipitated with an anti-TRRAP antibody from 10-wk-old R7N and R7E retinal homogenates. Using the same antibody, complexes were also immunoprecipitated from HeLa cell nuclear extract as positive controls. Comparable levels of Gcn5 and Trrap were detected in purified complexes from R7N and R7E retina.

(E–G) HAT activities of immunopurified complexes bound to either the anti-ATXN7 pAb (E), anti-SPT3 mAb (F), or anti-TRRAP mAb beads (G) from R7N and R7E retina were measured by an in vitro HAT assay performed on free core histones. Histones were separated by SDS-PAGE and stained by Coomassie Brilliant Blue (CBB) and acetylated histones were visualized by fluorography (Fluorogr). The position of each histone is indicated. The pattern of histone acetylation was identical to that of a highly purified TFTC fraction used as a positive control. No histone acetylation could be detected when the antibody was omitted. The age of the mice are indicated in weeks in brackets. These results are representative of three independent experiments. Quantification of all HAT assays performed on R7N and R7E retina is provided in Figure S6A.

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.g006



ChIP assays were performed using formaldehyde-fixed chromatin extracts of retina from 2-mo-old control (WT or R7N; dark grey) and R7E (light grey) mice. Primers were selected to amplify promoter or enhancer regions of the specified genes, as depicted. (A and B) ChIPs using an antibody against a TFTC-specific subunit (Spt3) revealed an increased recruitment of Spt3 in R7E retina, at promoters from genes normally highly and specifically expressed in differentiated rods, namely *Rho, Pde6b,* and *Rbp3*. No such differences could be observed at promoters from two genes regulating rod terminal differentiation, *Crx* and *Nrl*, and at the intronic enhancer region of a house-keeping gene, *Ncl.* (C and D) ChIPs using an antibody against acetylated lysines 9 and 14 of histone H3 (Ac H3) revealed an increased acetylation of histone H3 in R7E retina, specifically at the same promoters, which showed increased Spt3 binding *(Rho, Pde6b,* and *Rbp3)*. Promoters from *Crx, Nrl*, and *Ncl* did not show any differences in histone H3 acetylation.

The amount of immunoprecipitated DNA was quantified by real-time PCR and normalized to the amount of DNA present in a fraction of the input chromatin extract. Values are expressed as fold enrichment over background IP signals obtained in corresponding no antibody ChIP experiments (see Figure 59). Each bar represents the mean value  $\pm$  SEM (n = 4).

DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.g007

7B). We next analyzed whether this abnormal recruitment of TFTC-type complexes causes elevated levels of histone modifications at promoters of deregulated genes, possibly accounting for the transcriptional alterations observed in R7E mice. As TFTC preferentially acetylates lysines on the Nterminal tail of histone H3 from 5' regulatory regions, we quantified H3 K9 and K14 acetylation at the promoter regions previously analyzed. We found an aberrant histone H3 hyperacetylation profile in R7E mice that paralleled aberrant TFTC recruitment. Rho, Pde6b, and Rbp3 promoter regions were hyperacetylated in R7E mice as compared to control mice (Figure 7C). When comparing the ChIP signals obtained at the Rho, Pde6b, and Rbp3 promoters, we observed around a 2- to 3-fold increase both in histone H3 acetylation and in Spt3/TFTC occupancy between R7E and control mice. In contrast, H3 acetylation pattern at promoters from Crx, Nrl, and Ncl was not modified in R7E mice as compared to control mice (Figure 7D). We also analyzed TFTC-type complexes recruitment at different regions of the Rho gene using an anti-SPT3 antibody. We observed a 2-fold increased association of Spt3 at the *Rho* enhancer region, the proximal promoter, and the 3'UTR in R7E mice as compared to control mice (Figure S7). Interestingly, an increased Spt3 occupancy was also observed 2 kb downstream of the Rho gene, in R7E animals. Taken together, these results indicate that, in mouse photoreceptors, the polyQ expansion in

ATXN7 does not modify its incorporation into TFTC and does not affect its HAT activity. Rather TFTC/STAGA recruitment is deregulated over large genomic regions, leading to histone H3 hyperacetylation, chromatin decondensation, and transcriptional dysregulation.

#### Discussion

Based on our findings, we propose that mutant ATXN7, by its incorporation in TFTC-type complexes, deregulates its recruitment, thereby inducing aberrant histone H3 acetylation patterns at specific promoters. Alterations of chromatinmodifying complex regulation likely result in the severe disorganization of the normal chromatin condensation pattern seen specifically in mature rod photoreceptor nuclei. These perturbations eventually cause a loss of the tissuespecific pattern of gene expression, leading to rod photoreceptor dedifferentiation and dysfunction.

#### Chromatin Decondensation Leads to Transcriptional Repression of Rod-Specific Genes in SCA7 Mouse Retina

We provide here, to the best of our knowledge, the first evidence that polyQ expansions induce chromatin structure changes in vivo, contributing to early neuronal dysfunction. Taking advantage of the mosaic progression of the R7E retinal phenotype, we showed that *Rho* down-regulation and hence rod dysfunction were completely correlated with chromatin decondensation. Furthermore, we could detect chromatin abnormalities in 4-wk-old R7E mice (Figure S1B), before the onset of an overt retinal dysfunction and concomitantly with a 2-fold Rho mRNA decrease [17]. Chromatin decondensation and transcriptional dysregulation of rod-specific genes are thus the earliest molecular abnormalities in R7E mice and occur before retinal dysfunction can be observed. However, transcriptional alterations observed in later stages of R7E retinopathy might additionally result from the severe rod dysfunction that occurs at this age. Candidate gene expression and transcriptome analysis of retina from 2mo-old R7E mice revealed a severe transcriptional defect affecting rod-specific genes. Accordingly, Bowman et al. [32] suggested that the photoreceptor transcriptional machinery is not globally affected, since rods showing a loss of rhodopsin staining in Sca7<sup>266Q/5Q</sup> mice had increased Ub<sup>G76V</sup>-GFP transgene mRNA levels. In addition, Yoo et al. [18] reported that several rod-specific genes were downregulated in  $\mathrm{Sca7}^{\mathrm{266Q/5Q}}$  animals. Thus, comparable chromatin and transcriptional abnormalities were observed in both transgenic and knock-in models, suggesting that these observations are relevant for SCA7 retinopathy. Such observations may be also relevant to polyQ toxicity in other neuronal types in other disease models. Identification of the mechanisms underlying specific transcriptional alterations observed in other polyQ diseases [33,34] will help design new therapeutic strategies.

