



PERTURBATION DE LA DYNAMIQUE DE L'HETEROCHROMATINE PARDES LIGANDS SYNTHETIQUES DU PETIT SILLON DE L'ADN

Guillaume Susbielle

► To cite this version:

Guillaume Susbielle. PERTURBATION DE LA DYNAMIQUE DE L'HETEROCHROMATINE PARDES LIGANDS SYNTHETIQUES DU PETIT SILLON DE L'ADN. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2006. Français. NNT : . tel-00107105v2

HAL Id: tel-00107105

<https://theses.hal.science/tel-00107105v2>

Submitted on 23 Mar 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ TOULOUSE III - PAUL SABATIER

U.F.R S.V.T

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ TOULOUSE III - PAUL SABATIER

Discipline : Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue par

Guillaume SUSBIELLE

Le 2 juin 2006 dans la salle de conférence de l'IEFG

Titre :

**PERTURBATION DE LA DYNAMIQUE DE L'HETEROCHROMATINE PAR
DES LIGANDS SYNTHETIQUES DU PETIT SILLON DE L'ADN**

Devant la commission d'examen composée de :

Pr. D. CRIBBS, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse	Président
Dr. C. GIOVANNANGELLI, Directeur de Recherche, MNHN, Paris	Rapporteur
Dr. C. VAURY, Directeur de Recherche, INSERM, Clermont Ferrand	Rapporteur
Dr. H. RICHARD-FOY, Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse	Examineur
Dr. E. KÄS, Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse	Directeur de Thèse

À Louis, mon grand père

À mes parents, ma famille

À Julie, mon amour

REMERCIEMENTS

En premier lieu, un immense merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel au cours des différentes étapes qui ont jalonné ma vie et pour leur amour. À Régis, mon frère et Emilie. À Yvonne ma grand mère, et la mémoire de mon grand père, Louis. À ma famille. À Julie, l'amour de ma vie.....

Je souhaite bien sûr remercier le docteur Emmanuel Käs, my little big boss, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, avoir su apprécier mes quelques qualités et fait abstraction de mes nombreux défauts.

Un grand merci à Caroline Monod PhD pour tout ce qu'elle a fait et ce qu'elle est. Ce fut un grand plaisir de travailler à tes côtés. Thank you for being so nice!

Merci aux membres passé(e)s et actuel(le)s de l'équipe Käs, Roxane, Dorine, Vanessa, Cécile... à proximité desquelles mon chromosome Y a eu la joie d'évoluer.

Merci à mes amis d'ici et d'ailleurs.

Ceux du LBME, de l'IBCG, du CBD, de Toulouse en général qui restent dans mon cœur. Petit Sylvain, Nico, Pat, R1 et Saharah, Brice, Lolotte, Béa et Jérôme, Tof et Simon, Elo et Ele, Coralie, les Schtroumpfs en général, Nelly et dodo Xtian, la clique d'Alpha-T, les lustous et tous ceux qui se reconnaîtront.

Ceux de Bayonne et de Pau qui ne le quitteront jamais. Le Doude à qui je souhaite beaucoup de bonheur avec sa douce, Flan et Marie, Raym's et Lulu, Possum, Goofy et LN, Poulpe, Cell et Marion, Jog et Christelle, Gege et Squale. Sophie, Maïder, Fred et Eric que j'ai eu le plaisir de retrouver.

Aux éternels, Céline et Gauthier, Sonia et sa petite famille.

I. Introduction	1
I.1. Introduction générale	1
I.2. La chromatine	2
I.2.1. Organisation de la particule nucléosomale	2
I.2.2. De la fibre de 10 nm à la fibre de 30 nm	3
I.2.3. Les modifications des histones et le code des histones	4
I.2.3.1 Acétylation	5
I.2.3.2. Méthylation	9
I.2.3.3. Phosphorylation	15
I.2.3.4. Les autres modifications des histones	17
I.2.3.5. Interdépendance des modifications	18
I.2.4. Le remodelage chromatinien	20
I.2.5 Les variants d’histones	22
I.3. L’hétérochromatine	25
I.3.1. Définition	25
I.3.2. Hétérochromatine et Variégation d’effet de position	26
I.3.3. Hétérochromatine péricentrique et variégation de <i>white-mottled</i>	28
I.3.3.1. Les modificateurs de PEV	30
I.3.3.2. Mode d’assemblage de l’hétérochromatine	31
I.3.3.3. D1 et fonction d’initiation	35
I.3.3.4. Les modificateurs synthétiques de PEV	36

I.3.3.4.1. MATH20	36
I.3.3.4.2. Polyamides	38
I.4. Les topoïsomérase	40
I.4.1. Généralités	40
I.4.2. Topoïsomérase de type II	41
I.4.2.1. Mode d'action	43
I.4.2.2. Structure de la topoïsomérase II eucaryote	44
I.4.2.3. Outils d'étude de la topoïsomérase II	45
I.4.2.4. La topoïsomérase II comme cible thérapeutique	48
II. Résultats	50
II.1. Vers un nouvel outil d'étude de l'hétérochromatine	50
II.1.1. Introduction bibliographique	50
II.1.2. Résultats préliminaires	51
II.1.3. Perspectives	52
II.2. Perturbation de l'hétérochromatine : approche pharmacologique	53
II.2.1. Introduction bibliographique	53
II.2.2. Résultats	53
III. Discussion	59
IV. Conclusion	69
V. Matériel et méthodes	
Références bibliographiques	

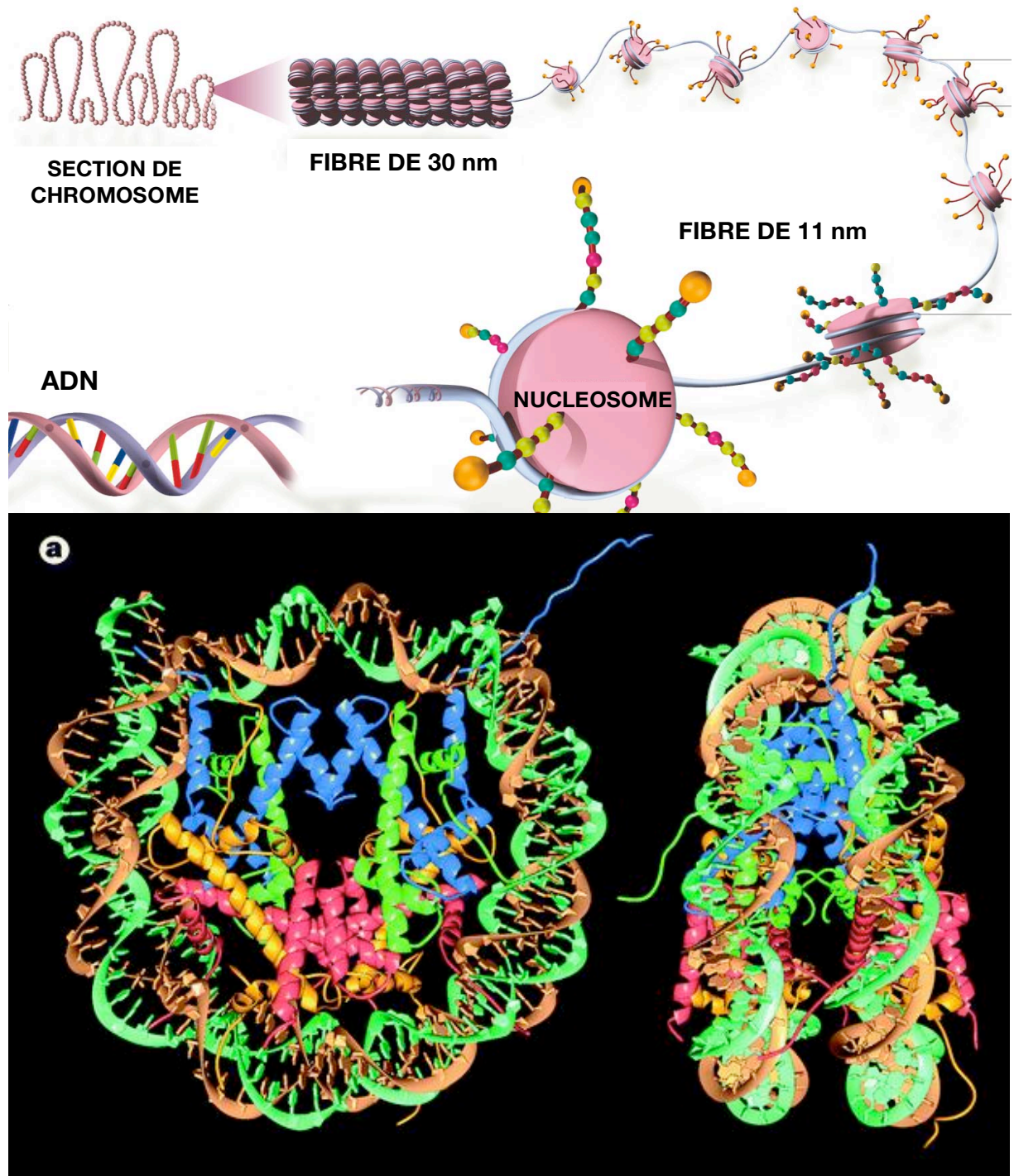


Figure 1 : Compaction de la chromatine dans le noyau des cellules eucaryotes

En haut, les différents niveaux de condensation de la fibre d'ADN chez les eucaryotes supérieurs, de la double hélice d'ADN nue au segment de chromosome sont représentés. L'ADN s'enroule autour d'un octamère d'histones pour former le nucléosome, particule fondamentale de la chromatine dont le premier niveau de compaction sont la fibre de 11 nm aussi appelée « collier de perles ».

En bas, représentation schématique de la structure du nucléosome déduite des données de diffraction aux rayons X à une résolution de 2,8 Å (D'après Luger 1997) (code couleur : H2A jaune, H2B rouge, H3 bleue, et H4 vert) les brins de la double hélice d'ADN sont représentés en vert et or.

I. Introduction

I.1. Introduction générale

Chez les métazoaires, l'apparent paradoxe de l'unicité du génome face à la diversité des destins cellulaires suggère l'existence d'informations dont le support n'est pas la séquence de la molécule d'ADN. Une telle information doit à la fois permettre une réponse adaptée aux facteurs environnants et aux facteurs de croissance mais de surcroît, elle doit être transmissible *i.e.* maintenue au cours des mitoses afin d'assurer une mémoire cellulaire une fois le processus de différenciation cellulaire initié.

L'évolution des génomes eucaryotes s'est accompagnée de deux événements majeurs: l'augmentation de la quantité d'ADN qui a permis l'émergence de nouvelles fonctions cellulaires et le confinement de cette masse croissante de matériel génétique dans un espace restreint, le noyau. Ce dernier point nécessite un degré très élevé de compaction (jusqu'à 10 000 fois) des molécules d'ADN. Un tel degré de compaction est assuré chez les eucaryotes par l'association de l'ADN à de nombreuses protéines pour former une structure appelée chromatine. Du fait de cette fonction de compaction, la chromatine limite l'accès au message génétique et possède donc une nature répressive intrinsèque. La structure de la chromatine nécessite donc un niveau très fin de régulation afin d'assurer l'accessibilité de la double hélice d'ADN aux machineries moléculaires effectrices des processus cellulaires essentiels que sont la transcription, la réplication, la recombinaison et la réparation.

Si l'information génétique repose sur la séquence, autrement dit, l'enchaînement des paires de bases dans la molécule d'ADN, une information qui n'est pas contenue dans cette séquence ne peut être qualifiée de génétique. Cette information épigénétique, bien qu'héritable, n'a pas un mode de transmission strictement mendélien et les déterminants de ce type d'information exercent leur fonction par la régulation de l'organisation chromatinienne dans le noyau.

Dans la section suivante, nous présenterons ces déterminants et nous attarderons sur la fonction particulière des protéines histones dans le contrôle de la structure de la chromatine et leur influence sur l'expression génique.

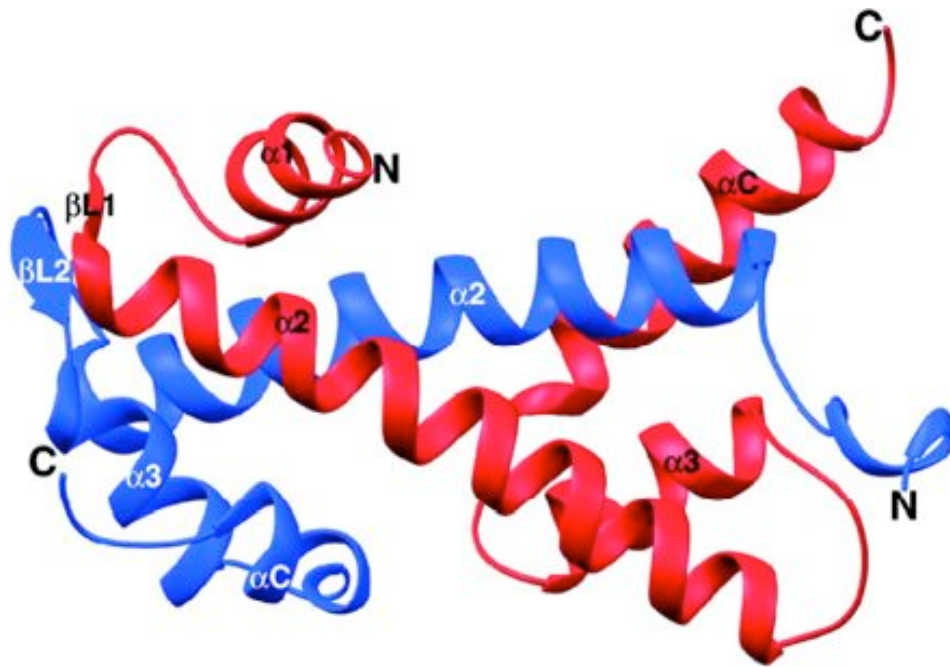


Figure 2 : Représentation schématique de l'interaction dite « en poignée de mains » (Handshake Interaction) entre deux domaines Histone Fold. Ce type de repliement en domaine Histone Fold est adopté par la partie structurée des histones de la particule nucléosomale et de l'histone linker H1. L'interaction en poignée de mains permet l'association des multimères d'histones au sein du nucléosome et est donc impliquée dans la formation de l'octamère d'histones

I.2. La chromatine

I.2.1. Organisation de la particule nucléosomale

Le premier niveau d'organisation de la fibre d'ADN dans le noyau des cellules eucaryotes repose sur son empaquetage sous forme de nucléosomes. C'est en 1974 que Kornberg et Thomas proposent que le nucléosome constitue l'unité de base de la chromatine (Kornberg 1974; Kornberg and Thomas 1974). Ils décrivent cette particule dont le cœur est constitué par un octamère d'histones autour duquel s'enroule un segment d'ADN de 147 paires de bases (pb) (Voir figure 1). Cet octamère d'histones est lui-même assemblé à partir de deux copies de chacune des histones nucléosomales H2A, H2B, H3 et H4 (Luger, Mader et al. 1997). Selon le modèle communément admis, les histones produites en phase S sous le contrôle du système E2F/Rb sont assemblées en nucléosomes au cours de la réplication selon un mode séquentiel. L'hétérotétramère (H3-H4)₂ s'associe tout d'abord à l'ADN et cette association est suivie par la déposition des deux hétérodimères H2A-H2B (Wilhelm, Wilhelm et al. 1978; Smith and Stillman 1991). Nous verrons plus tard comment l'expression et l'incorporation dans la chromatine, en dehors de la phase S, de variants d'histones jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires.

Les interactions hétérodimériques entre histones nucléosomales reposent sur le motif protéique Histone Fold Domain (HFD) (Arents and Moudrianakis 1995) qui permet des interactions dites « en poignée de main » (Voir figure 2). Le contact entre les histones du cœur nucléosomal et l'ADN repose essentiellement sur des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes entre les histones localement chargées positivement et le squelette phosphodiester de l'ADN. Ce mode d'interaction explique l'absence de spécificité de séquence des nucléosomes. Néanmoins, si les nucléosomes peuvent s'assembler sur virtuellement n'importe quelle séquence d'ADN, la composition nucléotidique influence directement le positionnement du nucléosome (Travers and Klug 1987; Sivolob and Khrapunov 1995; Fitzgerald and Anderson 1999). Outre le domaine HFD d'hétérodimérisation formant leur cœur globulaire hautement structuré, les histones nucléosomales arborent à leurs extrémités amino-terminales (et également carboxy-terminales pour les histones H2A et H2B) des domaines libres non structurés. Comme nous le verrons plus loin, ces extrémités flexibles hautement basiques (particulièrement

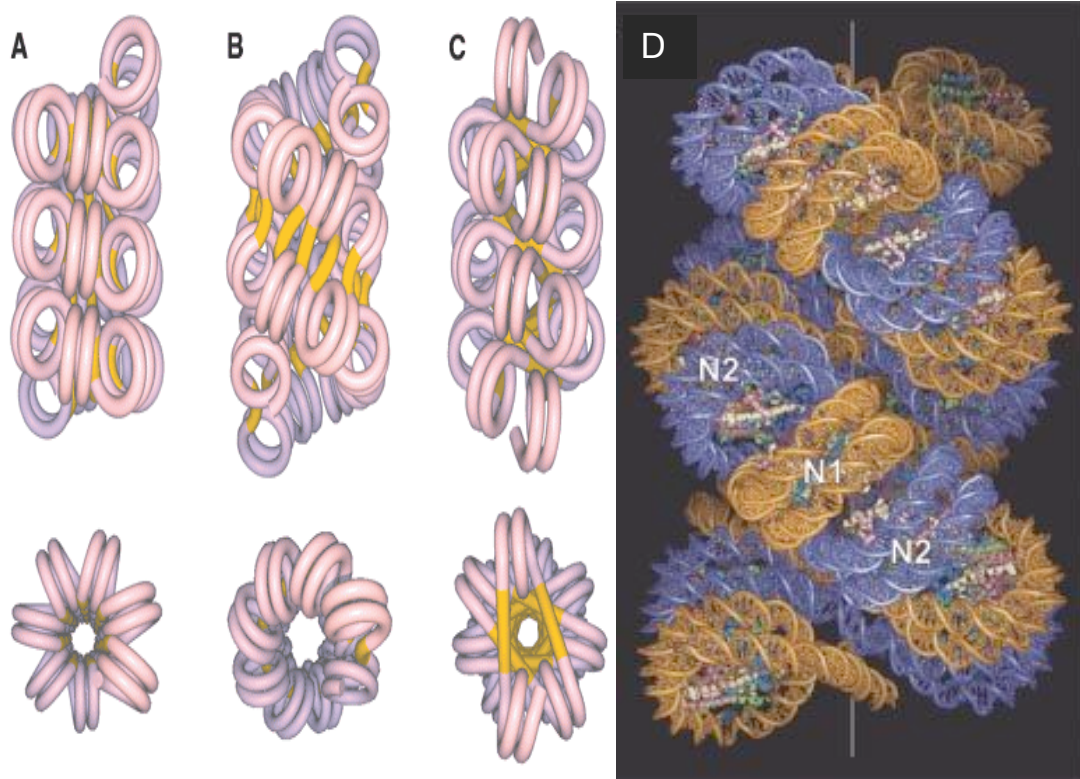


Figure 3 : Repliement de l'ADN dans la fibre de chromatine de 30 nm

Partie gauche : trois modèles de repliement de l'ADN dans la fibre de chromatine de 30 nm en vue latérale (en haut, l'axe de la fibre est vertical) et selon l'axe de la fibre (en bas). Le modèle du solénoïde (A), longtemps privilégié ne semble plus rendre compte des plus récentes observations et a été abandonné au profit d'un modèle en double hélice (B et C) qui seraient soit surenroulées (B) soit entrelacées (C) selon que l'ADN linker (en jaune) traverse (C) ou non (B) le centre de la fibre. L'ADN nucléosomal est représenté en rose.

Partie droite (D): modèle de repliement de la fibre de 30 nm basé sur les données cristallographiques de la structure d'un tétranucléosome à une résolution de 9Å favorise le modèle entrelacé (modèle zig-zag).

Images tirées de (Dorigo, Schalch et al. 2004; Schalch, Duda et al. 2005) (parties gauche et droite respectivement).

les extrémités amino-terminales) sont le substrat de nombreuses enzymes générant des modifications post-traductionnelles qui jouent une fonction clé dans le contrôle de la structure de l'hétérochromatine (pour revue [\(Peterson and Laniel 2004\)](#)).

I.2.2. De la fibre de 11 nm à la fibre de 30 nm

Les nucléosomes sont connectés entre eux par L'ADN linker, de taille variable, pour former la fibre de chromatine de 11 nm dont la structure fût comparée à un collier de perles [\(Olins and Olins 1974\)](#). Cet ADN linker est le plus souvent associé à une cinquième protéine histone, l'histone H1 également appelée histone linker. Ces histones stabilisent le niveau supérieur de compaction de la chromatine qu'est la fibre de 30 nm [\(Thomas 1999\)](#) et modulent la distance entre les nucléosomes [\(Koop, Di Croce et al. 2003; Fan, Zhang et al. 2005\)](#). Bien que les régions de chromatine actives en transcription soient relativement plus pauvres en histone H1 que les régions transcriptionnellement inactives [\(Zlatanova, Caiafa et al. 2000\)](#), les études récentes menées sur divers organismes eucaryotes mutés pour les gènes codant H1 ne confirment pas le rôle de répresseur global de la transcription longtemps prêté à ces protéines [\(Shen and Gorovsky 1996; Hellauer, Si-rard et al. 2001; Fan, Zhang et al. 2005\)](#). Ces études suggèrent plutôt un rôle d'H1 dans le contrôle fin de gènes ou de classes de gènes spécifiques, comme les gènes H19 et Igf2 soumis à l'empreinte parentale chez la souris [\(Fan, Zhang et al. 2005\)](#). H1 pourrait même dans certains cas jouer un rôle positif sur l'activation de la transcription comme cela a été montré pour la transcription hormono-dépendante du virus MMTV [\(Vicent, Koop et al. 2002; Koop, Di Croce et al. 2003\)](#).

La structure de la fibre de 30 nm a longtemps été sujette à polémique, plusieurs modèles ayant été proposés ([voir figure 3](#)). La récente élucidation de la structure cristallographique d'un tétranucléosome à une résolution de 9 Å par l'équipe de Richmond - à qui l'on devait déjà les résolutions de la structure du nucléosome à 7 Å [\(Richmond, Finch et al. 1984\)](#), 2,8 Å [\(Luger, Mader et al. 1997\)](#) et 1,9 Å [\(Davey, Sargent et al. 2002\)](#), a apporté un argument capital en faveur du modèle en zig-zag (double hélice entrelacée) de la fibre de chromatine de 30 nm [\(Dorigo, Schalch et al. 2004; Schalch, Duda et al. 2005\)](#). Ces travaux risquent ainsi de mettre fin à la polémique entre partisans du modèle de solénoïde initialement proposé par Finch [\(Finch and Klug 1976\)](#) et ceux des différents modèles de la double-hélice surenroulée ou entrelacée (zig-zag). Les études les plus récen-

tes, qu'elles soient basées sur des approches expérimentales (Rydberg, Holley et al. 1998; Cui and Bustamante 2000), qu'il s'agisse d'observations en microscopie électronique (Bednar, Horowitz et al. 1998) ou de modélisation informatique (Woodcock, Grigoryev et al. 1993; Katritch, Bustamante et al. 2000) semblaient d'ailleurs favoriser ce dernier (Voir figure 3).

Le travail de Dorigo *et al.* a par ailleurs permis de démontrer que les extrémités amino-terminales des histones (à l'exception de la base de celle de H4) jouaient un rôle mineur dans ce niveau d'organisation (Dorigo, Schalch et al. 2003). En effet, des histones recombinantes dépourvues de leur extrémité flexible (sauf pour les résidus 14 à 19 de l'histone H4), maintiennent leur potentiel à générer, en présence de sels et en l'absence de H1, une structure compacte de type fibre de 30 nm. En revanche, la délétion des acides aminés 14 à 19 de H4 abolit totalement la compaction du faisceau de nucléosomes confirmant le rôle essentiel de ces résidus dans ce processus, rôle déjà mis en avant par une précédente étude (Luger, Mader et al. 1997). Les auteurs montrent également dans cette étude que l'introduction d'un pont disulfure entre la base de l'extrémité amino-terminale de H4 et les domaines globulaires de H2A provoque une stabilisation du réseau compact de nucléosomes (Dorigo, Schalch et al. 2004).

I.2.3. Les modifications des histones et le code des histones

Les extrémités amino-terminales libres et non-structurées des histones arborent des modifications de différentes natures qui influencent les propriétés structurales de la chromatine et ont un impact direct sur son niveau de condensation. La nature réversible de ces modifications (Waterborg 2002; Lam, Pazin et al. 2005) permet un contrôle de l'expression génique ainsi qu'un découpage du génome en domaines fonctionnels. Parce que ces différentes modifications corrélerent avec différents états transcriptionnels, l'hypothèse d'un « code des histones » a ainsi été proposée (Strahl and Allis 2000; Turner 2000; Jenuwein and Allis 2001; Fischle, Wang et al. 2003). Selon cette hypothèse, les différentes combinaisons de modifications des histones attribuent une identité à chaque nucléosome et sont lues dans la cellule comme des « codes barres » moléculaires par des machineries capables de générer des états spécifiques de la chromatine. Une telle théorie d'un code des histones suppose l'existence, à la fois de protéines ou complexes protéiques capables d'opérer ces modifications post-traductionnelles des histones mais

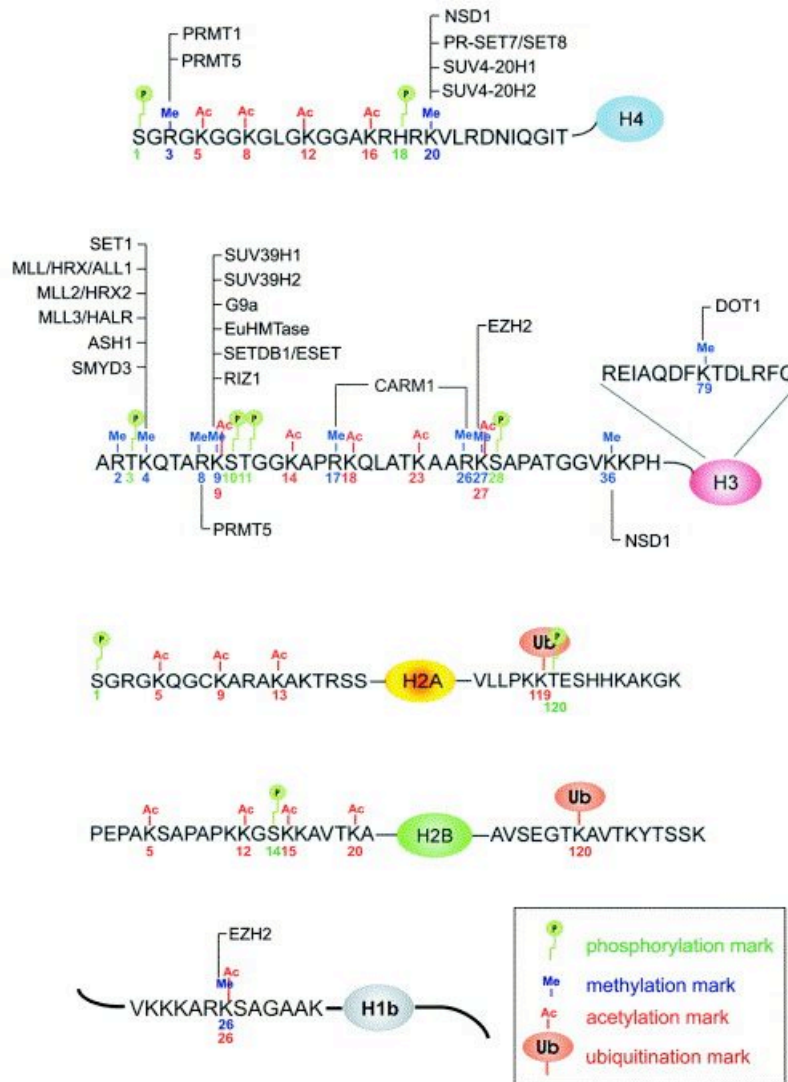


Figure 4 : Principales modifications post-traductionnelles des histones canoniques et Histones méthyltransférases

Les lysines des histones peuvent être la cible d'acétylations, de méthylations (mono-, di- et tri-) et d'ubiquitination. Les résidus arginine peuvent également être méthylés (mono-, diméthylation symétrique ou asymétrique) et enfin certaines sérines et thréonines sont phosphorylées. Dans certains cas, ces modifications peuvent être réalisées par plusieurs enzymes comme dans le cas de la méthylation d'H3K4 ou H3K9 Image tirée de (Margueron 2005).

Pour la nomenclature des acides aminés des histones se reporter à l'annexe 1

aussi de machineries capables de déchiffrer ce langage (de la Cruz, Lois et al. 2005; Yang 2005). Nous détaillerons dans le chapitre suivant les différentes découvertes qui ont conduit à ce nouveau paradigme du code des histones, de l'identification des différentes modifications et de leur rôle dans le contrôle de l'expression génique à la caractérisation des facteurs protéiques intervenant dans la lecture et/ou l'écriture de ce code.

Les principales modifications post-traductionnelles des histones sont l'acétylation des résidus lysines (K) (Alfrey, Faulkner et al. 1964; Brownell and Allis 1996), la mono-, di- ou tri-méthylation des lysines (Rea, Eisenhaber et al. 2000; Lachner and Jenuwein 2002; Lachner, O'Sullivan et al. 2003), la mono-méthylation et la di-méthylation symétrique ou asymétrique des arginines (R) (Lee, Cook et al. 2005; Wysocka, Allis et al. 2006), la phosphorylation des sérines (S) et des thréonines (T) (Paulson and Taylor 1982; Nowak and Corces 2004), la biotinylation (Camporeale, Shubert et al. 2004; Chew, Camporeale et al. 2005; Kothapalli, Camporeale et al. 2005), l'ubiquitination et la sumoylation des lysines (Levinger and Varshavsky 1982; Gill 2004; Osley 2004), la citrullination (déimination) des arginines (Wang, Wysocka et al. 2004; Yang 2005) et enfin la mono (ADP-rybosyl)ation des résidus arginines ou glutamates (E) (Burzio, Riquelme et al. 1979; Jump, Butt et al. 1979; Kreimeyer, Wielckens et al. 1984).

On retrouvera dans la figure 4 une représentation schématique des différentes modifications des histones les mieux caractérisées donnant un aperçu de la complexité de ce code ainsi que de la diversité des acteurs de sa mise en place.

I.2.3.1. Acétylation

La corrélation entre acétylation des histones et activité transcriptionnelle a été proposée il y a plus de 40 ans (Alfrey, Faulkner et al. 1964) et confirmée expérimentalement dès la fin des années 80 par les travaux de Hebbes sur les érythrocytes de poulet (Hebbes, Thorne et al. 1988). Initialement, on imputait à ces acétylations une fonction dans le contrôle de la charge globale des histones et donc dans le contrôle de l'affinité relative de l'ADN pour les histones. L'ADN étant chargé négativement, la neutralisation des charges de l'ADN par les charges positives des résidus lysines des histones assure la stabilité de l'interaction ADN-octamère d'histones dans le nucléosome (Travers and Thompson 2004). La neutralisation par des groupements acétyls des charges positives des histones provoque une diminution du nombre d'interactions électrostatiques entre

Position		Acétyltransférase	Complexe	Fonction
H3	K9	SRC-1		
	K14	Gcn5 (a) PCAF (Hs, Mm) Hpa2 (Sc, Sp) TAF _{II} 230 (a) SRC-1 (Hs, Mm) p300/CBP (b) Elp3p (a)	yADA/SAGA/hGCN5/TFTC hPCAF TFIID Elongator/RNapolII holo	Coactivation (adaptateur) Coactivation Associé à TBP Coactivation Elongation du transcrit
	K18	p300/CBP		
	K23			Répression subtelomérique
H4	K5	Esa1 (Sc, Sp) p300/CBP	NuA4	Progression du cycle
	K8	p300/CBP Elp3p	Elongator/RNapolII holo	Elongation du transcrit
	K12	Hat1 (a) Gcn5 * PCAF *	yHAT-B/yHAT-A3	Déposition des histones
	K16	MOF (Dm) Gcn5 *	MSL	Compensation de dose
H2A	K5	p300/CBP		
	K7	Esa1 ?		
	K9	Esa1 ?		
H2B	K5	Esa1 ?		
	K12	p300/CBP		
	K15	p300/CBP		
	K20	Esa 1 ?		

Tableau des acétylations in vitro preferences taf ii 230 homologue drosophile de taf II 250

* site spécifique mais mineur de sterner berger MMBR 2000

(a) de la levure à l'homme (b) métazoaires

l'ADN et les histones et favorise donc le déplacement ou le désassemblage des nucléosomes, processus essentiel à l'activation transcriptionnelle. Dans les années 1990, la démonstration fut faite que l'acétylation des histones inhibait la compaction de la chromatine ([Ridsdale, Hendzel et al. 1990](#)) et levait la répression transcriptionnelle du 5S RNA en facilitant directement sa reconnaissance par le facteur de transcription TFIIIA ([Lee, Hayes et al. 1993](#)). L'hypothèse alors proposée était que les extrémités amino-terminales des histones, par leur interaction avec l'ADN linker, en limitaient l'accès aux facteurs de transcription. Le glissement des nucléosomes dans un cas et le dévoilement des séquences internucléosomales dans le deuxième cas rendaient ainsi compte de l'activation transcriptionnelle par la facilitation de l'accès des facteurs de transcription et des ARN polymérases aux séquences d'initiation de la transcription. Dans cette vision, les changements de la structure des nucléosomes provoqués par l'acétylation des histones reposent sur la modification de la charge globale des histones et font intervenir la notion d'empêchement stérique.

Alternativement, l'acétylation des histones a aussi été envisagée comme un signal permettant le recrutement spécifique de facteurs ou complexes protéiques. Selon ce principe, l'ajout d'un groupement acétyl sur un résidu lysine d'une extrémité amino-terminale d'une histone crée une nouvelle surface permettant l'interaction biochimique avec un module protéique. L'acétylation agirait donc par un mécanisme de gain de fonction. Nous verrons que cette seconde hypothèse, généralisée depuis à l'ensemble des modifications des histones, a donné naissance à la théorie du code des histones ([Strahl and Allis 2000](#)). L'existence d'un tel code étend ainsi considérablement le potentiel informatif de la cellule en définissant l'état transcriptionnel de domaines chromatinien.

L'existence d'un code ou d'un langage moléculaire présupposant l'existence à la fois de facteurs capables d'écrire ce code et de facteurs capables de le lire, l'identification ces dernières années de nombreuses protéines appartenant à l'une ou l'autre de ces catégories a confirmé cette théorie (pour revue ([Bottomley 2004](#))).

Dans le cas de l'acétylation, les enzymes responsables de l'écriture du code, *i.e.* l'ajout d'un groupe acétyl sur la chaîne latérale des lysines, sont appelées histones acétyltransférases (HAT) et les enzymes possédant l'activité inverse, *i.e.* l'enlèvement de ce groupement acétyl, sont nommées histones désacétylases (HDAC) ([voir tableau](#)). La tra-

duction du code est, quant à elle, assurée par des facteurs capables de reconnaître spécifiquement une marque épigénétique ([Jenuwein and Allis 2001](#)), dans le cas de l'acétylation, via le bromodomaine (voir ci-dessous).