#### TFTC/STAGA Dysfunction in SCA7

Using SCA7 mice, we showed here that TFTC/STAGA composition and HAT activity are not affected by incorporation of polyQ-expanded ATXN7. Two recent studies, performed in yeast and in stably transfected 293T embryonic kidney cells, suggested that polyQ-expanded ATXN7 inhibits TFTC/STAGA nucleosomal acetylation activity by interfering with recruitment of SPT3, ADA2b, and TAF12 into these complexes [19,20]. The last two subunits are known as modulators of Gcn5 HAT activity in yeast SAGA [10,30,35,36]. In our study, TFTC/STAGA was immunopurified from SCA7 mouse retina using antibodies against three different subunits. Our results convincingly demonstrate that SCA7 mutant TFTC/STAGA complexes had normal incorporation of Gcn5, Taf12, and Spt3 and, consistently, normal levels of HAT activity on both free histones and nucleosomes. The discrepancies between our in vivo results and previously reported in vitro observations are likely explained by the different model systems used in each study. McMahon et al. analyzed the incorporation of polyQ-expanded human ATXN7 in the yeast SAGA complex. Although yeast Sgf73, Spt3, and Taf12 are the respective homologs of human ATXN7, SPT3, and TAF12, their sequence similarity is low and significant only in one or two conserved domains. In particular, mammalian ATXN7 differs from yeast Sgf73 by the presence of the polyQ tract and an additional third domain that is likely involved in interactions with other TFTC/STAGA subunits [5]. Thus, polyQ-expanded ATXN7 incorporation into yeast SAGA versus human TFTC/STAGA might have different effects on the structure, composition, and function of these complexes. Furthermore, overexpression of other expanded polyQ-containing proteins in yeast has been shown to lead to the formation of intranuclear insoluble aggregates much quicker than in mouse models [37,38]. Thus, in a yeast strain overexpressing mutant ATXN7, its rapid accumulation could alter the available levels of various components of the complex, such as Ada2, Taf12, and Spt3, due to a sequestration or destabilization of these proteins, leading to the quick loss of SAGA HAT activity. Palhan et al. [20] analyzed STAGA complexes from transfected cells using a single antibody against recombinant ATXN7 which could result in the purification of other partial complexes containing overexpressed ATXN7. Furthermore, no transcriptional and/or chromatin alterations were reported in this cell line, making it difficult to correlate impaired HAT activity with SCA7 pathology. In contrast, our results were exclusively obtained from SCA7 mouse retina in which chromatin decondensation is correlated with transcriptional deregulation that likely accounts for the retinal phenotype observed in these mice. In this in vivo model, TFTC/STAGA composition and HAT activity were analyzed before and after the onset of aggregate formation and transcriptional alteration. Finally, using a lymphoblastoid cell line from a SCA7 patient carrying 51 CAG expansion, we previously reported that TFTC composition and HAT activity were unaltered, as compared to control cell lines [39]. In conclusion, these discrepancies demonstrate that in vivo models, which reproduce key features of human pathologies, are likely more significant to understanding disease pathogenesis. However, we cannot exclude that some of our observations in R7E mice might be model specific, and therefore may not account for all pathogenic mechanisms underlying SCA7 retinal phenotype. In light of our observations made on the R7E model, the retina of the SCA7 knockin mouse model, which recapitulates more accurately SCA7 phenotype in human, will also be further examined, although these mice die quite early, making the analysis difficult.

Previous studies suggested that disruption of the activity of the photoreceptor-specific transcriptional activator Crx may play a role in SCA7 retinopathy by its direct interaction with ATXN7 and that TFTC/STAGA complexes might act as coactivators for Crx-mediated transcriptional activity [20,40,41]. In contrast, other studies showed early and robust transcriptional alterations without modification of Crx levels and activity (Sca7<sup>266Q/5Q</sup>) [18]. Furthermore, expression levels of several genes known to be controlled by Crx were not modified in Sca7<sup>266Q/5Q</sup> retina whereas other genes not controlled by Crx were found down-regulated [18]. In agreement, we show here a global down-regulation of all rod-specific genes and not exclusively those regulated by Crx, demonstrating that interference of Crx activity does not solely account for the retinal pathogenesis specifically observed in SCA7. Furthermore, we were unable to detect any direct interaction between ATXN7-containing TFTC/ STAGA complexes and Crx in WT mouse retina by coimmunoprecipitation experiments (Figure S8). This observation might be explained by the fact that interaction between known activators and co-activators can be temporally and specifically regulated in vivo. Sequential co-ChIP experiments will allow determining whether Crx and TFTC/STAGA can co-occupy promoters from rod-specific genes.

#### Involvement of TFTC-Type Complexes in Rod Transcriptional Regulation

Chromatin opening and histone H3 hyperacetylation, normally considered as positive signals for transcription,

instead correlated with transcriptional down-regulation of a number of genes in R7E retina, as shown by reduced mRNA levels and decreased RNA Pol II occupancy. Several nonexclusive hypotheses can be proposed to explain how mutant TFTC, containing polyO-expanded ATXN7, can be aberrantly recruited at certain locations, i.e., at promoters and even nearby intergenic regions, and how this would downregulate gene expression. One possibility would be that the presence of the polyQ stretch within TFTC serves as an aberrant interaction domain with chromatin, recruiting TFTC at aberrant sites, thus causing histone H3 hyperacetylation and chromatin decondensation, and eventually displacing transcriptional co-activators from their normal localization. Supporting this possibility, large-scale chromatin decondensation has been observed after targeting acidic activators to heterochromatin domains [42,43]. Alternatively, mutant ATXN7 might impair some events downstream of coactivator recruitment, such as the formation of a fully active preinitiation complex containing all the general transcription factors. Indeed, increased occupancy of TFTC complexes did not lead to increased transcription, offering support that additional factors are required to assemble and activate RNA Pol II transcription machinery at rod-specific genes. Finally, mutant TFTC-type complexes may aberrantly acetylate nonhistone substrates accounting for chromatin decondensation and directly or indirectly to transcriptional alterations observed in SCA7 mice. Hyperacetylation of HMG proteins or that of histone H1, which was shown to be very efficiently acetylated by TFTC in vitro [6], may be other alternatives to explain the observed chromatin decondensation. HMGI(Y) plays a crucial role for rhodopsin promoter activity [44] and has been shown to be acetylated by PCAF/GCN5 [45].

### Contribution of Chromatin Organization to Rod-Specific Expression Profile

Numerous studies have suggested that changes in nuclear organization establish specific patterns of gene expression, in particular during differentiation [46-49]. Chromatin condensation in rods is tightly regulated because it accompanies rod terminal differentiation and may thus be required for proper regulation of cell type-specific and stage-specific expression in the mouse retina [50] (D. Helmlinger and D. Devys, unpublished data). A recent study suggested a correlation between rod chromatin re-organization and transcriptional repression of rod-specific genes in mice [29]. Together with our observations in R7E mice, this suggests that rod-specific chromatin condensation is required to reach very high expression levels for a specific set of genes encoding proteins required for rod differentiation and function. Our FISH results indicate that in WT rods, a non-expressed gene will be localized in the densely stained central chromatin region, whereas a rod-expressed gene, such as Rho, will be localized in the peripheral euchromatin.

Although rod central chromatin displayed histological properties of heterochromatin, little is known about the molecular constituents of this central compact region. It might also contain housekeeping genes with lower expression levels. Rod nuclei might contain chromatin-associated factors, such as histone variants, restricted to mature rods and necessary to regulate the expression of genes involved in rod differentiation and activity. Such proteins were already identified and shown to be required for various developmental processes or during induction/silencing of gene expression [51,52]. Positioning highly expressed genes in the rod-specific euchromatic nuclear periphery might also be used to accelerate the coupling between mRNA synthesis, processing, and export, thereby accelerating the total rate of protein synthesis [53,54].

These findings might explain why such a massive chromatin remodeling in SCA7 mice affected only those genes whose expression and nuclear distribution are the most tightly regulated. These genes (i.e., Rho, Pde6b, and Rbp3) are characterized by an increased TFTC-binding, histone H3 hyperacetylation, but surprisingly with a transcriptional decrease in SCA7 mouse retina. We hypothesize that at the corresponding promoters, TFTC requirement is normally highly regulated and that aberrant, non-specific TFTC recruitment over a large genomic region (Figure S7) causes deregulated Pol II transcription. These highly expressed genes may be particularly sensitive to the changes occurring in the chromatin territories and to the consequent dilution of general transcription factors in the increased nuclear volume. In contrast, expression of a majority of genes is not changing despite severe chromatin reorganization, because these genes are probably weakly transcribed and thus are not sensitive to the changes in nuclear environment.

Altogether our study may provide new insights into SCA7 pathogenesis. Deciphering the exact causal relationships between TFTC/STAGA aberrant recruitment, histone hyper-acetylation, and chromatin decondensation will require further investigation. These future directions should shed light on the transcriptional mechanisms initiating and controlling a tissue-specific gene expression pattern and the contribution of TFTC-type coactivator complexes to such processes in vivo.

#### **Materials and Methods**

**Animals.** R7N and R7E animals were from the R7N.C and R7E.A transgenic lines, respectively, and were maintained on the inbred C57BL/6 background [16]. The Sca<sup>7266Q/5Q</sup> C1 line was backcrossed with C57Bl/6J [18]. Genotyping was performed using PCR on mouse tail genomic DNA according to procedures described previously [16,18]. All experiments were performed in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* 

Quantitative RT-PCR analysis of retinal RNA. We prepared total RNA by single-step extraction of guanidium thiocyanate retinal homogenates. Reverse transcription was performed on 1  $\mu$ g total RNA using SuperScriptII (Invitrogen, Carlsbad, California, United States) and random hexamers according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications of cDNA were performed using SYBR Green I (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, United States) on a LightCycler instrument (Roche Products, Basel, Switzerland). PCR primers were designed using Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\_code.html) and are available upon request.

IP and histone acetylation assay. Extracts from two retinas are immunoprecipitated using 50  $\mu$ l of protein A-Sepharose beads and polyclonal antibodies (anti-TRRAP 1930 or anti-ATXN7 1261 as described [5]) or monoclonal antibodies for SPT3. After washing IP, beads are immediately boiled and processed for Western blot analysis or used for a HAT assay. The HAT test was performed on free histones or on nucleosomes as described [6]. A list of used antibodies is available in Table S2.

Electron microscopy, histology, and immunohistology. For light and electron microscopy, enucleated eyes were fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde in PBS 1× for 16 h at 4 °C. The lens and cornea were removed. After rinsing in PBS, the eyes were postfixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer for 2 h at 4 °C, dehydrated with graded alcohol series, and embedded in Epon. For light microscopy, semi-thin sections (1  $\mu$ m) were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Philips 208 electron microscope (Philips, Best, Netherlands) operating at 60 kV. For immunohistochemistry and immunohistofluorescence, enucleated eyes were dissected to remove lens and cornea, and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 2 h, 0.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1× PBS. For immunochemistry, fixed eyecups were dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 5µm sections. For immunofluorescence, fixed eyecups were cryoprotected in 30% sucrose, frozen and embedded in Cryomatrix (Thermo Shandon, Pittsburgh, Pennsylvania, United States), and then cut into 10 µm cryostat sections mounted on SuperFrost/Plus slides (O. Kindler, Freiburg, Germany). Sections were permeabilized and blocked for 1 h with 10% normal goat serum, 0.5% bovine serum albumin, 0.1% Tween 20, and 1× PBS. For immunochemistry, biotinylated goat antirabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, California, United States), streptavidin-biotin complex solution (Vector Laboratories), and diaminobenzidine (Vector Laboratories) were used according to the instructions of the manufacturer. Sections were not counterstained to better contrast the DAB staining. For immunofluorescence, secondary antibodies used were CY3- and Oregon Green-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, United States), and nuclei were counterstained with 0.5 µg/ml DAPI (4,6-diaminido-2-phenylindole).