Les histones acétyltransférases :

Les histones acétyltransférases catalysent le transfert d'un groupement acétyl de l'acétyl-coA vers le groupement ϵ -amine des lysines de l'extrémité amino-terminale des histones ([Yang 2004](#)). On les classe en deux superfamilles celles des GNAT et celle des MYST auxquelles s'ajoutent, chez les eucaryotes supérieurs, les protéines p300/CBP.

La superfamille GNAT (Gcn5 related N-acetyltransferase) est à l'heure actuelle la mieux connue. On y retrouve les protéines Gcn5 et PCAF (p300/CREB-binding protein associated factor) initialement identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae* ([Georgakopoulos and Thireos 1992](#)) et dont il existe des homologues à la fois chez l'humain ([Candau, Moore et al. 1996](#)), la souris ([Xu, Edmondson et al. 1998](#)), la drosophile ([Smith, Belote et al. 1998](#)), *Arabidopsis thaliana* et *Toxoplasma gondii* ([Hettmann and Soldati 1999](#)). Cette conservation dans tout le règne eucaryote suggère l'importance fonctionnelle de ces protéines. Les membres de cette famille sont impliqués dans l'élongation de la transcription (Elp3), dans la déposition des histones pour la réparation des dommages à l'ADN (Hat1 ([Ruiz-Garcia, Sendra et al. 1998](#); [Qin and Parthun 2002](#)) ou encore en tant que coactivateurs de la transcription (pour revue ([Verdone, Caserta et al. 2005](#)).

Les protéines p300 et CBP constituent une famille à part entière d'histone acétyltransférases ([Bannister and Kouzarides 1996](#); [Chan and La Thangue 2001](#)). Elles sont, du fait de leur forte homologie, bien souvent considérées comme une seule entité. P300/CBP sont des coactivateurs généraux de la transcription qui interviennent dans le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose ([Verdone, Caserta et al. 2005](#)).

La famille MYST pour MOZ, Tbf2/Sas3, Sas2 et Tip60 (les premiers membres caractérisés) est une large famille hautement conservée ([Utley and Cote 2003](#)) qui comprend notamment Esa1 chez la levure, MOF chez la drosophile et HBO1 et MORF chez l'homme. Les histones acétyltransférases de cette famille sont impliquées dans des processus aussi variés que l'activation de la transcription (Tip60, Esa1, Sas2, MOZ, MORF) ([Yamamoto and Horikoshi 1997](#)), la réparation de l'ADN ou l'apoptose (Tip60, Esa1)

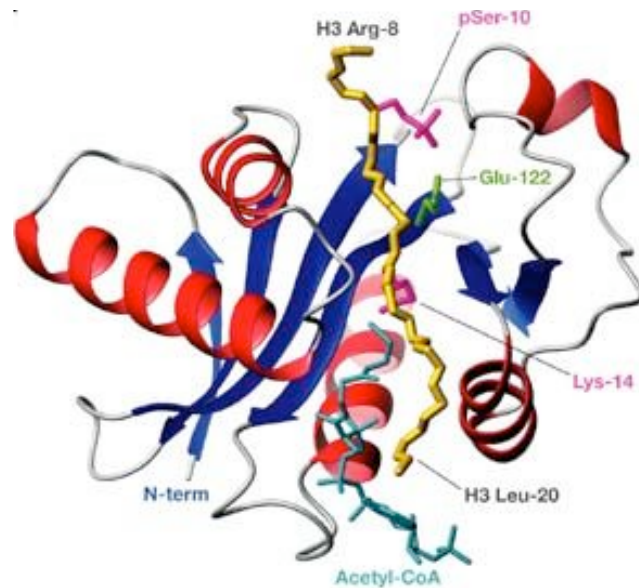


Figure 5 : Représentation schématique de la structure du domaine histone acétyl transférase (HAT) de l'enzyme tGCN5 de *Tetrahymena* lié au cofacteur acétyl-coA (cyan) et à un peptide correspondant aux résidus 8 à 20 de l'extrémité aminoterminal de l'histone H3 (squelette couleur or, chaîne latérale de H3S10ph et H3K14 en magenta). Le glutamate du site catalytique de tGCN5 est en vert.

Image tirée de (Bottomley 2004). Code PDB : 1PUA

Pour la nomenclature des acides aminés des histones et de leur modifications, se reporter à l'annexe 1
Les hélices alpha sont représentées par des rubans rouge les feuillets beta par des flèches bleus et les boucles par des lignes grises.

(Sheridan, Force et al. 2001), la compensation de dose chez la drosophile (MOF), le contrôle de la propagation de l'hétérochromatine (Sas2) ou la réplication de l'ADN (HBO1) (Burke, Cook et al. 2001).

Les analyses structurales réalisées sur le domaine catalytique des HAT ont permis de définir certaines propriétés structurales conservées parmi ces protéines (Clements and Marmorstein 2003). Le centre de ce motif est composé de trois feuillets β antiparallèles, d'une hélice α et d'une boucle β et est entouré de chaque côté par un motif hélice- α -boucle variable qui déterminerait la spécificité de substrat (Marmorstein 2001; Marmorstein and Roth 2001). (voir figure 5)

La plupart des HAT fonctionnent au sein de complexes multiprotéiques (Yang 2004). Les facteurs associés semblant contrôler leur spécificité de substrat et augmenter leur activité catalytique (Grant, Duggan et al. 1997; Ogryzko, Kotani et al. 1998; Boudreault, Cronier et al. 2003) leur permettant d'agir dans le contexte du nucléosome et de la chromatine. Ces complexes protéiques sont par ailleurs conservés de la levure à l'homme comme l'illustre la conservation des protéines constituant le complexe PCAF chez l'homme et le complexe SAGA chez la levure (Sternier and Berger 2000).

Les histones désacétylases :

On distingue trois familles d'histones désacétylases fondées par homologie avec les trois principales histones désacétylases de levure (pour revue (Khochbin and Kao 2001)). L'intérêt grandissant pour ces enzymes s'explique notamment par le fait qu'elles sont devenues de nouvelles cibles pour les thérapies anticancéreuses (Kouraklis and Theocharis 2006; Lin, Chen et al. 2006) comme l'illustre l'effet potentiateur de l'adjonction d'acide valproïque (inhibiteur des HDAC) sur l'activité antitumorale des inhibiteurs de la topoïsomérase II chez la souris (Marchion, Bicaku et al. 2005).

Le type I est basé sur son homologie avec la protéine Rpd3 alors que le type II est défini par son homologie avec l'enzyme Hda1. Le type III regroupe quant à lui les homologues de Sir2 (Blander and Guarente 2004). À l'inverse des deux premiers groupes d'histone désacétylases, le type III n'est pas sensible à la trichostatine A (un inhibiteur des HDAC de type I et II) et son activité catalytique est dépendante de la présence du co-facteur NAD⁺. Tout comme les histones acetyltransférases, les histones désacétylases

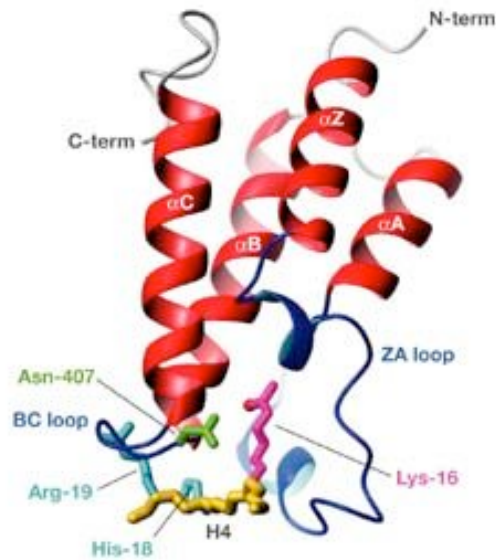


Figure 6 : Représentation schématique de la structure du bromodomaine de GCN5 lié à un peptide correspondant aux résidus 15 à 19 de l'extrémité aminoterminal de l'histone H4 (squelette couleur or, chaîne latérale de H4K16ac en magenta). L'asparagine en position 407 de GCN5 (Asn407 en vert) forme une liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène du groupement acétyl de H4K16ac. Les résidus histidine et arginine en position +2 et +3 de H4K16 ac interviennent dans la spécificité de substrat de GCN5.

Image tirée de (Bottomley 2004). Code PDB : 1E6I

Pour la nomenclature des acides aminés des histones et de leur modifications, se reporter à l'annexe 1

Pour le code couleur prière de se reporter à la légende de la figure 5.

agissent au sein de complexes. Ainsi, la protéine Sir2 forme avec les protéines Sir1, Sir3 et Sir4 un complexe intervenant dans la mise en silence (*silencing*) du locus de détermination sexuelle et des télomères chez la levure. Ces complexes ainsi que leur fonction sont conservés chez les eucaryotes (Chopra and Mishra 2005).

Les protéines à bromodomaine :

Le bromodomaine (Loyola and Almouzni 2004) fût le premier module de lecture des marques épigénétiques des histones identifié (Dhalluin, Carlson et al. 1999). D'une taille d'environ 110 acides aminés, il est capable de s'associer spécifiquement avec les formes acétylées de la lysine non seulement sur les histones mais aussi sur un grand nombre de protéines non histones (Zeng and Zhou 2002). Parmi les protéines qui contiennent un bromodomaine, un grand nombre correspond à des activateurs ou coactivateurs transcriptionnels dont le recrutement sur la chromatine provoquerait l'*antisilencing* (levée de répression) des séquences ciblées (Ladurner, Inouye et al. 2003). La structure du bromodomaine et son mode de reconnaissance des lysines acétylées sont aujourd'hui bien caractérisés (Owen, Ornaghi et al. 2000), ce dernier reposant majoritairement sur des contacts hydrophobes entre la lysine acétylée et les acides aminés formant la poche hydrophobe du bromodomaine. (voir figure 6)

I.2.3.2. Méthylation

Contrairement à l'acétylation qui est une marque des régions potentiellement actives en transcription, la méthylation n'est pas directement corrélée à un type fonctionnel de chromatine, l'influence de la méthylation sur le potentiel transcriptionnel d'un domaine chromatinien dépendant avant tout du résidu modifié.

Les enzymes responsables de ces modifications sont appelées histones méthyltransférases et sont porteuses du domaine catalytique SET (voir figure 7) qui tire son nom des premières enzymes de ce type (Su(var)3-9, E(z) et Trithorax), toutes trois identifiées chez la drosophile. La structure de ce domaine d'environ 130 acides aminés a été déterminée pour de nombreuses HMT et a révélé une organisation modulaire (Xiao, Jing et al. 2003). Le groupement méthyle transféré sur les histones est fourni par la S-adenosylméthionine (SAM ou AdoMet), le donneur universel de méthyle également utilisé par les enzymes responsables de la méthylation des 2'-O-ribose et de la méthylation de

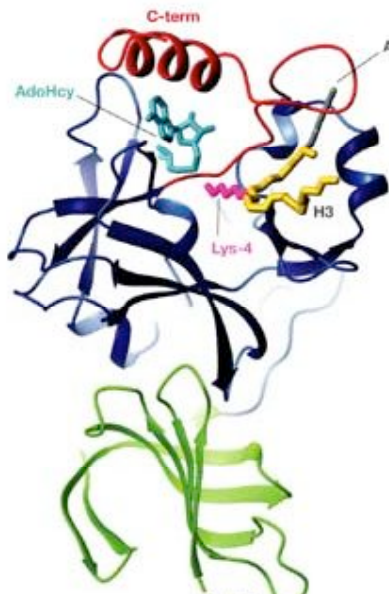


Figure 7 : Représentation schématique de la structure du domaine histone méthyltransférase de l'enzyme SET7/9 lié au cofacteur AdoHcy (cyan) et à un peptide correspondant aux résidus 2 à 9 de l'histone H3 (squelette couleur or, chaîne latérale de H3K4me en magenta et domaine SET en bleu. Les domaines amino-terminal et carboxy-terminal de SET7/9 sont respectivement représentés en vert et rouge. L'arginine 2 de H3 intervient dans la spécificité de SET7/9

Image tirée de (Bottomley 2004). Code PDB : 1OS9
Pour la nomenclature des acides aminés des histones et de leur modifications, se reporter à l'annexe 1

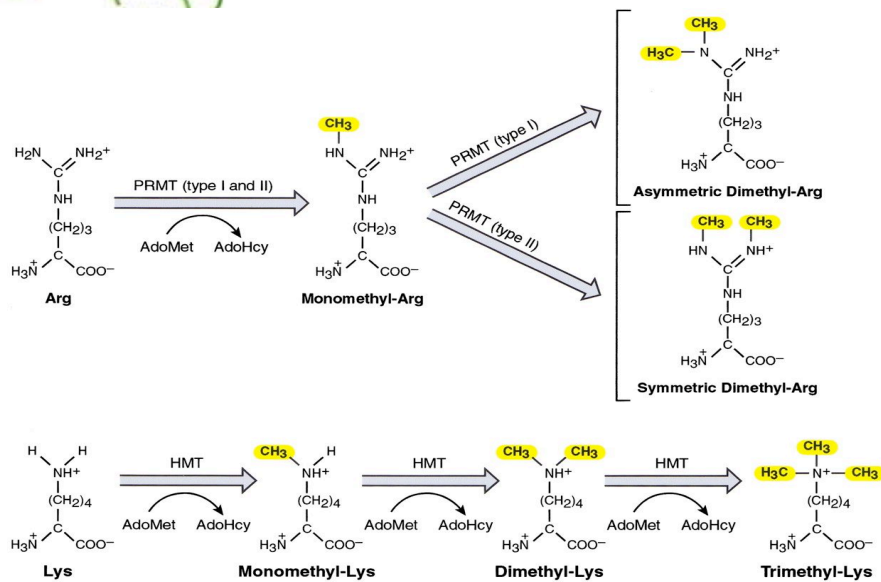


Figure 8 : Voies de méthylations des résidus lysines et arginines

En haut, en présence de S-Adénosyl Méthionine (AdoMet), les arginines (Arg) sont monométhylées par des méthyltransférases spécifiques des arginines (PRMT). Les diméthylations asymétrique et symétrique des résidus monométhylés sont catalysées par les PRMT de type I et II respectivement.

En bas, les lysines (Lys) peuvent être mono-, di- ou triméthylées par des histones méthyltransférases (HMT).

Image tirée de (Zhang et Reinberg 2001).

l'ADN. Les études structurales du domaine SET ont révélé que la spécificité des HMT (le niveau de méthylation qu'elles étaient en mesure de réaliser) dépendait en grande partie des résidus aromatiques présents dans le site catalytique des méthyltransférases. On sait, par exemple, que les seules caractéristiques stériques du domaine SET suffisent à expliquer que l'activité catalytique de l'enzyme SET7/9 se limite à la monométhylation de la lysine 4 de l'histone H3 alors que DIM-5 ([Zhang, Tamaru et al. 2002](#)) est capable de réaliser des di- et tri-méthylation de la lysine 9 de H3. L'introduction de mutations ponctuelles dans le site catalytique permet de modifier entièrement la spécificité enzymatique d'une HMT comme le prouvent remarquablement les travaux d'ingénierie protéique réalisées par les équipes de Cheung et Gamblin ([Xiao, Jing et al. 2003](#); [Zhang, Yang et al. 2003](#))

La méthylation des lysines peut être de trois natures : les lysines peuvent être mono-, di- ou tri- méthylées alors que les arginines (R) sont soit mono-méthylées soit diméthylées. Dans ce cas, la diméthylation des arginines peut être symétrique ou asymétrique ([Zhang and Reinberg 2001](#); [Kouzarides 2002](#)) ([Voir figure 8](#)).

Les multiples possibilités offertes par les différents niveaux de méthylation ajoutent à la complexité du code des histones. En effet, si la méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 est une marque de la chromatine silencieuse ([Fischle, Wang et al. 2003](#)), la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 marque les régions transcriptionnellement actives ([Santos-Rosa, Schneider et al. 2002](#)). Le niveau même et la nature de la modification ajoutent un degré supplémentaire de régulation puisque, sur ces résidus, la mono-, la di- ou la triméthylation n'ont pas la même influence sur la structure chromatinienne. En effet, sous ses formes mono- ou di-méthylées, la lysine 4 d'H3 est caractéristique d'une chromatine ouverte, permissive pour la transcription et l'ajout d'un troisième groupement méthyle augmente la transcription ([Bannister, Schneider et al. 2002](#)). De la même manière, les mono- et di-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 sont retrouvées dans les domaines d'hétérochromatine facultative alors que sous sa forme triméthylée la lysine 9 de l'histone H3 est un marqueur des régions d'hétérochromatine constitutive.

Nous verrons plus loin que l'assimilation entre méthylation d'H3K9 et répression et méthylation d'H3K4 et activation n'est qu'une simplification qui, bien que d'un grand inté-

POSITION		ECRITURE		LECTURE	FONCTION
		Methyltransferase	Demethylase	Domaine	
H3	K4	γSet (Sc) SET9/SET7 (Hs) COMPASS (Sc) MLL (Hs) Ash1 (Dm)	LSD1 (Hs)	CHD1 Chromodomaine	Activation Euchromatine
	K9	Su(var)3-9 (Dm) SUV39h1/h2 (Hs) SUV39H1 (Mm) Clr4 (Sp) Kryptonite (At) G9a (Dm,Mm,Hs) Dim5 (Nc) ESET (Mm) Eu-HMTase1 (Hs) SETDB1 (Hs) E(z)/EZH2(Dm,Hs) Ash1 (Dm)	LSD1 (Hs)	HP1 Chromodomaine	Hétérochromatine Répression Méthylation de l'ADN Empreinte Activation
	K27	E(z)/EZH2(Dm,Hs) Ezh2 (Mm)		PC Chromodomaine	Répression X inactivation
	K36	Set2 (Sc) NSD1 (Mm)			Répression Elongation
	K79	Dot1 (Sc) DOT1L (Hs) Grappa (Dm)		p53BP1 Tudor domain	Silencing
H4	K20	SET7/Set8(Hs,Dm) SUV4-20 (Hs) SET9 (Sp)		CRB2 Tudor domain	Condensation
	K59	?	?		
H3	R2	CARM1 (Hs, Mm)	PADI4 (Hs)		
	R8	PRMT5	PADI4 (Hs)		Répression
	R17	CARM1 (Hs, Mm)	PADI4 (Hs)		Activation
	R26	CARM1 (Hs, Mm)	PADI4 (Hs)		
H4	R3	PRMT1	PADI4 (Hs)		

Tableau 2 : Résidus méthylés sur les histones H3 et H4, enzymes impliquées et fonctions.

rôt théorique, n'en est pas moins contredite par la pratique (voir plus bas et [\(Vakoc, Mandat et al. 2005\)](#)).

Enfin, on sait que pour les arginines la nature de la diméthylation apporte également une information épigénétique supplémentaire et donc un nouveau niveau de complexification. Dans sa forme asymétrique, la diméthylation des arginines par les enzymes PRMT1 et CARM1 est impliquée dans l'activation transcriptionnelle alors que les diméthylarginines symétriques, produits de PRMT5, sont associées à la répression transcriptionnelle (pour revue [\(Wysocka, Allis et al. 2006\)](#)).

Une question polémique concernant la méthylation des histones est celle de sa réversibilité. Contrairement à l'acétylation et comme nous le verrons plus loin à la phosphorylation, la méthylation a longtemps été considérée comme une marque permanente. L'absence d'enzymes possédant une activité de déméthylation et le fait que la demi-vie de la marque méthyle était équivalente à la demi-vie des histones [\(Byvoet 1972; Byvoet, Shepherd et al. 1972; Duerre and Lee 1974\)](#) suggérait en effet que la méthylation était une marque définitive, stable. L'existence d'une telle marque permanente répond aux nécessités d'une mise en silence à long terme et héritable comme observée dans les régions d'hétérochromatine constitutive (répétitions centromériques, péri-centromériques et télomériques) ou encore lors de la différenciation cellulaire, processus au cours duquel des domaines chromatinien sont mis en silence de manière irréversible. Néanmoins dans le cas d'un gène dont l'expression est régulée au cours du cycle cellulaire ou lors de l'activation d'un gène en réponse à des facteurs environnementaux, l'existence d'un mécanisme de réversion de la méthylation est indispensable pour rendre compte du caractère dynamique de la régulation génique. L'accumulation des études démontrant le caractère dynamique des méthylations a récemment fait tomber le dogme selon lequel l'empreinte de la méthylation était irréversible. Ainsi, qu'il s'agisse de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) [\(Ma, Baumann et al. 2001\)](#), de la méthylation d'H3K9 [\(Saccani and Natoli 2002; Ghosh and Harter 2003; Nicolas, Roumillac et al. 2003; Janicki, Tsukamoto et al. 2004\)](#) ou de résidus arginines (H3R17 et H4R3) [\(Metivier, Penot et al. 2003\)](#), les preuves de l'existence d'une déméthylation active des histones en réponse à des signaux cellulaires s'accumulent.

Trois mécanismes sont proposés pour expliquer la déméthylation des histones :

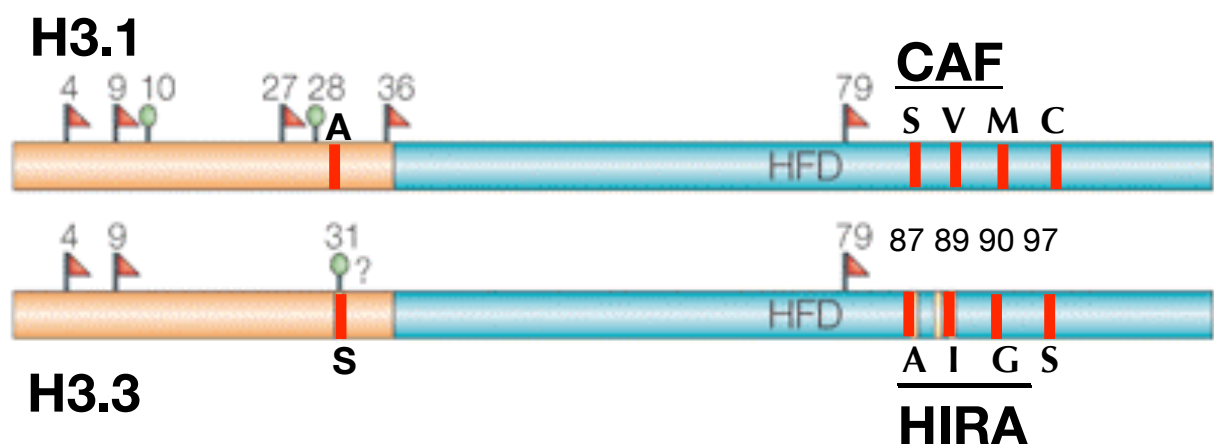


Figure 9 : Représentation schématique de l'histone canonique H3.1 et du variant H3.3. L'histone canonique H3.1 (en haut) dont la déposition par le complexe CAF est couplée à la réplication ne diffère de son variant H3.3 que par 5 acides aminés (indiqués en rouge). 4 de ces résidus se situent dans le domaine globulaire constitué par l'histone fold domain (HFD en bleu) et trois d'entre eux, les résidus H3.3A87, I89 et G90 de H3.3, sont impliqués dans la spécificité de reconnaissance par la chaperonne HIRA et la déposition d'H3.3 indépendante de la réplication. Le dernier acide aminé divergeant entre H3.1 et H3.3, se situe dans l'extrémité aminoterminal d'H3 (en saumon). Dans H3.3, la sérine H3.3S31 qui remplace l'alanine d'H3.1 pourrait être la cible d'une phosphorylation (ovale vert). Les principales lysines cibles de méthylation sont indiquées par un drapeau rouge.

Image adaptée de (Sarma et Reinberg 2005).

Pour la nomenclature des acides aminés des histones, se reporter à l'annexe 1

Le premier de ces mécanismes repose sur le désassemblage du nucléosome qui porte la modification à effacer et la substitution de l'histone marquée par une nouvelle histone. Les histones canoniques n'étant synthétisées qu'au cours de la phase S et leur déposition par le complexe CAF étant strictement corrélée à la réplication, le nucléosome nouvellement assemblé devrait alors être constitué par un variant d'histone. Cette séduisante hypothèse, proposée notamment par Kami Ahmad ([Ahmad and Henikoff 2002](#)), permet ainsi de rendre compte de la déméthylation d'H3K9 observée lors de l'activation transcriptionnelle. Cette étude s'appuyant sur des expériences d'immunomarquage révèle une déposition indépendante de la réplication du variant d'histone H3.3 tout au long du cycle cellulaire, les auteurs observant une colocalisation stricte avec les sites transcriptionnellement actifs. Cette déposition réplication-indépendante impliquerait une machinerie d'assemblage des nucléosomes spécifique composée notamment de la chaperonne d'histone HIRA ([Tagami, Ray-Gallet et al. 2004](#)) et [voir figure 9](#)). Ces résultats ont par ailleurs été confirmés par de nombreux travaux s'appuyant aussi bien sur des approches d'imagerie cellulaire ([Janicki, Tsukamoto et al. 2004](#)) que sur des méthodes biochimiques ([Daury, Chailleux et al. 2006](#)). La question des variants d'histones et de leurs fonctions respectives sera abordée plus loin.

Un deuxième mécanisme envisagé pour la déméthylation des histones est l'existence d'une fonction enzymatique capable d'assurer cette réaction. Comme il existe des histones désacétylases ou des protéines phosphatases, il existerait des histones déméthylases. Ce n'est que très récemment que de telles enzymes ont pu être identifiées. La première décrite est l'enzyme humaine PAD4 (peptidylarginine déiminase) capable de déméthyliser les arginines, non pas par l'enlèvement du groupement méthyle, mais par la conversion du résidu méthylé en citrulline ([voir figure 10](#)). Cette réaction consiste en une déméthylimination d'une arginine monométhylée ([Cuthbert, Daujat et al. 2004](#); [Wang, Wysocka et al. 2004](#); [Denman 2005](#)). On ne connaît pas, à l'heure actuelle, le devenir du résidu citrulline ainsi produit. Existe-t-il une aminotransférase capable de réaliser la conversion retour de la citrulline vers l'arginine ? Les histones arborant des citrullines sont-elles prises en charge par les machineries de remodelage chromatinien et remplacées par des variants d'histones ou des histones non modifiées ? Le fait que PAD4 soit capable de convertir des arginines non méthylées en citrullines qui, du fait de l'absence du groupement η -imino, sont réfractaires à la méthylation, suggère que ce mécanisme

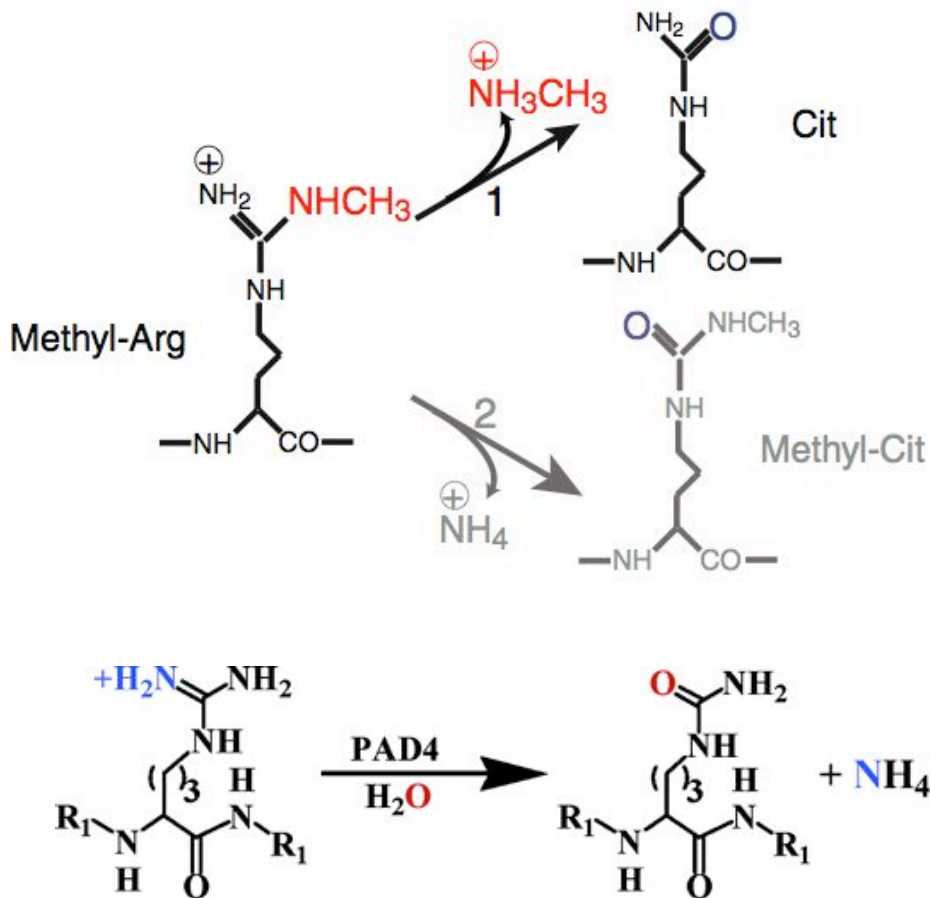


Figure 10 : Voie de déméthylation par l'enzyme PAD4

En haut, PAD4 catalyse la déméthylimination des arginines méthylées. En fonction du groupement qui sera ôté par l'enzyme, les produits de la réaction sont soit une citrulline et une méthylamine (voie 1) soit une méthylcitrulline et un ion ammonium (voie 2).

En bas, PAD4 est également capable de réaliser la conversion d'arginines non méthylées en citrulline ce qui empêche leur conversion ultérieure en méthylarginine.

Images tirées de (Wang 2004).

puisse être également utilisé en amont de la méthylation pour prévenir la modification des arginines.

En 2002, dans une revue sur le caractère dynamique de la méthylation, l'équipe de Kouzarides ([Bannister, Schneider et al. 2002](#)) se basant sur d'anciens travaux de l'équipe de Paik ([Kim, Benoiton et al. 1964](#); [Paik and Kim 1973](#)) suggérait que la déméthylation des lysines pouvait être réalisée par le biais d'une activité amine oxydase. Dernièrement, la découverte de LSD1 ([Shi, Lan et al. 2004](#)) a confirmé cette hypothèse. Cette enzyme est en effet capable de déméthyliser *in vivo* la lysine 4 de l'histone H3 sous ses formes mono- et diméthylées. Comme par ailleurs les protéines associées à LSD1 modifient la spécificité de substrat de cette déméthylase ([Metzger, Wissmann et al. 2005](#)), LSD1 serait capable de déméthyliser la lysine 9 de l'histone H3. Cette dernière découverte permettrait alors de rendre compte de la levée de répression lors de la réactivation de séquences mises en silence par l'hétérochromatine.

De manière intéressante, la présence d'un proton est requise pour l'initiation de cette réaction de déméthylation ([Shi, Lan et al. 2004](#)), ce qui explique que LSD1 ne déméthyle pas les lysines triméthylées. Cette observation s'accorde donc avec le caractère plus stable de la triméthylation, et le fait que les régions d'hétérochromatine constitutive comme les répétitions péri-centriques sont enrichies en H3K9 triméthylées. LSD1 représenterait donc un nouveau membre de la famille grandissante des « protéines du code » assurant une fonction clé à la fois pour sa lecture et pour son écriture ([Forneris, Binda et al. 2005](#); [Forneris, Binda et al. 2005](#)).

Enfin plus récemment, une autre histone lysine déméthylase JHDM1, une protéine à domaine JmjC, a été identifiée ([Tsukada, Fang et al. 2006](#)). Cette enzyme spécifique du résidu H3K36 nécessite comme cofacteurs l'ion Fe^{2+} et l' α -kétoglutarate. Une fois de plus, il est intéressant de noter que, tout comme LSD1, JHDM1 est spécifique des lysines mono- et diméthylées et que les résidus triméthylés ne sont pas substrats de cette enzyme.

Alternativement, un troisième mécanisme a été proposé pour la réversion de la méthylation. Selon de récents travaux, les conséquences de la méthylation pourraient être effacées sans que l'enlèvement de la marque méthyle elle-même ne soit nécessaire.

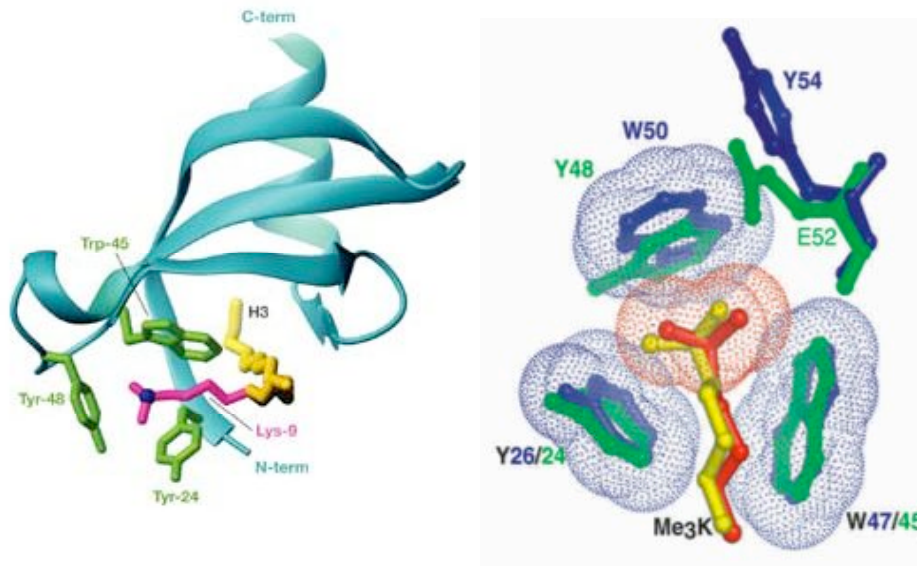


Figure 11 : Chromodomaine et reconnaissance des lysines méthylées

A gauche : Représentation schématique de la structure du chromodomaine d'HP1 β (cyan) lié à un peptide correspondant aux résidus 5 à 10 de l'extrémité aminoterminal de l'histone H3 (squelette couleur or, chaîne latérale de H3K9me en magenta). L'atome d'azote en bleu occupe une place centrale au sein de la cage aromatique formée par trois résidus tyrosine (en vert) qui assurent la reconnaissance des lysines di- ou triméthylées.

Image tirée de (Bottomley 2004). Code PDB : 1KNA

Pour la nomenclature des acides aminés des histones et de leur modifications, se reporter à l'annexe 1

A droite : Superposition des cages aromatiques des chromodomaines d'HP1 et de Polycomb (Pc) (respectivement en vert et en bleu) liées aux lysines 9 et 27 méthylées (en jaune et rouge respectivement). Les rayons de van der Waals des anneaux aromatiques de Polycomb et du groupement methylammonium de la lysine 27 de H3 sont représentés par les trames bleues et rouge respectivement.

Image tirée de (Fischle, Wang et al. 2003).

Contrairement à l'acétylation, on sait que la méthylation est sans conséquences sur la charge globale des histones. Son effet sur la structure chromatinienne passe exclusivement par son rôle de plateforme de recrutement pour des facteurs protéiques. En accord avec la théorie du code des histones, l'aptitude des lysines méthylées à recruter des facteurs a largement été documentée, notamment dans le cas de l'interaction entre la lysine 9 de l'histone H3 et le marqueur de l'hétérochromatine HP1 ([Bannister, Zegerman et al. 2001](#); [Lachner, O'Carroll et al. 2001](#)).