**FISH.** BAC clones were obtained from BACPAC Resources Center (BPRC, Oakland, California, United States), biotin-labeled by nick translation, and used as DNA FISH probes. We used BAC clones RP24-248E16 for *Rho* and RP24-329P13 for *Acta2*. The specificity of labeled probes was checked by FISH analysis of mouse metaphase spreads that were prepared and hybridized with 200 ng of each probe per slide, according to standard methods.

We then developed a protocol for interphase FISH of mouse retina, based on a previously described procedure [55]. Indeed, we noticed that standard pre-treatment conditions altered rod nuclear morphology, as revealed by DAPI staining, possibly modifying the localization of Rho and Acta2. Different slide pretreatment conditions were applied in order to improve the hybridization signal-to-noise ratio without completely altering rod nuclear architecture. Paraffinembedded mouse retinal sections (5 µm) were prepared as for immunohistochemistry. Slides were deparaffinized with xylene, hydrated with a series of graded ethanol, and permeabilized in 0.1% Triton-X 100 at room temperature for 5 min. Slides were then treated either with 1M NaSCN at 80 °C for 30 min or with 20% or 50% glycerol at 80 °C for 30 min. For digestion, approximately 100  $\mu g$ proteinase K (10 mg/ml in 2× SSC; Sigma) per slide was applied and incubated at 37  $^{\circ}\mathrm{C}$  for 45 min. Slides were then washed twice in 2× SSC for 2 min, post-fixed in 1% formaldehyde (in 1× PBS/50 mM  $MgCl_2$ ) for 10 min at room temperature, rinsed in 1× PBS for 5 min, and then dehydrated with a series of graded ethanol. Denaturation was realized in 70% formamide (in  $2\times$  SSC) at 80 °C for 3 min. Dehydration was then carried out with a series of cold (-20 °C) graded ethanol, and slides were air dried. Meanwhile, labeled DNA probes were precipitated with 10 µg Cot-1 DNA (1 mg/ml; Invitrogen) and 1.5 µg ssDNA (10 mg/ml; Sigma) per slide. Probes were first resuspended in 70% deionized formamide (in  $2 \times SSC$ ) and then in 20% dextran sulphate (in 4× SSC) at 37 °C for at least 30 min. DNA probes were then denatured at 76 °C for 5 min, pre-annealed at 37 °C for at least 1 h, applied to denatured slides, and hybridized by overnight incubation at 37 °C. Post-hybridization was then performed according to standard procedures. Briefly, slides were washed three times for 5 min each in 50% formamide, 2× SSC at 42 °C, and three times for 5 min each in 0.5× SSC at 42 °C. Slides were then permeabilized in 0.1% Tween-20 (4× SSC) for 5 min at room temperature, blocked in 3% BSA for 30 min at 37 °C, and sequentially treated with FITC (fluorescein-labeled ) streptavidin (Vector), biotin-streptavidin (Vector), and FITC-strepatavidin, in 1% BSA/0.1% Tween-20/4× SSC, each for 30 min at 37 °C. After washing, slides were incubated with 0.5  $\mu$ g/ ml DAPI, dehydrated in a graded series of ethanol, air dried, and mounted in Vectashield (Vector). Nuclei and FISH signals were visualized and acquired by confocal microscopy. DAPI fluorescence was pseudo-colored using confocal specific filters.

**ChIP.** Dissected retinas were immediately incubated for 10 min at room temperature in 1% formaldehyde with rocking. Cross-linking was stopped by the addition of 0.125M glycine for 5 min at room temperature, and retinas were washed in PBS containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1× protease inhibitors cocktail (PIC; Sigma). Two retinas (one mouse) were pooled and homogenized on ice in 500 µl lysis buffer (20 mM HEPES-KOH [pH 8.0], 10 mM KCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, and PIC) using a Dounce homogenizer (pestle B; Kimble/Kontes, Vineland, New Jersey, United

States). Nuclei were recovered by table-top centrifugation (5 min at 5,000 rpm, 4 °C), resuspended in 120 µl sonication buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 8.0], 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X 100, 0.1% NaDOC, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, and PIC) and incubated on ice for 10 min. Cross-linked chromatin extracts were then diluted 4.5fold in IP buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% Triton-X 100, 1 mM PMSF, and PIC) and then sonicated to an average DNA length of 400-1000 base pairs (Figure S9). After centrifugation (at 4  $^\circ\!\bar{C}$  for 15 min at full speed), 40  $\mu\!l$  of the supernatants were used as inputs and the remainder (~1.5 mg, i.e.,  $\sim 1.3 \times 10^7$  rod cells from two whole retina) used for one IP. Extracts were first pre-cleared with 20-µl preimmune IgG, 200-µg salmon sperm DNA, 0.1% BSA, and 50-µl protein A- or G-Sepharose beads (Sigma) slurry for 2 h at 4 °C. These beads were prepared by two washings in PBS and resuspension in 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.1). Pre-cleared extracts were incubated with 2 to 5 µg of anti-RNA Pol II CTD (7G5), anti-SPT3 (2C10), anti-acetyl K9, K14 H3 antibody (06-599; Upstate Biotechnology, Charlottesville, Virginia, United States) or the appropriate amount of rabbit preimmune serum as control, for 16 h at 4 °C. Immune complexes were recovered by a 5-h incubation at 4 °C with protein A- or G-Sepharose. Beads were serially washed with 500-µl low-salt buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton-X 100, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, and PIC), high-salt buffer (same as before with 500 mM NaCl), lithium chloride buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NaDOC, 1% NP-40, 1 mM PMSF, and PIC), and twice in 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0). Immunoprecipitated chromatin complexes were eluted twice from beads with 1% SDS, 0.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, each time for 30 min at 65 °C, with vortexing each 5 min. Cross-linking was reversed by overnight incubation at 65 °C, with 10 µg RNase A in 200 mM NaCl. DNA was then recovered by digestion with 20 µg of proteinase K in 5 mM EDTA for 2 h at 42 °C and was purified by phenol-chloroform extraction. DNA sequences present in the immunoprecipitates were quantified by real-time PCR using SYBR Green I (Sigma-Aldrich) on a LightCycler instrument (Roche). All PCR primers were designed using Primer3 software and are available upon request. DNA amounts were calculated by comparison to a standard curve generated by serial dilutions of input DNA. Input represented 4% of the total amount of chromatin used for each IP sample (2 retinas). Fold enrichment for each antibody was calculated as the ratio of immunoprecipitated sequence over total sequence amount in input chromatin and normalized to the ratio obtained without antibody (Figure S9A).

#### **Supporting Information**

Figure S1. Chromatin Decondensation in R7E Mice

(A) Localization of normal and mutant ataxin-7 in rod nuclei from R7N or R7E mice, respectively. Retinal cryosections (10  $\mu$ m) from 2-y-old R7N and R7E animals were stained using anti-ATXN7 antibody (1261, green) and DAPI (pseudocolored in red) to visualize rod nuclei. Merge images revealed normal ATXN7 localization in the thin rim of peripheral euchromatin in rod nuclei. Mutant ATXN7 is aggregated into a single, large NI within the decondensed chromatin, adjacent to the remaining central heterochromatin territory. Scale bar represents 3  $\mu$ m.

(B) Chromatin decondensation is detected before the onset of R7E retinopathy. Histological examination of retina from 4-wk-old R7N (left panel) and R7E (middle and right panels) mice. Toluidin-blue staining of semi-thin sections revealed a mild decondensation of rod chromatin in R7E animals, predominantly in the outer part of the outer nuclear layer (ONL).

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.sg001 (162 KB PDF).

Figure S2. Electron Microscopy of 2-Y-Old R7E Retina

(A) Note the almost complete absence of outer and inner segments (OS + IS) because photoreceptor nuclei (ONL) are in close proximity to the retinal pigmented epithelium (RPE).

(B-C) In both WT and R7E mice, cells from the retinal pigment epithelium displayed numerous apical microvilli contacting photoreceptor segments and showed typical outer segment phagocytosis (PH) [56]. These observations further indicate that rod outer segment loss in R7E mice is due to a defect in their renewal.

Scale bars represent 3  $\mu$ m in (A) and (B) and 0.5  $\mu$ m in (C).

av, apical microvilli; bm, Bruch's basement membrane; IS, inner segments; m, melanin pigments; n, nuclei of RPE cells; olm, outer limiting membrane; OS, outer segments; PH, phagosomes; pn, photoreceptor nuclei; pos, photoreceptor outer segments; RPE, retinal pigment epithelium.

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.sg002 (445 KB PDF).

Figure S3. Ultrastructure of NIs Found in Rod Photoreceptors from 3-mo-Old  $\rm Sca7^{266Q/5Q}$  Mice

Examples of NIs (indicated by large arrows in a and c) found within rods by conventional electron microscopy. At higher magnifications, the NI appeared as a pale-stained structure surrounded by euchromatin (eu), distinct from the darkly stained adjacent heterochromatin (h) territory and central nucleolus (Nu). Scale bars repesent 1  $\mu$ m in a, 0.25  $\mu$ m in b, d, and e, and 0.5  $\mu$ m in c. eu, euchromatin; h, heterochromatin; nu, nucleolus.

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.sg003 (400 KB PDF).

Figure S4. Unique Architecture of Rod Photoreceptor Nuclei

Retinal cryosections (10  $\mu$ m) from 2-mo-old WT animals were stained using DAPI (blue) and antibodies against various nuclear proteins (red): RNA polymerase II (A), TBP (B), a TFTC/STAGA subunit ATXN7 (C), unmodified histone H3 (D), K9, K14 acetylated histone H3 (E), the photoreceptor specific transcriptional activator Crx (F), the heterochromatin protein HP1 $\gamma$  (G), the non-histone chromosomal protein HMGI(Y) (H), and a transcriptional repressor (TIF1 $\beta$ ) (I). Fluorescence images were collected and merged to visualize the intranuclear localization of several transcription factors and chromatin regulators in WT rod nuclei. All proteins analyzed present a characteristic ring-like appearance and are predominantly localized to the thin rim of peripheral euchromatin. Scale bar represents 5  $\mu$ m. Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.sg004 (150 KB PDF).

Figure S5. Demonstration of FISH Probes Specificity

FISH of *Rho* and *Acta2* probes to mouse embryonic stem cell spreads revealed specific hybridization on metaphase chromosomes and interphase nuclei, counterstained with DAPI. Scale bar represents  $5 \,\mu$ m. Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.sg005 (77 KB PDF).

**Figure S6.** TFTC Histone Acetyl Transferase Activity on Histone or Nucleosomal Substrates Is Not Altered by ATXN7 PolyQ Expansion in R7E Retina

(A) Quantification of the HAT activities of TFTC-type complexes immunopurified from R7N and R7E retina. HAT assays were performed after immunopurifications using anti-ATXN7, anti-SPT3, or anti-TRRAP antibodies, as indicated in Figure 6. No significant differences could be detected when comparing R7N and R7E mice. Each HAT activity was calculated and is represented as a ratio to the mean of all animals analyzed in each assay. Each bar represent the mean value  $\pm$  the standard error of the mean (n = 2-7). (B–C) HAT activities of immunopurified complexes bound to the anti-SPT3 monoclonal antibody (mAb) (B) or anti-TRRAP mAb (C) beads from R7N and R7E retina were measured by an in vitro HAT assay performed on oligonucleosomes prepared from HeLa cells. Histones were separated by SDS-PAGE, and acetylated histones were visualized by fluorography (Fluorgr). The position of each histone is indicated. The age of the mice are indicated in weeks in brackets.

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.sg006 (146 KB PDF).

**Figure S7.** Increased Recruitment of TFTC-Type Complexes Containing PolyQ-Expanded ATXN7 at Different Regions of the *Rho* Gene ChIP assays were performed using formaldehyde-fixed chromatin extracts of retina from 2-mo-old control (WT or R7N; dark grey) and R7E (light grey) mice. Specific regions within the *Rho* gene were analyzed by real-time PCR, after ChIP using an antibody against a TFTC-specific subunit (Spt3). Quantification of fold enrichment was

#### References

- David G, Abbas N, Stevanin G, Durr A, Yvert G, et al. (1997) Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. Nat Genet 17: 65–70.
- Michalik A, Martin JJ, Van Broeckhoven C (2004) Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. Eur J Hum Genet 12: 2–15.
- Cummings CJ, Zoghbi HY (2000) Fourteen and counting: Unraveling trinucleotide repeat diseases. Hum Mol Genet 9: 909–916.
- Enevoldson TP, Sanders MD, Harding AE (1994) Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy. A clinical and genetic study of eight families. Brain 117: 445–460.
- 5. Helmlinger D, Hardy S, Sasorith S, Klein F, Robert F, et al. (2004) Ataxin-7

calculated as indicated in Figure S9. Each bar represents the mean value  $\pm$  the standard error of the mean (n = 4-6).