Cette interaction passe par le chromodomaine ([voir figure 11](#)), un module protéique conservé retrouvé dans de nombreux facteurs ([Jones, Cowell et al. 2000](#)) et initialement identifié du fait de sa conservation entre les protéines HP1 et Polycomb chez la drosophile ([Paro and Hogness 1991](#)). Tout comme HP1 est impliquée dans la répression transcriptionnelle ([Hwang, Eissenberg et al. 2001](#); [Verschure, van der Kraan et al. 2005](#)), les protéines Polycomb interviennent dans le *silencing* transcriptionnel ([Muller, Gaunt et al. 1995](#)). Malgré leur mode commun d'association à la chromatine, HP1 et Polycomb occupent des localisations différentes dans le noyau du fait de leur spécificité de substrat dont les bases structurales ont été élucidées il y a peu par la comparaison de la structure du chromodomaine de HP1 lié à la forme méthylée de H3K9 ([Jacobs and Khorasanizadeh 2002](#); [Nielsen, Nietlispach et al. 2002](#)) à celle du chromodomaine de Polycomb lié à H3K27 méthylée ([Fischle, Wang et al. 2003](#); [Min, Zhang et al. 2003](#)) ([voir figure 11](#)). Ainsi, bien que ces deux protéines soient associées au silencing épigénétique et que les deux modifications qu'elles reconnaissent soient présentes au sein d'un motif ARKS conservé, HP1 et Polycomb sont extrêmement spécifiques.

De récentes études semblent donner un sens à cette proximité entre lysines méthylées et résidus phosphorylables (sérine ou thréonine). La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 par la kinase Aurora B (une modification réalisée au cours de la mitose) prévient l'interaction d'HP1 avec H3K9 méthylée ([Fischle, Tseng et al. 2005](#); [Hirota, Lipp et al. 2005](#)). Ces résultats semblaient contredire de précédentes observations qui suggéraient, au contraire, que la phosphorylation d'H3S10 seule ne pouvait expliquer le décrochage d'HP1 de la chromatine pendant la vague de phosphorylation mitotique ([Fass, Sharhar et al. 2002](#)). La découverte récente de la nécessité d'une troisième modification, l'acétylation d'H3K14, pour accomplir cette perte d'interaction réconcilie donc ces deux réalités ([Mateescu, England et al. 2004](#)) ([voir figure 12](#)). De la même manière, Flanagan a

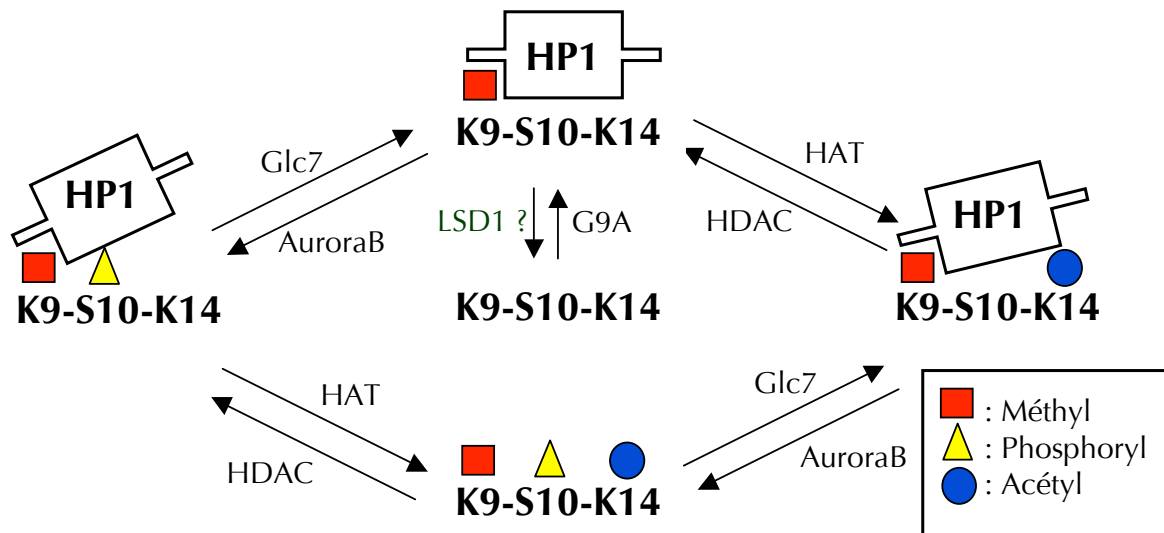


Figure 12 : Illustration de l'interdépendance des modifications des histones

Le cas de la lysine 9 d'H3 (K9) est une illustration frappante de la flexibilité du code des histones. Sous sa forme méthylée, K9 est reconnue spécifiquement par la protéine HP1 via son chromodomaine. La phosphorylation de la sérine 10 (S10) et l'acétylation de la lysine 14 (K14) voisines inhibent toutes deux la méthylation de K9 (non représenté). Prises séparément, ces deux modifications n'affectent pas l'interaction entre HP1 et H3K9me alors que conjointement elles sont capables d'inhiber la reconnaissance de H3K9me par HP1 *in vitro*. Les noms des enzymes responsables de ces interconversions sont indiqués à côté des flèches correspondantes.

Illustration créée à partir des données de (Mateescu 2004).

montré qu'*in vitro* la phosphorylation d'H3T3 antagonisait la reconnaissance de la lysine 4 de H3 méthylée (H3K4me voir annexe 1 pour la nomenclature des modifications des histones) par la protéine CHD1 (Flanagan, Mi et al. 2005). Dernièrement, la démonstration que la phosphorylation d'H3S27 empêchait l'interaction d'HP1 avec H3K26 méthylée (Daujat, Zeissler et al. 2005) a conduit à l'hypothèse d'un rôle plus général de ce « binary switch » ou « phospho-methyl switch » (Fischle, Wang et al. 2003) qui agirait comme un interrupteur en provoquant le décrochage des répresseurs transcriptionnels de la chromatine (Eissenberg and Elgin 2005). Ces dernières observations illustrent parfaitement la notion d'interdépendance des modifications des histones contenue dans la définition même du code et dont des exemples sont présentés en annexe (Annexe 2).

I.2.3.3. Phosphorylation

Tout comme l'acétylation, la phosphorylation est une modification dynamique dont la régulation repose sur un équilibre entre les activités opposées de kinases qui catalysent l'ajout d'un groupement phosphate et de phosphatases qui enlèvent ces mêmes groupements. Cette modification peut se produire sur des résidus sérines ou thréonines et est impliquée dans de nombreux processus cellulaires.

La phosphorylation de l'histone H3 est de longue date corrélée à la condensation et la ségrégation des chromosomes durant la mitose et la méiose (Gurley, D'Anna et al. 1978; Wei, Mizzen et al. 1998; Wei, Yu et al. 1999). Elle s'initie dans les régions péri-centriques en phase G2 et s'étend à l'ensemble du chromosome à mesure de sa compaction (Hendzel, Wei et al. 1997; Goto, Tomono et al. 1999). La phosphorylation sur la sérine 10 de l'histone H3 repose sur un équilibre dynamique entre les actions des kinases Ipl1/aurora et des phosphatases Glc7/PP1 PP2 chez *S. cerevisiae* et le nématode (Guo, Th'ng et al. 1995; Hsu, Sun et al. 2000). Elle est requise pour la phase d'initiation de la compaction des chromosomes mais pas pour le maintien de cette compaction (Van Hoo-ser, Goodrich et al. 1998) et permet notamment le décrochage de la protéine HP1 de la chromatine en mitose (voir plus haut). Cette phosphorylation mitose-spécifique de l'histone H3 n'est pas limitée à la seule sérine 10. En effet, la sérine 28 ou encore les thréonine 3 et 11 sont également phosphorylées en mitose (Goto, Tomono et al. 1999; Preuss, Landsberg et al. 2003; Dai and Higgins 2005). Deux articles rapportent par ailleurs que la phosphorylation des histones en mitose s'étend aux résidus sérine 1 des his-

tones H2A ([Barber, Turner et al. 2004](#)) et H4 ([Cheung, Tanner et al. 2000](#)). Cette augmentation de la phosphorylation sur H2A en mitose est conservée chez les nématodes, la mouche et les mammifères ([Barber, Turner et al. 2004](#)).

Si la fonction principale de la phosphorylation d'H3S10 est la condensation des chromosomes, son rôle n'est pas limité à la mitose. De très récents travaux prêtent à cette modification une fonction dans l'activation de la transcription par l'inhibition de l'interaction entre la protéine HP1 et la lysine 9 de l'histone H3 méthylée selon le principe de « binary switch » décrit plus haut ([Eissenberg and Elgin 2005](#)). Nous avons vu que les exemples d'influences croisées de modifications sont fréquents ce qui suggère des mécanismes très fins de contrôle du code, nous présentons plus loin de nouveaux exemples de ces interdépendances.

La phosphorylation des histones semble également pouvoir jouer un rôle général dans le contrôle de l'apoptose comme c'est le cas pour les thymocytes ([Lee, Nakatsuma et al. 1999](#)) ou les astrocytes ([Enomoto, Tatsuoka et al. 2004](#)) et en réponse au stress oxydatif ([Tikoo, Lau et al. 2001](#)). La phosphorylation de la lysine 32 de l'histone H2B semble notamment être un bon marqueur des cellules apoptotiques ([Ajiro 2000](#)).

Enfin, la phosphorylation des histones H2A sur la serine 129 est impliquée dans la réparation des cassures double brin chez la levure ([Downs, Lowndes et al. 2000](#); [Redon, Pilch et al. 2003](#)). De manière similaire, les sérines 136 et 139 du variant d'histone H2AX et la sérine 14 de l'histone H2B sont phosphorylées en réponse aux cassures double brin induites par irradiation ([Fernandez-Capetillo, Allis et al. 2004](#); [Fernandez-Capetillo, Lee et al. 2004](#)). Ces résultats suggèrent l'existence d'un code épigénétique des histones spécifique aux réparations des dommages à l'ADN et dont l'existence fût récemment discutée ([Hassa and Hottiger 2005](#)). Un tel code des histones pour la réparation des cassures double brin s'appuierait non seulement sur l'incorporation du variant H2AX et son activation par phosphorylation (γ H2AX) mais aussi sur tout un panel de modifications incluant l'acétylation de nombreux résidus lysines (H2AK5 et K9 et H4K5, K8, K12 et K16 par le complexe HAT NuA4 ([Clarke, Lowell et al. 1999](#); [Bird, Yu et al. 2002](#)), la méthylation de H3K79 par l'enzyme DOT1 chez la levure ([Game, Williamson et al. 2005](#)) qui permettrait le recrutement de 53BP1 via son double domaine tudor ([Huyen, Zgheib et al. 2004](#)), la mé-

thylation de H4K20 par SET 9 ou encore la mono(ADP)ribosylation ([Kreimeyer, Wielckens et al. 1984](#)).

I.2.3.4. Les autres modifications des histones

Les trois modifications acétylation, méthylation et phosphorylation sont de loin les plus étudiées et par conséquent les mieux connues ; néanmoins ce ne sont pas les seules à jouer un rôle dans le code des histones.

La mono(ADPribose)lation, une modification spécifique des résidus arginines et glutamates (E) peut affecter les histones H1 (E2, E14, E116 et R34) ou le glutamate en position 2 d'H2B ([Burzio, Riquelme et al. 1979](#); [Golderer and Grobner 1991](#)), la mono (ADPribose)lation des autres histones bien qu'elle semble exister est moins documentée. Ce type de modification a pu être corrélée à la réparation des dommages à l'ADN ([Kreimeyer, Wielckens et al. 1984](#)).

La mono-ubiquitination consiste en l'ajout covalent d'un peptide ubiquitine sur la position ϵ -amine des lysines ([Jason, Moore et al. 2002](#); [Moore, Jason et al. 2002](#)), elle est donc par nature antagoniste des acétylations et méthylations dont ces résidus pourraient être les cibles. Contrairement à la poly-ubiquitination cette modification ne semble pas conduire à la dégradation de la protéine modifiée, dans ce cas là, une histone. Chez les mammifères, les mono-ubiquitinations des lysines 120 de l'histone H2B et 119 d'H2A sont corrélées à l'activation de la transcription ([Thorne, Sautiere et al. 1987](#)). Ces modifications reposent, chez la levure, sur les activités des enzymes Bre1 et Rad6 ([Hwang, Venkatasubrahmanyam et al. 2003](#); [Wood, Krogan et al. 2003](#)). Et par ailleurs le fait que l'ubiquitination d'H2B est requise pour la méthylation d'H3K4 chez la levure ([Dover, Schneider et al. 2002](#); [Sun and Allis 2002](#)) offre une base pour la fonction de cette modification dans l'activation de la transcription.

A l'inverse de la mono-ubiquitination, la sumoylation qui consiste en l'addition covalente d'un groupement SUMO (un petit peptide proche de l'ubiquitine) interviendrait dans le *silencing* génique ([Shiio and Eisenman 2003](#); [Gill 2004](#)).

Enfin la biotinylation, une modification portant, elle aussi, sur la position ϵ -amine réactive des lysines, jouerait un rôle dans la prolifération cellulaire ([Stanley, Griffin et al. 2001](#); [Narang, Dumas et al. 2004](#)). Cette modification est hautement régulée par les au-

tres types de modifications sur ces mêmes résidus et par celles présentent sur les résidus avoisinants. D'une part, il y a une compétition entre biotinylation et acétylation ou méthylation sur les lysines 8 et 12 de l'histone H4 d'autre part, la biotinylation sur ces résidus est sensible à la charge des histones qui est elle-même contrôlée par les modifications (acétylation et méthylation) des lysines voisines ([Camporeale, Shubert et al. 2004](#)). Selon le même principe, la biotinylation des lysines 4, 9 et 18 de l'histone H3 est régulée (augmentée) par la diméthylation des arginines 2, 8 et 17 alors que la phosphorylation de la serine 10 abolit la biotinylation de la lysine 9 tout comme elle inhibait sa méthylation ([Kobza, Camporeale et al. 2005](#)).

Ce dernier cas révèle une fois de plus l'existence d'interactions synergiques ou antagonistes qui lient les modifications des histones entre elles. Dans la section suivante, nous présenterons certaines de ces interactions croisées afin de rendre compte de la fréquence de ces phénomènes de contrôle du code.

I.2.3.5. Interdépendence des modifications

Comme le souligne la définition même du code des histones, les modifications des extrémités amino-terminales des histones ne surviennent pas de manière indépendante les unes des autres ([Jenuwein and Allis 2001](#)) mais le code des histones repose au contraire sur des combinaisons de modification. Si en théorie les différents niveaux de complexification du code rendent quasi infinies les possibilités de combinaisons (types de modifications, nombre de résidus modifiables, état de modification mono-, di- tri- méthylation des lysines, diméthylation symétrique ou asymétrique des arginines etc...), le caractère interdépendant des modifications réalisables sur une même extrémité d'histone ou au sein d'un même nucléosome en limite de fait le nombre.

Un exemple frappant est celui de la lysine 9 de l'histone H3 dont on considérait jusqu'à peu que l'état de modification était un bon marqueur de la nature de la chromatine. Majoritairement acétylée dans les régions actives ou potentiellement actives en transcription, elle est retrouvée principalement sous forme méthylée dans les différentes régions d'hétérochromatine. Ces deux modifications, acétylation et méthylation survenant sur la même position du résidu lysine (l'atome d'azote du groupement amine de la chaîne latérale) elles sont mutuellement exclusives. Comme nous l'avons vu plus haut cette lysine

peut également être biotinylée, chacune de ces modifications étant dépendante des résidus voisins et en premier lieu de l'état de phosphorylation de la sérine 10.

Le cas de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 est ainsi particulièrement intéressant du fait de ses multiples influences. D'une part, elle favorise l'acétylation d'H3K14 par Gcn5 (marque de l'activation transcriptionnelle) (Cheung, Tanner et al. 2000) tout en inhibant la méthylation d'H3K9 par l'histone méthyltransférase SUVAR3-9 (Rea, Eisenhaber et al. 2000) et la fixation de la déméthylase LSD1 sur H3K4 (Forneris, Binda et al. 2005). Inversement, *in vitro*, la méthylation d'H3K9 inhibe la phosphorylation de la sérine 10 voisine par la kinase Aurora et la déplétion de SUVAR3-9 *in vivo* entraîne une augmentation de la phosphorylation d'H3S10 (Rea, Eisenhaber et al. 2000). Comme de plus, acétylation d'H3K14 et phosphorylation d'H3S10 gouvernent le détachement d'HP1 de la lysine 9 méthylée (H3K9met), ce « ménage à trois » est l'illustration la plus frappante du caractère hautement régulé du code (voir figure 12).

Un autre exemple de répression croisée est celui des méthylations des lysines 4 et 9 de l'histone H3. Alors que la première corrèle avec les régions d'euchromatine potentiellement actives, la deuxième est une marque de l'hétérochromatine (Zhang and Reinberg 2001). *In vitro*, la préexistence d'une de ces modifications inhibe l'autre. Les peptides méthylés sur K9 ne sont plus substrats de SET7 (l'histone méthyltransférase spécifique de H3K4) de même que la méthylation de H3K4 empêche la méthylation ultérieure de H3K9 par l'enzyme SUVAR39 (Wang, Cao et al. 2001). Néanmoins, *in vivo*, ce principe d'exclusion mutuelle d'H3K4 méthylée et d'H3K9 méthylée ne semble pas vérifié (Vakoc, Mandat et al. 2005). Nous reviendrons plus en détail sur ce cas particulier et ses nombreuses implications dans notre compréhension du code des histones dans la section qui traite de l'hétérochromatine.