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.sg007 (73 KB PDF).

Figure S8. Absence of In Vivo Interaction of Crx with TFTC/STAGA Complexes

(A) Whole retinal extracts from WT or normal ATXN7-expressing mice (R7N) were immunoprecipitated with two distinct anti-Trrap polyclonal antibodies (lanes 2 and 4) or one anti-ATXN7 monoclonal antibody (lane 6). Immunoprecipitated complexes retained on protein A-Sepharose beads were analyzed by immunoblotting with a polyclonal antibody detecting Crx. Similar experiments were performed using the anti-Crx polyclonal antibody for IP and a monoclonal anti-ATXN7 antibody for immunoblot analysis. Both panels demonstrated absence of co-immunoprecipitation of Crx with either Trrap or ATXN7 in mouse retina (lanes 2, 4, 6, and 8). IgG bands were detected with the secondary anti-rabbit peroxidase-conjugated antibodies (lanes 2 and 4). Input (lanes 1, 3, 5, and 7) represents 10% of the amount of whole retinal extracts used for IP. Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.sg008 (1.2 MB PDF).

#### Figure S9. ChIP Experiment Design

(A) Quantification of the fold enrichment for each antibody at specific loci was obtained by calculating the ratio of immunoprecipitated DNA relative to input DNA amounts, normalized to the ratio obtained with a control IP (no antibody).

(B) Representative example of sonicated input chromatin isolated from mouse retina (see Materials and Methods).

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.sg009 (74 KB PDF).

**Table S1.** Comprehensive List of Deregulated Genes in Retina from 2-mo-Old R7E Mice

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.st001 (51 KB DOC).

Table S2. Source of Antibodies Used and Working Dilutions

Found at DOI: 10.1371/journal.pbio.0040067.st002 (70 KB DOC).

#### Acknowledgments

We are grateful to J. L. Mandel, M. Frontini, T. Hussenet, and S. DuManoir for helpful discussions and advice with ChIP and FISH experiments, and to F. Winston for critically reading the manuscript. We thank R. Losson, X. Zhu, C. Craft, D. Hicks, and G. Manfioletti for providing antibodies. We also thank F. Landmann, C. Weber, and staff from the Institut Clinique de la Souris for their contribution to this work.

Author contributions. DH, LT, and DD conceived and designed the experiments. DH, SH, GAS, AG, and DD performed the experiments. DH, LT, and DD analyzed the data. AE, ABB, SP, HYZ, and YT contributed reagents/materials/analysis tools. DH, LT, and DD wrote the paper.

**Funding.** This work was supported by funds from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, and Collège de France; the Fonds National de la Science ACI, European Community RTN (HPRN-CT-2004–504228), STREP (LSHG-CT-2004–502950), and AICR (03–084) grants (to LT); and the National Organization for Rare Disorders (NORD) and European Community (EUROSCA integrated project, LSHM-CT-2004–503304) grant (to DD and YT).

**Competing interests.** The authors have declared that no competing interests exist.

is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. Hum Mol Genet 13: 1257–1265.

- Brand M, Yamamoto K, Staub A, Tora L (1999) Identification of TATAbinding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction. J Biol Chem 274: 18285– 18289.
- Martinez E, Kundu TK, Fu J, Roeder RG (1998) A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. J Biol Chem 273: 23781–23785.
- Hardy S, Brand M, Mittler G, Yanagisawa J, Kato S, et al. (2002) TATAbinding protein-free TAF-containing complex (TFTC) and p300 are both required for efficient transcriptional activation. J Biol Chem 277: 32875– 32882.

- Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. Trends Genet 19: 321–329.
- Grant PA, Duggan L, Cote J, Roberts SM, Brownell JE, et al. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. Genes Dev 11: 1640–1650.
- Martinez E (2002) Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. Plant Mol Biol 50: 925–947.
- Huisinga KL, Pugh BF (2004) A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell 13: 573–585.
- Sugars KL, Rubinsztein DC (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. Trends Genet 19: 233–238.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. J Neurosci 18: 8936–8946.
- Carter-Dawson LD, LaVail MM (1979) Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. J Comp Neurol 188: 245–262.
- 16. Yvert G, Lindenberg KS, Picaud S, Landwehrmeyer GB, Sahel JA, et al. (2000) Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and transneuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. Hum Mol Genet 9: 2491–2506.
- Helmlinger D, Abou-Sleymane G, Yvert G, Rousseau S, Weber C, et al. (2004) Disease progression despite early loss of polyglutamine protein expression in SCA7 mouse model. J Neurosci 24: 1881–1887.
- Yoo SY, Pennesi ME, Weeber EJ, Xu B, Atkinson R, et al. (2003) SCA7 knockin mice model human SCA7 and reveal gradual accumulation of mutant ataxin-7 in neurons and abnormalities in short-term plasticity. Neuron 37: 383–401.
- McMahon SJ, Pray-Grant MG, Schieltz D, Yates JR 3rd, Grant PA (2005) Polyglutamine-expanded spinocerebellar ataxia-7 protein disrupts normal SAGA and SLIK histone acetyltransferase activity. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 8478–8482.
- Palhan VB, Chen S, Peng GH, Tjernberg A, Gamper AM, et al. (2005) Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 8472–8477.
- Mitton KP, Swain PK, Chen S, Xu S, Zack DJ, et al. (2000) The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. J Biol Chem 275: 29794– 29799.
- Mears AJ, Kondo M, Swain PK, Takada Y, Bush RA, et al. (2001) Nrl is required for rod photoreceptor development. Nat Genet 29: 447–452.
- Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, et al. (1997) Crx, a novel Otxlike paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. Neuron 19: 1017–1030.
- Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL (1997) Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. Cell 91: 531–541.
- Kobayashi M, Takezawa S, Hara K, Yu RT, Umesono Y, et al. (1999) Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 4814–4819.
- Haider NB, Naggert JK, Nishina PM (2001) Excess cone cell proliferation due to lack of a functional NR2E3 causes retinal dysplasia and degeneration in rd7/rd7 mice. Hum Mol Genet 10: 1619–1626.
- Abou-Sleymane G, Chalmel F, Helmlinger D, Lardenois A, Weber C, et al. (2006) Polyglutamine expansion causes neurodegeneration by altering the neuronal differentiation program. Hum Mol Genet: In press.
- Nie Z, Chen S, Kumar R, Zack DJ (1996) RER, an evolutionarily conserved sequence upstream of the rhodopsin gene, has enhancer activity. J Biol Chem 271: 2667–2675.
- Zhang J, Gray J, Wu L, Leone G, Rowan S, et al. (2004) Rb regulates proliferation and rod photoreceptor development in the mouse retina. Nat Genet 36: 351–360.
- Grant PA, Schieltz D, Pray-Grant MG, Steger DJ, Reese JC, et al. (1998) A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. Cell 94: 45–53.
- Brand M, Moggs JG, Oulad-Abdelghani M, Lejeune F, Dilworth FJ, et al. (2001) UV-damaged DNA-binding protein in the TFTC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. EMBO J 20: 3187–3196.
- 32. Bowman AB, Yoo SY, Dantuma NP, Zoghbi HY (2005) Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. Hum Mol Genet 14: 679–691.

- TFTC Deregulation in Rods from SCA7 Mice
- Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, et al. (2000) Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. Hum Mol Genet 9: 1259–1271.
- 34. Luthi-Carter R, Strand AD, Hanson SA, Kooperberg C, Schilling G, et al. (2002) Polyglutamine and transcription: Gene expression changes shared by DRPLA and Huntington's disease mouse models reveal contextindependent effects. Hum Mol Genet 11: 1927–1937.
- Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, et al. (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. J Biol Chem 274: 5895–5900.
- Balasubramanian R, Pray-Grant MG, Selleck W, Grant PA, Tan S (2002) Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. J Biol Chem 277: 7989–7995.
- Hughes RE, Lo RS, Davis C, Strand AD, Neal CL, et al. (2001) Altered transcription in yeast expressing expanded polyglutamine. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 13201–13206.
- Giorgini F, Guidetti P, Nguyen Q, Bennett SC, Muchowski PJ (2005) A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a therapeutic target for Huntington disease. Nat Genet 37: 526–531.
- Helmlinger D, Hardy S, Eberlin A, Devys D, Tora L (2006) Both normal and polyglutamine-expanded ataxin-7 are components of TFTC-type GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. Biochem Soc Symp: In press.
- 40. La Spada AR, Fu YH, Sopher BL, Libby RT, Wang X, et al. (2001) Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. Neuron 31: 913–927.
- 41. Chen S, Peng GH, Wang X, Smith AC, Grote SK, et al. (2004) Interference of Crx-dependent transcription by ataxin-7 involves interaction between the glutamine regions and requires the ataxin-7 carboxy-terminal region for nuclear localization. Hum Mol Genet 13: 53–67.
- Chen D, Belmont AS, Huang S (2004) Upstream binding factor association induces large-scale chromatin decondensation. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 15106–15111.
- Carpenter AE, Memedula S, Plutz MJ, Belmont AS (2005) Common effects of acidic activators on large-scale chromatin structure and transcription. Mol Cell Biol 25: 958–968.
- 44. Chau KY, Munshi N, Keane-Myers A, Cheung-Chau KW, Tai AK, et al. (2000) The architectural transcription factor high mobility group I(Y) participates in photoreceptor-specific gene expression. J Neurosci 20: 7317–7324.
- Munshi N, Agalioti T, Lomvardas S, Merika M, Chen G, et al. (2001) Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation. Science 293: 1133–1136.
- Spector DL, Gasser SM (2003) A molecular dissection of nuclear function. Conference on the dynamic nucleus: Questions and implications. EMBO Rep 4: 18–23.
- Janicki SM, Tsukamoto T, Salghetti SE, Tansey WP, Sachidanandam R, et al. (2004) From silencing to gene expression: Real-time analysis in single cells. Cell 116: 683–698.
- Francastel C, Schubeler D, Martin DI, Groudine M (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. Nat Rev Mol Cell Biol 1: 137–143.
- Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, et al. (2004) Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. Cell 117: 427–439.
- Neophytou C, Vernallis AB, Smith A, Raff MC (1997) Muller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development. Development 124: 2345–2354.
- Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, Losson R (2004) Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): An essential role for progression through differentiation. Genes Dev 18: 2147–2160.
- Cai S, Han HJ, Kohwi-Shigematsu T (2003) Tissue-specific nuclear architecture and gene expression regulated by SATB1. Nat Genet 34: 42– 51.
- Ishii K, Arib G, Lin C, Van Houwe G, Laemmli UK (2002) Chromatin boundaries in budding yeast: The nuclear pore connection. Cell 109: 551– 562.
- Vinciguerra P, Stutz F (2004) mRNA export: An assembly line from genes to nuclear pores. Curr Opin Cell Biol 16: 285–292.
- Wollensak G, Perlman EJ, Green WR (2001) Interphase fluorescence in situ hybridisation of the X and Y chromosomes in the human eye. Br J Ophthalmol 85: 1244–1247.
- Bok D (1993) The retinal pigment epithelium: A versatile partner in vision. J Cell Sci Suppl 17: 189–195.