Mais cette interdépendance des modifications des histones ne se limite pas à l'extrémité de l'histone H3. Par exemple, la méthylation de l'arginine 3 de H4 par PRMT1 facilite l'acétylation des lysines de H4 par l'enzyme p300 (Wang, Huang et al. 2001).

Encore plus intéressante est la possibilité qu'une modification présente sur l'extrémité d'une histone affecte le statut de modification d'une autre histone présente au sein d'un même nucléosome. Celle-ci est illustrée par la démonstration chez la levure que

l'ubiquitination d'H2B est requise pour la méthylation d'H3K4 ([Wang, Huang et al. 2001](#); [Dover, Schneider et al. 2002](#); [Sun and Allis 2002](#)).

Bien que difficilement vérifiable expérimentalement, il est également possible que des modifications présentes sur des nucléosomes voisins au sein d'un réseau compact de nucléosomes (comme la fibre de 30 nm) s'influencent mutuellement ou interagissent de manière synergique pour assurer le recrutement de complexes protéiques de remodelage de la chromatine.

I.2.4. Le remodelage chromatinien

Du fait de la compacité extrême que peut adopter la chromatine et de la nécessité d'accéder au message génétique contenu dans la double hélice d'ADN, les processus tels que la réplication et la transcription requièrent une ouverture de la chromatine et un désassemblage des nucléosomes pour permettre le passage des polymérases. On parle alors de remodelage chromatinien qui est assuré par deux types de complexes enzymatiques de remodelage.

Le premier type correspond aux enzymes de modifications des histones décrites ci-dessus qui catalysent l'ajout covalent de groupements chimiques (acétylation, méthylation, phosphorylation etc...) généralement sur les extrémités amino-terminales des histones nucléosomales mais également sur quelques résidus du cœur globulaire (voir plus haut).

La deuxième classe d'enzyme qui agit elle aussi au sein de complexes de remodelage consomme de l'ATP pour modifier les propriétés structurales du nucléosome ([Vignali, Hassan et al. 2000](#); [Peterson 2002](#); [Peterson 2002](#); [Johnson, Adkins et al. 2005](#)). Une fois les complexes de remodelage de la chromatine recrutés sur les promoteurs, l'énergie dégagée par l'hydrolyse de l'ATP est utilisée pour affaiblir les interactions entre les histones et l'ADN. Ceci conduit à un accroissement de la mobilité des nucléosomes qui peut avoir deux types de conséquences. Dans le premier cas, le nucléosome peut glisser (déplacement le long de la molécule d'ADN), ce qui a pour conséquence un dévoilement ou un masquage d'une séquence de recrutement d'un activateur ou d'un répresseur de la transcription. L'autre conséquence possible est un désassemblage pur et simple du nucléosome. Dans les deux cas, cela permet d'augmenter l'accessibilité générale

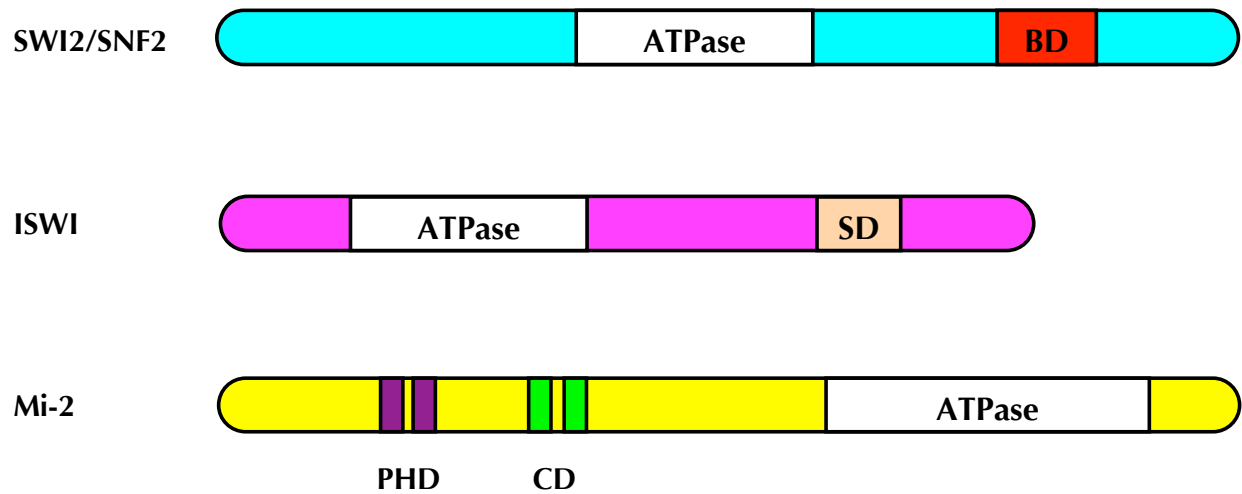


Figure 13 : Représentation schématique de la structure protéique des différents facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendant

Il existe trois familles de facteur de remodelage de la chromatine ATP-dépendant : la famille SWI/SNF (en haut), la famille ISWI (au centre) et la famille MI-2 (en bas). Les domaines conservés ATPase et d'interaction avec la chromatine sont représentés. BD= Bromodomaine, SD= SANT domain, CD= Chromodomaine et PHD= PHD finger. Image adaptée de (Sif 2004).

de l'ADN nucléosomal mais pas nécessairement d'une séquence donnée ([Chang and Luse 1997](#); [Becker and Horz 2002](#); [Fry and Peterson 2002](#); [Soutoglou and Talianidis 2002](#)). Dans le cas où le nucléosome est désassemblé, il peut être remplacé par la suite par un nouveau nucléosome qui sera constitué soit par des histones nouvellement synthétisées soit par des variants d'histones (voir plus loin). Dans les deux cas, cela permet de modifier les marques épigénétiques lorsque cela est nécessaire.

On compte trois sous-familles de complexes de remodelage de la chromatine définies sur la base de leurs propriétés biochimiques et sur la conservation de leur domaine ATPase. Ces trois familles sont respectivement le groupe SWI/SNF, le groupe ISWI et le groupe Mi-2/CHD ([voir figure 13](#)). Les enzymes du groupe SWI/SNF ont initialement été identifiées chez la levure ([Laurent, Treitel et al. 1991](#)) puis, rapidement, des homologues ont été retrouvés chez la drosophile et chez l'homme ([Tamkun, Deuring et al. 1992](#); [Kwon, Imbalzano et al. 1994](#)). Ce sont toutes des activateurs de la transcription. Les enzymes du groupe ISWI forment trois types de complexes, NURF (Nucleosome Remodeling Factor), ACF (ATP-dependant Chromatin Assembly and Remodeling Factor) et CHRAC (Chromatin Assembly Factor) qui jouent le plus souvent un rôle dans la transcription, la réplication, la recombinaison homologue et la réparation de l'ADN ([Becker 1994](#); [Tsukiyama, Becker et al. 1994](#); [Tsukiyama, Daniel et al. 1995](#); [Tsukiyama and Wu 1995](#); [Peterson 1996](#); [Ito, Tyler et al. 1997](#)). Ces complexes pourraient de plus jouer un rôle dans la répression de la transcription et dans le maintien de la structure du chromosome X chez le mâle de la drosophile ([Deuring, Fanti et al. 2000](#)). De la même manière, les enzymes de la famille Mi-2 sont généralement impliquées dans les processus de répression transcriptionnelle médiée par les complexes Polycomb ([Kehle, Beuchle et al. 1998](#)).

Dans certains cas, des complexes de remodelage de la chromatine possédant des effets antagonistes peuvent intervenir au niveau d'un même gène pour en contrôler l'expression. C'est par exemple le cas lors de la réponse inflammatoire chez les mammifères, où l'expression des gènes dans les macrophages est régulée à la fois par le complexe SWI/SNF (activation) et le complexe Mi-2beta (répression) révélant l'activité anti-inflammatoire de ce dernier ([Ramirez-Carrozzi, Nazarian et al. 2006](#)).

Jusqu'à il y a peu, on pensait que les complexes de remodelage de la chromatine étaient recrutés au niveau d'un promoteur par des facteurs de transcription séquence

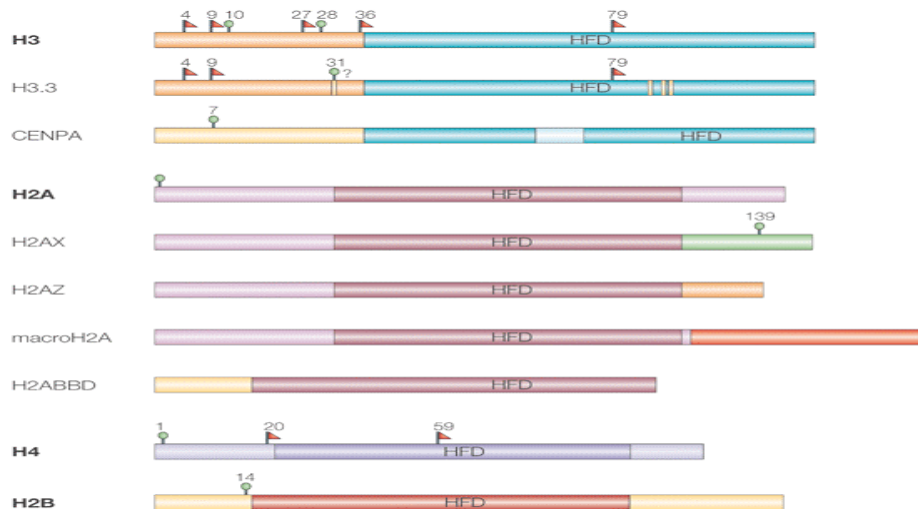


Figure 14 : Histones canoniques et variants d'histones.

Les histones sont composées d'un domaine central qui adopte un repliement de type histone fold (HFD voir figure 2) ainsi que de domaines amino- et carboxy- terminaux non structurés qui sont la cible de nombreuses modifications post traductionnelles telles que la méthylation des lysines (symbolisée par un drapeau rouge) ou la phosphorylation des séries (cercles verts). Le cas de l'histone H3.1 et de son variant H3.3 est détaillé dans la figure 9 et leur fonction spécifique est indiquée dans la table ci-dessous

Image tirée de (Sarma et Reinberg 2005).

HISTONE	S.p	S.c	T	D.m	M.m	H.s	NOTES
H3.3 (a)	hht3	H3	hv2	His3.3	h3f3	H3.3 H3F3	Activation
CENP A	cnp1 sim2	Cse4	TCENPA	Cid	Cenpa	CENPA	Assemblage du kinétochore
H3.4						H3.4	Gamétogenèse (b)
H2AX	H2A	H2A	H2AX	H2Av (c)	H2afx	H2A.X H2AF/X	Réparation de l'ADN Recombinaison
H2AZ	pht1	Htz1	hv1		H2afz H2afv	H2A.Z H2AF/Z	ActivationRépression Ségrégation
macroH2A					H2afy	MacroH2A H2AF/Y	Répression X inactivation
H2ABBD					H2abbd	H2ABbd H2AF/B	Activation
H2B(1)					TH2B	hTSH2B	Compaction (d)

Table de répartition des principaux variants d'histones chez les eucaryotes et fonctions associées

(a) Chez les plantes, le variant H3.2 est impliqué dans l'activation de la transcription (waterborg 1992, robertson dna seq 1996)

(b) Variant spécifique dans les testicules des mammifères, H3.3A chez la souris (witt 1996 lopez fernandez 1997)

(c) H2Av chez la drosophile partage des caractéristiques des variants H2AX et H2AZ et est impliqué dans la formation de l'hétérochromatine péricentrique (voir texte)

(d) Variant spécifique des testicules chez les mammifères.

spécifiques afin de permettre l'assemblage d'un complexe de préinitiation actif contenant l'ARN polymérase II ([Struhl and Greenwald 1999](#)). Néanmoins, les travaux plus récents suggèrent, au contraire, un recrutement direct des complexes de remodelage des nucléosomes ATP dépendants par les modifications post-traductionnelles des histones. Ainsi, la lysine 14 de l'histone H3 sous sa forme acétylée (modification nécessaire pour l'activation transcriptionnelle) permet le recrutement du complexe RSC par le biais du double bromodomaine en tandem d'un de ses composants, la protéine Rsc4 ([Kasten, Szerlong et al. 2004](#)).

I.2.5. Les variants d'histones

Outre les enzymes de modifications des histones et les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, il existe une troisième voie permettant de moduler la structure et les propriétés fonctionnelles de la chromatine : l'incorporation de variants d'histones ([voir figure 14](#)).

Les histones nucléosomales canoniques sont essentiellement exprimées durant la phase S sous le contrôle du système E2F/Rb. Leur déposition sur l'ADN se déroule exclusivement pendant la réplication et requiert les chaperonnes d'histones ASF1 et CAF1 qui forment avec H3 et H4 le complexe de déposition RCAF. Il existe néanmoins de nombreux variants d'histones dont l'expression n'est pas restreinte à la phase S et dont l'incorporation est indépendante du processus de réplication ([Kamakaka and Biggins 2005](#); [Sarma and Reinberg 2005](#)). A l'inverse des histones canoniques, les gènes des variants d'histones sont généralement présents en copie unique dans le génome. Du fait de modifications ponctuelles de leur séquence polypeptidique, le plus souvent au niveau des extrémités amino- et carboxy-terminales ([Malik and Henikoff 2003](#)), les variants d'histones possèdent des propriétés biochimiques pouvant varier sensiblement de celles de l'histone canonique dont elles se rapprochent ([Ramakrishnan 1997](#)). Pour l'heure, seules les histones H3 et H2A semblent posséder des variants qui peuvent, eux aussi, être la cible de modifications post-traductionnelles. Certains de ces variants sont conservés dans tout le règne eucaryote, d'autres au contraire sont limités aux vertébrés ([voir tableau](#)). Leur origine évolutive, leur mode spécifique d'assemblage et leur fonction étant largement discutés dans plusieurs revues ([Malik and Henikoff 2003](#); [Henikoff, Furuyama et al.](#)

2004; Kamakaka and Biggins 2005; Marino-Ramirez, Kann et al. 2005; Sarma and Reinberg 2005), les lecteurs sont invités à s'y référer pour une vision plus complète du sujet.

Il existe 4 principales histones de type 3 : l'histone H3.1 correspond à la forme canonique d'H3. H3.2 et H3.3 qui divergent peu entre elles et CENPA constituant les trois variants. Le quatrième variant CENPA correspond au variant centromérique d'H3. Il diverge des 3 autres formes et son degré de conservation est moindre entre les espèces (pour revue (Smith 2002)). Le rôle de ce variant et son mode d'adressage au centromère restent encore peu compris, bien que sa fonction soit essentielle à la viabilité (Howman, Fowler et al. 2000). Comme nous l'avons vu plus haut, le variant d'histone H3.3 est incorporé au cours de la transcription (Schwartz and Ahmad 2005; Wirbelauer, Bell et al. 2005; Daury, Chailleux et al. 2006). Sa déposition réplique indépendante requiert la chaperone d'histone HIRA ainsi que l'acétyltransférase HAT1 dont la fonction est également requise pour la déposition d'H3.1 (Qin and Parthun 2002; Tagami, Ray-Gallet et al. 2004). Le variant H3.3 porte par ailleurs les marques épigénétiques de la chromatine active (méthylation des lysines 4 et acétylation des lysines 9, 14, 18 et 23) (voir figure 9) (McKittrick, Gafken et al. 2004) ce qui conforte l'idée de son rôle d'activateur de la transcription.

Les principaux variants de l'histone H2A sont au nombre de quatre. Le variant H2AX chez les eucaryotes supérieurs joue un rôle dans la recombinaison homologe et son niveau d'expression corrèle bien avec le niveau de recombinaison dans une espèce donnée. Sous sa forme phosphorylée (Sérine dans le domaine Carboxy-terminal) il est recruté autour des cassures double brin ce qui suggère un rôle de cette histone dans le mécanisme de réparation des dommages à l'ADN (Rogakou, Pilch et al. 1998; Downs, Lowndes et al. 2000). Chez la levure, où il y a un niveau élevé de recombinaison, il correspond à la forme canonique de l'histone H2A. Chez les vertébrés, le variant Macro-H2A participe à l'inactivation d'une des deux copies du chromosome X de la femelle sous la forme du corpuscule de Barr, sa déposition sur le chromosome X inactif dépendant de la présence de l'ARN Xist (Costanzi and Pehrson 1998; Mermoud, Costanzi et al. 1999). Il semble donc jouer un rôle de répression de la transcription lié à la compensation de dose. À l'inverse, H2ABBD (pour Barr Body deficient) est absent du Xi (Chadwick and Willard 2001) et pourrait jouer un rôle dans l'activation de la transcription comme cela semble être le cas pour le variant H2AZ. Plusieurs fonctions ont été attribuées à ce dernier variant ; il pourrait jouer le rôle de frontière en empêchant l'invasion des régions euchromatiniennes par

l'hétérochromatine ([Meneghini, Wu et al. 2003](#); [Raisner, Hartley et al. 2005](#)), mais pourrait également avoir une fonction de répression ([Dhillon and Kamakaka 2000](#)). Ce variant, qu'on retrouve chez les mammifères associé aux régions péricentriques ([Rangasamy, Berven et al. 2003](#)), aurait également une fonction dans la ségrégation des chromosomes mitotiques comme le suggère les observations phénotypiques lors de sa déplétion par RNAi ([Rangasamy, Greaves et al. 2004](#)). Chez la drosophile, le variant d'histone H2Av regroupe des caractéristiques structurales des variants H2AX (extrémité carboxy-terminale) et H2AZ (domaine globulaire) et, comme H2AX, sa phosphorylation prévient l'apoptose induite par les dommages à l'ADN ([Madigan, Chotkowski et al. 2002](#)). Plus récemment, une fonction de ce variant dans les étapes précoces d'assemblage de l'hétérochromatine a été proposée ([Swaminathan, Baxter et al. 2005](#)). Nous reviendrons plus en détail sur cette dernière fonction dans la section suivante qui traite de l'hétérochromatine.