## Histone H3 tails containing dimethylated lysine and adjacent phosphorylated serine modifications adopt a specific conformation during mitosis

Adrien Eberlin<sup>1</sup>, Cédric Grauffel<sup>2,3,\$</sup>, Mustapha Oulad-Abdelghani<sup>1,\$</sup>, Flavie Robert<sup>1,\$,#</sup>, Danièle Spehner<sup>2</sup>, Lourdes Ponce-Perez<sup>1</sup>, Jean-Marie Würtz<sup>2</sup>, Roland H. Stote<sup>3</sup>, Patrick Schultz<sup>2</sup>, Annick Dejaegere<sup>2</sup> and Laszlo Tora<sup>1</sup>

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), <sup>1</sup>Departement of Transcription, <sup>2</sup>Department of Structural Biology and Genomics; CNRS, UMR7104, Inserm, U596, Université Louis Pasteur, BP 10142 - 67404 ILLKIRCH Cedex, CU de Strasbourg, France; <sup>3</sup>Laboratoire de Biophysicochimie Moléculaire, Institut de Chimie CNRS-ULP LC3-UMR7177, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

<sup>#</sup>Present address: Merck Serono Biotech Center, 1809 Corsier, Switzerland.

<sup>\$</sup> These authors contributed equally to this work.

Running title: Mitotic H3 tails adopt different conformations

**Key words :** chromatin condensation, histone H3, serine 10 phosphorylation, lysine 9 dimethylation, electron microscopy, molecular dynamic simulations.

\* Author to whom correspondence should be addressed.

Phone: 33 388 65 34 44, Fax: 33 388 65 32 01, e-mail: laszlo@igbmc.u-strasbg.fr

#### Abstract

Condensation of chromatin, mediated in part by post-translational modifications of histones, is essential for cell division during mitosis. Histone H3 tails are dimethylated on lysine (Kme2) and become phosphorylated on serine (Sp) residues during mitosis. We have explored the possibility that these double modifications are involved in the establishment of H3 tail conformations during cell cycle. Here we describe a specific chromatin conformation occurring at Kme2 and adjacently phosphorylated S of H3 tails upon a hydrogen-bond formation. This conformation appears exclusively between late prophase and early anaphase, when chromatin condensation is highest. Our data together with results obtained by cryoelectron microscopy suggest that the conformation of Kme2Sp modified H3 tails changes during mitosis. This is supported by biostructural modelization of a modified histone H3 tail bound by an antibody, indicating that Kme2Sp modified H3 tails can adopt at least two different conformations. Thus, the H3K9me2S10p and the H3K27me2S28p sites are involved in the acquisition of specific chromatin conformations during mitosis.

#### [Signalement bibliographique ajouté par : SICD Strasbourg - Département de la Documentation électronique Service des thèses électroniques]

## Histone H3 tails containing dimethylated lysine and adjacent phosphorylated serine modifications adopt a specific conformation during mitosis

Adrien EBERLIN, Cédric GRAUFFEL, Mustapha OULAD-ABDELGHANI, Flavie ROBERT, Danièle SPEHNER, Lourdes PONCE-PEREZ, Jean-Marie WURTZ, Roland H. STOTE, Patrick SCHULTZ, Annick DEJAEGERE and Laszlo TORA

#### Molecular and cellular biology, 2008, 7 janvier

Copyright (c) 2008, American Society for Microbiology and/or the Listed Authors/Institutions. All Rights Reserved.

#### Annexe : pages 3-43 :

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

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01180-07

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services : <u>http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/</u>







#### <u>Résumé</u>

Pour réguler l'expression des gènes de classe II, la cellule peut adopter différentes stratégies. Le contrôle de la transcription de ces gènes semble être l'un des moyens les plus utilisés par la cellule de par sa précocité dans les évènements qui conduisent à la synthèse d'une protéine à partir d'un gène. La régulation de la transcription chez les eucaryotes repose sur deux processus. Le premier fait intervenir des facteurs de transcription impliqués dans l'initiation ou dans l'élongation de la transcription, tandis que le deuxième fait appel au dynamisme de la structure chromatinienne reposant notamment sur des phénomènes épigénétiques.

Les facteurs généraux de transcription (GTFs), nécessaires à l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II, peuvent ainsi être la cible de protéines régulatrices capables de stimuler ou diminuer leur association au niveau du promoteur en complexe de pré-initiation. L'un de ces GTFs, TFIID, est un complexe multiprotéique composé de TBP (pour *TATA Binding Protein*) et de plusieurs TAFs (pour *TBP Associated Factors*). Il a été montré, par l'équipe du Dr TORA, que TAF10 est impliqué dans de nombreux mécanismes tels que la différenciation ou la progression du cycle cellulaire. Par ailleurs, TAF10 fait partie des TAFs qui portent un domaine de type histone. Or, comme les histones, certains TAFs semblent subir diverses modifications post-traductionnelles dont la fonction reste cependant inconnue.

Mon travail a permis de révéler que TAF10 est la cible de plusieurs de ces modifications post-traductionnelles *in vivo* et que leur nature et/ou leur quantité varient suivant l'étape du cycle cellulaire dans laquelle est la cellule et le complexe où se trouve TAF10. En outre, deux sites potentiels de phosphorylation ont pu être identifiés par spectrométrie de masse. Ces données sont un premier pas vers une meilleure compréhension des mécanismes qui dirigent les complexes de transcription vers les promoteurs des gènes à transcrire et qui permettent ainsi une régulation précise de l'expression des gènes.

D'autre part, les modifications post-traductionnelles qui ont lieu sur les histones, unités de base de la chromatine, sont des acteurs essentiels dans les mécanismes qui dirigent le dynamisme de la chromatine nécessaire à la régulation des gènes. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 est ainsi principalement associée à la formation des chromosomes en mitose.

En caractérisant un anticorps spécifique de la mitose, appelé 51TA2H12, nous avons pu identifier, sur certaines régions de la chromatine, une conformation étirée des queues d'histones H3 diméthylées sur la lysine 9 et/ou 27 et phosphorylées sur la sérine 10 et/ou 28 (H3Kme2Sp). Cette conformation est due à la formation d'une liaison hydrogène entre les deux résidus modifiés. De plus, nous avons montré que cette modification conformationnelle est spécifiquement associée à certaines régions de la fibre chromatinienne de 30 nm. Enfin, des résultats préliminaires suggèrent une implication des queues d'histones H3Kme2Sp dans le bon déroulement de la mitose.

L'apparition de telles conformations au niveau des queues d'histones ajoute un degré supplémentaire à la complexité des mécanismes par lesquels les modifications posttraductionnelles des histones régulent l'expression des gènes. Cet évènement pourrait en outre expliquer comment la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 peut intervenir dans deux processus opposés tels que l'activation de la transcription et la condensation de la chromatine.