Sans être exhaustive, cette dernière section, par la multiplicité et la diversité des exemples présentés, offre un aperçu de la grande complexité du code des histones et des mécanismes épigénétiques qui contrôlent la transcription chez les eucaryotes (remodelage de la chromatine, fonction des variants d'histones). Elle met surtout en avant un des aspects essentiels de ce type de régulation, celui de la connexion fine entre les diverses modifications et les différents modes de contrôle. Ce type de contrôle croisé permet un haut niveau de régulation du message épigénétique à la fois pour la transcription mais aussi pour de nombreux processus cellulaires (apoptose, contrôle de la prolifération, réparation des dommages à l'ADN, recombinaison VDJ au niveau des loci codant pour les immunoglobulines...). Le nombre croissant de processus faisant intervenir le code des histones et son intégration aux différentes étapes du cycle cellulaire et du développement soulignent l'importance évolutive du mode épigénétique de contrôle de l'information génétique.

Dans la section suivante, nous traiterons des questions relatives à l'hétérochromatine : sa nature, sa structure et les interrelations entre l'hétérochromatine et le code des histones. Nous y verrons notamment comment l'élucidation de sa structure et de son mode d'assemblage ont permis de découvrir les bases moléculaires des mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression génique chez les eucaryotes ainsi que l'identité des acteurs majeurs du code des histones. Nous nous interrogerons également sur la manière dont la compréhension du code des histones peut permettre d'améliorer notre connaissance de l'hétérochromatine.

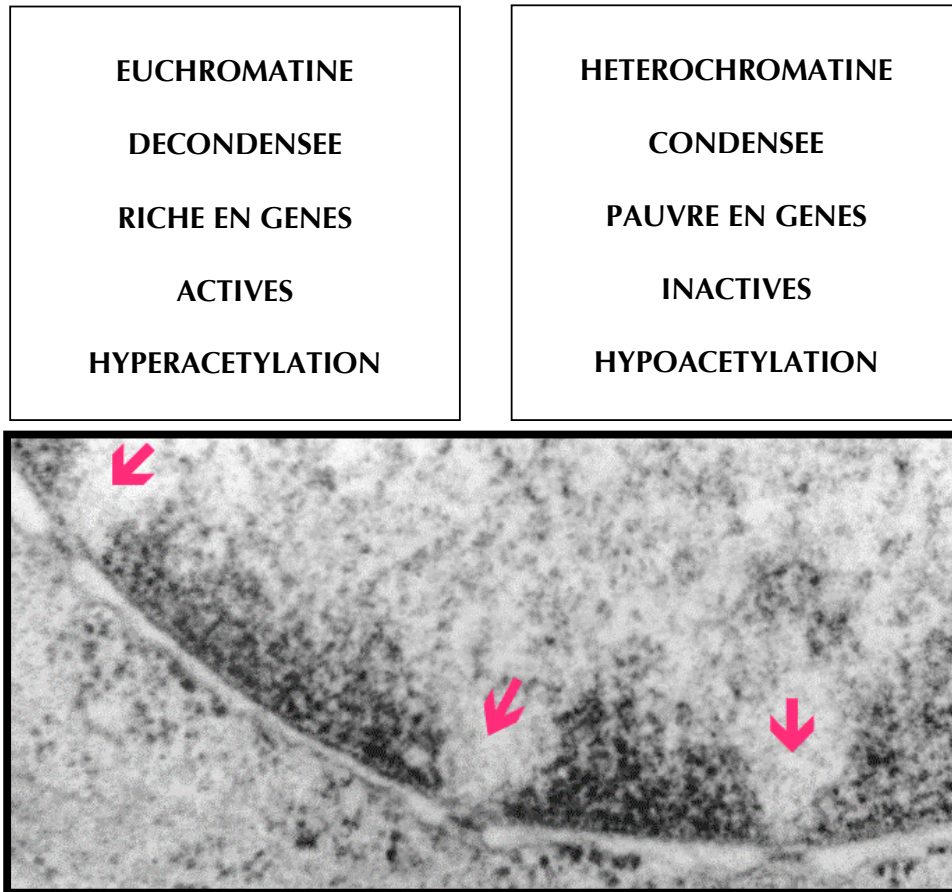


Figure 15 : Principales caractéristiques de l'euchromatine et de l'hétérochromatine

Microscopie électronique d'un noyau de cellule neurale de rat.

L'hétérochromatine (zones sombres) est principalement localisée à la périphérie du noyau alors que l'euchromatine, moins dense (zones claires) occupe le reste du nucléoplasme. Les flèches indiquent les canaux de Watson localisés entre les régions sombres d'hétérochromatine qui rejoignent la membrane nucléaire au niveau des pores nucléaires.

I.3. L'hétérochromatine

I.3.1. Définitions et généralités

On distingue communément deux types de chromatine définis initialement sur la base d'observations cytologiques réalisées en 1928 par Emil Heitz chez différentes espèces de drosophiles (Pour une vue historique, voir [\(Passarge 1979\)](#)).

L'euchromatine ou "chromatine vraie" correspond à la moins dense des deux phases retrouvées dans le noyau, elle représente la portion du génome enrichie en gènes et du fait de sa décondensation en interphase, elle est plus accessible aux machineries transcriptionnelles. Sur le plan moléculaire, elle est caractérisée notamment par un fort enrichissement en histones acétylées sur leurs extrémités aminoterminales et dans les régions transcrites par la méthylation des lysines 4, 36 et 79 de l'histone H3 ([voir figure 15](#)).

L'hétérochromatine, quant à elle, fut initialement définie comme la portion du génome qui ne se décondense pas au cours du cycle cellulaire. Elle se distingue de l'euchromatine par la nature même des séquences qui la constituent. Pauvre en gènes, elle est majoritairement composée de séquences répétées de nature et complexité variables. Sur le plan moléculaire, c'est la relative hypoacétylation des histones, la méthylation de la lysine 9 ou 27 de l'histone H3, de la lysine 20 d'H4 ainsi que son fort enrichissement en HP1 (Heterochromatin Protein 1) qui constituent les principales empreintes épigénétiques de l'hétérochromatine. Chez les plantes et les vertébrés, la méthylation des cytosines des doublets CpG ([Bird 2002](#)) est également associée à l'hétérochromatine (pour [\(Richards and Elgin 2002\)](#)). L'existence d'une telle marque épigénétique n'ayant pas été démontrée formellement chez la drosophile adulte, celle-ci ne sera pas abordée ici.

Au sein même de l'hétérochromatine, on distingue l'hétérochromatine constitutive de l'hétérochromatine facultative. Cette dernière s'établit notamment au cours du processus de différenciation cellulaire pour assurer la mise en silence permanente de gènes ou de domaines chromatinien. Elle est donc essentielle au développement d'un organisme ([Orlando 2003; Rand and Cedar 2003](#)). À la différence de l'hétérochromatine constitutive qui s'établit pour toute la durée de vie d'un organisme, l'hétérochromatine facultative aussi appelée parfois hétérochromatine intercalaire ([Zhimulev and Belyaeva 2003](#))

peut être le siège de transitions entre structure euchromatinienne et hétérochromatinienne. C'est par exemple le cas chez les mammifères lors de la mise en silence du X inactif pour la compensation de dose chez les femelles (Avner and Heard 2001; Brockdorff 2002; Chow, Yen et al. 2005) mais également durant la différenciation des cellules lymphoïdes (pour revue (Gyory and Minarovits 2005)).

L'hétérochromatine constitutive, quant à elle, provient essentiellement d'éléments génétiques mobiles et de répétitions en tandem aussi appelées séquences satellites (SAT) qui représentent chez la drosophile près d'un tiers du génome. Ces séquences satellites sont retrouvées principalement autour des centromères ainsi que dans les régions télomériques (Grewal and Elgin 2002; Grewal and Moazed 2003). Elles sont essentielles pour la ségrégation des chromosomes, la stabilité du génome (Wallrath 1998) et semblent également jouer un rôle dans la sénescence cellulaire (Gaubatz and Cutler 1990; Rudert, Bronner et al. 1995).

I.3.2. Hétérochromatine et variéation d'effet de position

Un phénomène majeur associé à l'hétérochromatine est l'inactivation par variéation d'effet de position (P.E.V.). Celle-ci se produit lorsque des gènes euchromatiniens sont, du fait de réarrangements chromosomiques, relocalisés dans ou au voisinage immédiat de blocs d'hétérochromatine (Henikoff 1990; Weiler and Wakimoto 1995). Ce phénomène est également observé lors de l'insertion de transgènes euchromatiniens à proximité de l'hétérochromatine. De la même manière, des gènes normalement situés dans des régions d'hétérochromatine sont inactivés si on les transpose dans un contexte d'euchromatine, ce qui démontre la nécessité de maintenir une structure hétérochromatinienne pour leur expression. Ceci est illustré chez la drosophile par les gènes essentiels *light* (Devlin, Bingham et al. 1990; Devlin, Holm et al. 1990) et *rolled* (Eberl, Duyf et al. 1993) qui requièrent la protéine HP1 pour leur expression (Lu, Emtage et al. 2000).

De fait, la nécessité du facteur HP1, généralement considéré comme un répresseur transcriptionnel, pour l'expression de gènes essentiels tel que le gène codant Rpl15, une protéine de la particule ribosomale (Schulze, Sinclair et al. 2005), met à bas un des dogmes du code des histones. Le rôle d'HP1 n'est donc pas limité à l'inactivation transcriptionnelle mais cette protéine peut également avoir une fonction dans l'activation de la transcription, non seulement dans l'hétérochromatine (Hearn, Hedrick et al. 1991; Lu, Em-

tage et al. 2000; Cryderman, Grade et al. 2005) mais aussi dans l'euchromatine (Kellum 2003; Piacentini, Fanti et al. 2003). Le code ne peut donc pas être considéré tel quel, mais dépend du contexte particulier et semble spécifique non pas d'un type de chromatine (hétérochromatine *versus* euchromatine) mais d'un gène ou d'un groupe de gènes donné et la composition nucléoprotéique ainsi que la chronologie de recrutement de ces protéines jouent un rôle dans cette spécificité.

La découverte récente que l'isoforme γ d'HP1 (HP1 γ) s'associe aux régions transcriptionnellement actives confirme une fois de plus l'ambivalence d'HP1 (Vakoc, Mandat et al. 2005). Ces expériences révèlent notamment que les sites de fixation d'HP1 γ dans l'euchromatine sont enrichis en H3K9 méthylées (modification unanimement acceptée comme une empreinte de l'hétérochromatine répressive) et que, à la fois cette modification et la protéine HP1 γ sont rapidement perdues après arrêt de la transcription. Ceci identifie clairement la méthylation d'H3K9 comme une marque des régions transcrites chez les mammifères (plus précisément dans ces travaux elle apparaît associée à l'élongation de la transcription). Plus intrigant encore, sur les régions actives en transcription, la méthylation de la lysine 9 de H3 est associée à une autre marque épigénétique, la méthylation de la lysine 4, alors que ces deux modifications sont mutuellement exclusives *in vitro* (Zhang and Reinberg 2001). L'ensemble de ces données attire une fois de plus l'attention sur la complexité du code et sur le danger de sa simplification. Des généralisations qui associent l'hétérochromatine à un enrichissement en H3K9 méthylées et HP1 ou qui caractérisent l'euchromatine par la seule présence d'H3K4 méthylées sont non seulement réductrices mais fausses *in vivo*. Le code des histones apparaît donc comme beaucoup plus complexe que ce que les premiers résultats laissaient entendre et il passe non pas par la lecture de modifications prises individuellement mais par l'interprétation précise de combinaisons de modifications qui définissent des états locaux de chromatine. Ainsi, comme il est fréquent qu'une information épigénétique soit renforcée par la synergie entre deux modifications pour établir un état chromatinien donné, il est tout à fait possible de retrouver dans une même région chromatinienne des modifications apparemment contradictoires. La coexistence de fonctions antagonistes permet, par la balance dynamique qu'elles établissent, de définir un équilibre entre répression et activation. La présence au sein d'un même complexe d'une histone acétyltransférase (CBP) et d'une histone méthyltransférase de la lysine 9 d'H3 (Vandel and Trouche 2001) en est une illustration frappante.

Une autre des caractéristiques de l'hétérochromatine est sa réplication tardive et sa sous-réplication dans les cellules des glandes salivaires des larves de drosophile. Dans ces tissus, elle est largement sous représentée et forme le chromocentre des chromosomes géants polyténisés. Ces derniers correspondent à des chromosomes résultant de l'endoréplication (duplication multiple de chromosomes homologues appariés, sans division cellulaire et sans séparation ni des chromosomes ni des chromatides) ([Zhimulev 1999](#)) (voir annexe 3). Bien que cette caractéristique soit connue depuis longtemps, les mécanismes qui conduisent à cette sous représentation des séquences d'hétérochromatine pendant le processus de polyténisation restent mal connus.

I.3.3. Hétérochromatine péricentrique et variégation de *white-mottled*

L'hétérochromatine péricentrique du chromosome X de la drosophile s'étend sur plus de 11 millions de paires de bases et est principalement constituée par la répétition d'une séquence complexe de 359 paires de bases baptisée séquence satellite III (SAT III). Ces séquences se caractérisent par leur composition nucléotidique fortement biaisée (65% de paires de bases dA•dT), caractéristique qui, comme nous le verrons, n'est pas sans conséquences sur la structure même de la double hélice d'ADN. Ces caractéristiques structurales des séquences A•T riches influencent à leur tour la nature des facteurs protéiques et molécules (naturelles ou synthétiques) capables d'interagir avec elles.

Un des intérêts majeurs de l'étude de ces régions repose sur le fait que les séquences satellites III sont les seules séquences satellites de type alpha chez la drosophile. De telles séquences étant retrouvées dans les régions péricentriques chez tous les vertébrés (pour revue ([Masumoto, Nakano et al. 2004](#))), le chromosome X de la drosophile est un bon modèle pour l'étude des mécanismes dont elles sont le siège.

De plus, la compréhension des bases moléculaires du phénomène de P.E.V. sont d'une grande utilité pour l'étude des mécanismes de compartimentalisation du génome. En effet, l'existence de ce phénomène de variégation d'effet de position suppose que dans les contextes réarrangés, l'observation d'une inactivation stochastique de gènes euchromatiniens reflète l'invasion du locus inactivé par une structure d'hétérochromatine transcriptionnellement répressive. C'est l'interprétation généralement admise et cette capacité de l'hétérochromatine de s'étaler *en cis* à partir d'un point de nucléation ainsi que les conséquences de cet étalement ont été largement décrites chez la levure ([Lu, Ma et al. 1998](#);

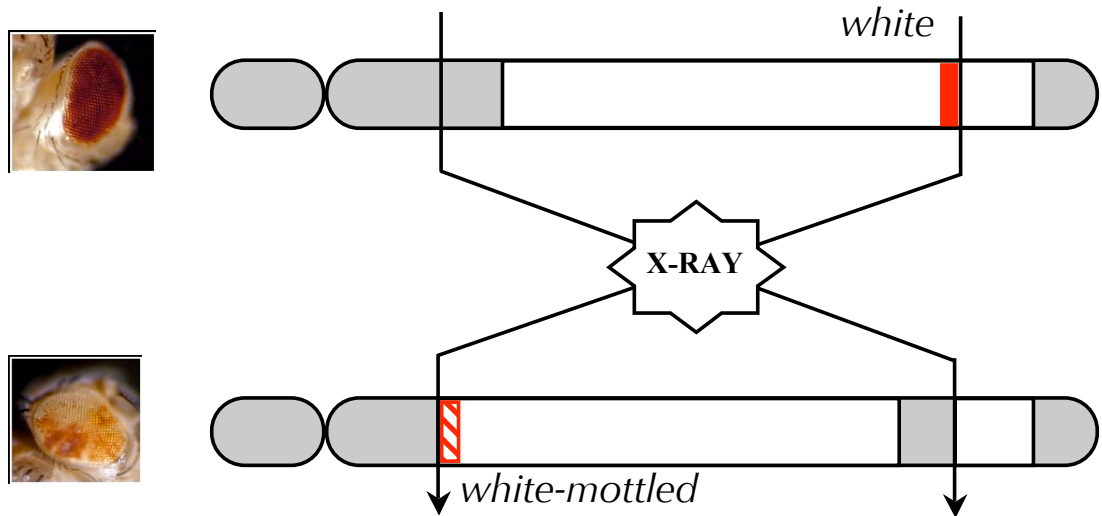


Figure 16 : Représentation schématique de l'inversion *In(1)wm4h*

Dans la lignée sauvage (en haut), le gène *white* (en rouge) qui code un transporteur de pigment essentiel à la coloration rouge normale des yeux (photo en haut à gauche) est localisé à l'extrémité du bras long du chromosome X. Dans la lignée *In(1)wm4h*, l'inversion chromosomique dont les points de cassures sont représentés par l'intersection avec les flèches brisées juxtapose l'allèle de *white* à proximité de l'hétérochromatine péricentrique (en gris). L'inactivation stochastique de *white* dans certaines cellules ou groupes de cellules par l'hétérochromatine conduit à un phénotype bigarré (photo du bas). L'allèle de *white* ainsi relocalisé dans la lignée *In(1)wm4h* a, du fait de ce phénotype caractéristique, été appelé *white-mottled* et est représenté par un rectangle hachuré en rouge.

Meneghini, Wu et al. 2003; van Leeuwen and Gottschling 2003). Ce modèle suppose, qu'*in vivo*, l'expansion de l'hétérochromatine soit stoppée. Deux mécanismes sont envisageables, le premier, passif, reposerait sur l'épuisement d'un des facteurs d'assemblage de l'hétérochromatine (ce que suggère l'effet de dose observé pour les modificateurs de PEV décrits ci-dessous). Alternativement, on peut envisager que l'hétérochromatine soit confinée par la présence de barrières, dont les déterminants pourraient être la séquence d'ADN ou la présence de certaines marques épigénétiques, ces barrières physiques seraient alors le siège d'une compétition entre facteurs répresseurs, activateurs (Suka, Luo et al. 2002; Lam, Pazin et al. 2005) et isolants (éléments frontières (Zhao, Hart et al. 1995; Cuvier, Hart et al. 1998; Hart, Cuvier et al. 1999; Cuvier, Hart et al. 2002)). Ces deux modèles ne sont d'ailleurs pas mutuellement exclusifs, récemment, il a en effet été démontré que, chez l'homme, la surexpression de la protéine CENPA (variant centromérique de l'histone H3) conduisait à l'expansion du domaine centromérique sur les régions d'hétérochromatine avoisinantes soulignant la nature dynamique de ce domaine chromosomique. Cette surexpression de CENPA conduisait à une perte d'H3K9 diméthylées mais pas triméthylées suggérant que cette dernière modification participe à la définition de cette frontière (Lam, Boivin et al. 2006).

Dans le contexte spécifique de la lignée modèle de drosophile *In(1)wm4h* (Rorth, Szabo et al. 1998), le gène *white*, codant un transporteur de pigments essentiel à la coloration rouge normale des yeux, est juxtaposé au bloc d'hétérochromatine péricentrique du chromosome X suite à une inversion chromosomique induite par irradiation aux rayons X (voir figure 16). Dans cette nouvelle localisation, l'expression de l'allèle du gène *white* nommée *white-mottled* est conditionnée par la structure hétérochromatinienne avoisinante ce qui conduit à sa variégation. Bien que ce phénomène soit connu depuis plus de 75 ans, ses bases moléculaires restent aujourd'hui encore peu comprises. Le niveau d'expression de l'allèle *white-mottled* varie au sein d'une population d'un individu à l'autre. Certains individus présentent un phénotype semblable à celui des individus sauvages (yeux rouges où seules quelques facettes sont blanches), d'autres, au contraire, possèdent des yeux très pâles où l'expression de *white* semble restreinte à quelques cellules alors que la majorité des individus d'une génération donnée présente un phénotype bigarré caractéristique.

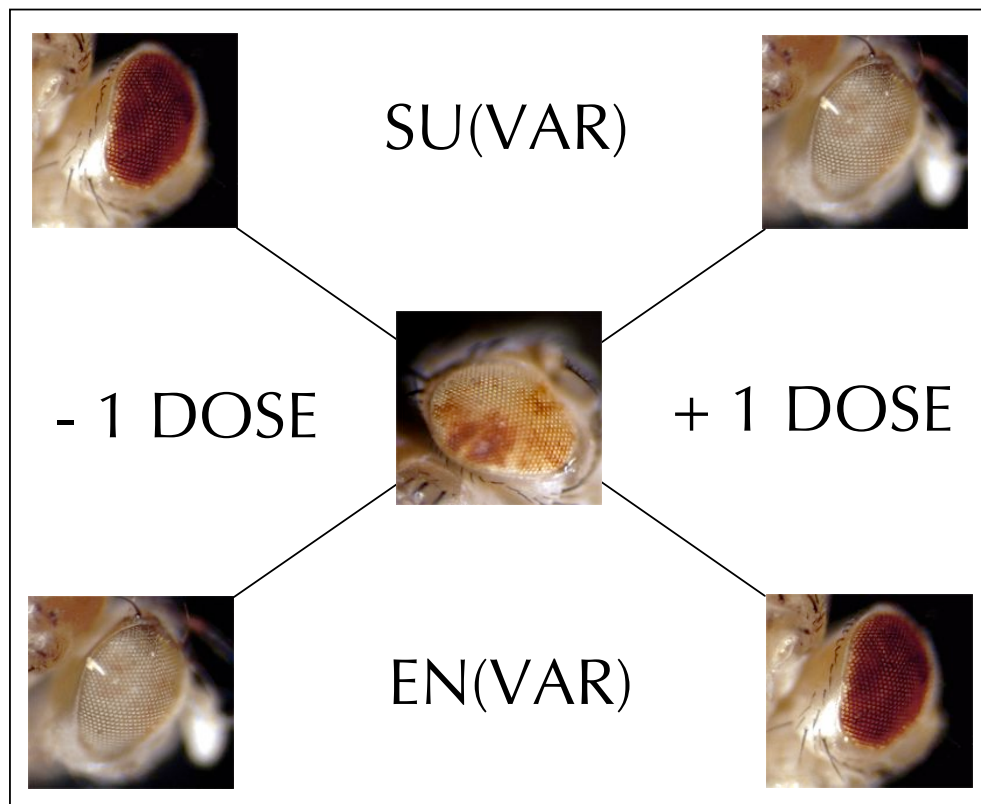


Figure 17 : Les modificateurs de PEV

Ce sont le plus souvent des gènes identifiés chez la drosophile et dont la mutation induit une modification de la variégation d'effet de position de l'allèle *white-mottled* dans la lignée *In(1)wm4h* (photo centrale).

La mutation d'un gène suppresseur de PEV -Su(Var)- conduisant à une haploinsuffisance (- 1 DOSE) de son produit -SU(VAR)- induit une suppression de PEV donc une restauration de l'expression de *white-mottled* et de la coloration rouge de l'œil (en haut à gauche). A l'inverse l'expression d'une copie surnuméraire de ce gène (+ 1 DOSE) renforce la mise en silence de *white-mottled* par l'hétérochromatine se traduisant par un œil majoritairement blanc (en haut à droite). A l'inverse, la mutation d'un gène enhancer de PEV augmente le *silencing* transcriptionnel alors que sa surexpression rétablit l'expression de *white-mottled* suggérant que les EN(VAR) sont des protéines intervenant dans la dérégulation ou l'activation transcriptionnelle alors que les protéines SU(VAR) participent à la répression transcriptionnelle par assemblage d'une structure de type hétérochromatine.

Cette répartition est retrouvée à chaque génération et est indépendante du phénotype des progéniteurs. En effet, la descendance du croisement entre deux individus présentant un des phénotypes extrêmes décrit ci-dessus (deux individus ayant les yeux majoritairement rouges *i.e.* présentant une faible PEV ou deux individus présentant une forte PEV *i.e.* des yeux majoritairement clairs) présente une distribution similaire des phénotypes centrée autour d'un phénotype bigarré moyen.

Le fait que le phénotype des parents n'influe pas sur la distribution phénotypique de leur descendance suggère que cette information épigénétique n'est pas transmise au cours de la méiose, néanmoins l'héritabilité clonale du caractère « ON/OFF » de *white-mottled* indique sa transmissibilité en mitose.

Un facteur majeur influençant la répartition phénotypique est la dose de certaines protéines dans la cellule. Les gènes codant pour des protéines dont la dose influe sur le phénotype de PEV sont appelés modificateurs de PEV. Le criblage dans la lignée *white-mottled* de ces modificateurs de PEV fût une des étapes initiales dans la compréhension des bases moléculaires de l'assemblage d'un compartiment hétérochromatinien et dans la découverte du code des histones.

I.3.3.1. Les modificateurs de PEV

Les modificateurs de PEV sont les gènes dont la mutation affecte le phénotype de PEV. Plus particulièrement, ce terme est employé pour décrire les gènes identifiés à l'origine chez la drosophile par leur aptitude à modifier la variéation de l'allèle *white-mottled* dans la lignée modèle *In(1)wm4h* (Rorth, Szabo et al. 1998). Ils se rangent en deux catégories distinctes: les supprimeurs de variéation *Su(Var)* et les enhanceurs de variéation *En(Var)* en fonction du phénotype induit par leur mutation. Par la suite nous nous intéresserons aux supprimeurs dominants de PEV codants pour des protéines essentielles intervenant dans le processus d'assemblage de l'hétérochromatine (voir figure 17).

Les enhanceurs de variéation sont, comme leur nom l'indique, des gènes dont la mutation entraîne une augmentation de la variéation de l'allèle *white-mottled*. L'haploinsuffisance du produit d'un de ces gènes provoque une aggravation de la PEV, donc de l'inactivation de *white-mottled* alors que son expression ectopique conduit à une

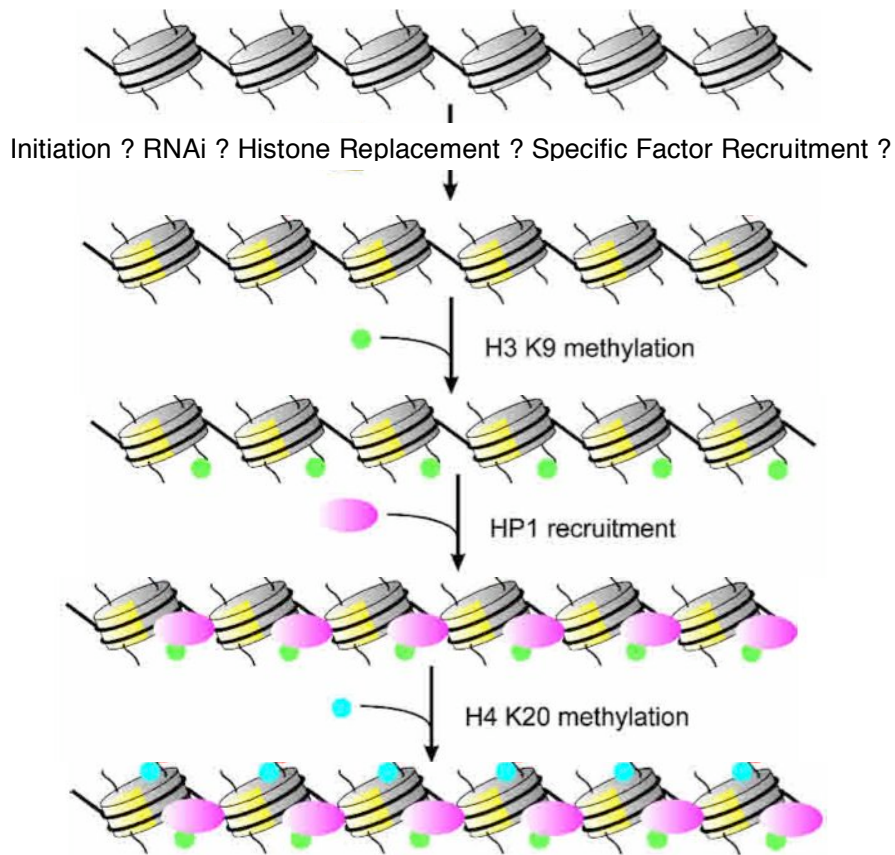


Figure 18 : Modèle d'assemblage de l'hétérochromatine péricentrique

Les étapes tardives d'assemblage d'un compartiment d'hétérochromatine sont aujourd'hui bien connues. Elles impliquent le recrutement d'activités histones désacétylases (HDAC) et méthyltransférases (HMT) spécifiques d'H3K9. La méthylation d'H3K9 permet le recrutement d'HP1 qui permet à son tour le recrutement de SU(VAR)4-20 l'HMT qui établit la méthylation d'H4K20. Par son interaction avec SU(VAR)3-9 l'HMT spécifique d'H3K9, HP1 permet l'expansion spatiale du domaine d'hétérochromatine par la modification des nucléosomes voisins.

Selon le compartiment d'hétérochromatine, l'étape d'initiation de cet assemblage peut faire intervenir des petits ARN (répression de transgènes *miniwhite*), le recrutement de la machinerie peut être assurée par un facteur spécifique d'un groupe de gènes (régulation au cours du cycle cellulaire par le système E2F/Rb) ou encore par l'incorporation spécifique d'un variant d'histone (Cid, H2Av, CENPA) mais demeure une question ouverte dans le cas de l'hétérochromatine péricentrique.

suppression de la PEV. Ces données suggèrent que les produits des gènes enhancers de variégation favorisent l'expression du gène *white* dans le contexte de cette inversion. Il apparaît donc que cette famille de gènes *En(var)* code des antagonistes de la mise en silence ou des activateurs transcriptionnels capables de surmonter la mise en silence par l'hétérochromatine.

Les supprimeurs de variégation, quant à eux, sont des gènes dont la mutation induit une suppression de la PEV. À l'état hétérozygote, ces mutations conduisent donc à la suppression de la variégation de l'allèle *white-mottled* se traduisant par une restauration de la coloration rouge de l'œil. À l'inverse, l'expression d'une copie surnuméraire d'un gène *Su(Var)* augmente de manière drastique la variégation de l'allèle *white-mottled* allant dans les cas les plus extrêmes à l'abolition quasi complète de son expression. Ces données phénotypiques suggèrent que les gènes supprimeurs de PEV codent des protéines intervenant dans l'inactivation transcriptionnelle médiée par l'hétérochromatine. L'importance de ces facteurs est soulignée par leur caractère essentiel, la mutation homozygote de ces gènes étant souvent létale précocement au cours du développement.

I.3.3.2. Mode d'assemblage de l'hétérochromatine

De nombreux travaux ont permis d'élucider la nature des mécanismes mis en oeuvre au cours de l'assemblage d'un domaine hétérochromatinien et d'en proposer un modèle (voir figure 18 et (Grewal and Moazed 2003)). Comme indiqué précédemment et malgré l'accumulation de données contradictoires (voir plus haut), la nature des modifications post-traductionnelles portées par la lysine 9 de l'histone H3, est, en première analyse, un indicateur relativement fiable du type de chromatine. Sous forme acétylée, ce résidu corrèle généralement avec une chromatine "ouverte" et permissive pour la transcription; sous sa forme méthylée, elle est une marque épigénétique de l'hétérochromatine. La transition d'une structure euchromatinienne vers une structure hétérochromatinienne répressive impliquerait donc, dans la majorité des cas étudiés jusqu'ici, une transition d'une forme acétylée vers une forme méthylée de la lysine 9 de l'histone H3. Cette vision est soutenue par la démonstration que le ciblage de SUV39H1, l'histone méthyltransférase spécifique d'H3K9 réprime la transcription (Stewart, Li et al. 2005) bien qu'une modération s'impose au vu des travaux récents qui lient la méthylation d'H3K9 au processus d'élongation du transcrit ARN (Vakoc, Mandat et al. 2005; Lomberk, Bensi et al. 2006).

Bien que des incertitudes subsistent quant à l'étape d'initiation, les différentes étapes du processus d'assemblage de l'hétérochromatine au niveau des régions péricentriques du chromosome X chez la drosophile sont désormais mieux définies. Jusqu'à il y a peu, l'établissement d'un domaine d'hétérochromatine était décrit comme un processus en 4 étapes :

La première de ces étapes repose sur la machinerie d'interférence à l'ARN (RNAi) (pour revue [\(Montgomery 2004\)](#)). Sous ce terme est désigné un mécanisme par lequel des molécules d'ARN double-brin conduisent à la dégradation spécifique des molécules d'ARN homologues dans une cellule. Décrit initialement chez *C. elegans*, ce mécanisme est conservé chez tous les eucaryotes [\(Zamore 2001\)](#). Son implication dans le processus d'assemblage de l'hétérochromatine fût d'abord démontrée dans la levure à fission. En effet, chez *Schizosaccharomyces pombe*, la délétion des gènes codants les facteurs intervenants dans la voie RNAi (Dicer, Ago, RdRp) s'accompagne d'une expression aberrante de transcrits issus des répétitions de l'hétérochromatine centromérique et d'une levée de la répression de transgènes insérés dans l'hétérochromatine [\(Volpe, Kidner et al. 2002\)](#). Cette dérégulation est concomitante à une diminution du niveau de méthylation de la lysine 9 de l'histone H3. Par ailleurs, l'existence de transcrits correspondant aux répétitions péricentriques a été mise en évidence chez *S. pombe* [\(Reinhart and Bartel 2002\)](#) puis chez la drosophile [\(Aravin, Lagos-Quintana et al. 2003\)](#), ces petits ARN pourraient participer au sein du complexe RITS [\(Noma, Sugiyama et al. 2004; Verdel, Jia et al. 2004\)](#) aux étapes initiales de l'assemblage d'hétérochromatine. Ainsi, l'étude de mutants pour la machinerie RNAi chez la drosophile [\(Pal-Bhadra, Leibovitch et al. 2004\)](#) et chez les vertébrés [\(Fukagawa, Nogami et al. 2004\)](#) a achevé de confirmer le lien entre machinerie d'interférence ARN et mise en place de l'hétérochromatine comme processus conservé au cours de l'évolution.

La deuxième étape de ce processus correspond à la transition d'H3K9 d'un état acétylé vers un état méthylé. Celle-ci requiert l'action conjuguée de deux activités catalytiques. La première consiste en l'enlèvement du motif acétyl de la lysine et est assurée chez la drosophile par l'enzyme histone désacétylase HDAC1 (voir plus haut). Consécutivement à sa désacétylation, le résidu lysine est méthylé par l'histone méthyltransférase SU(VAR)-3-9 [\(Czermin, Schotta et al. 2001; Vaute, Nicolas et al. 2002; Schotta, Ebert et al. 2003\)](#). Sous sa forme méthylée, la lysine 9 de l'histone H3 permet le recrutement de la

protéine HP1 via son chromodomaine ce qui constitue la troisième étape du mécanisme (Bannister, Zegerman et al. 2001; Lachner, O'Carroll et al. 2001). HP1 et son compagnon SU(VAR)3-7 (Cleard, Delattre et al. 1997; Cleard and Spierer 2001; Jaquet, Delattre et al. 2002) recrutent à leur tour SU(VAR)3-9 et participent ainsi, de proche en proche, à la propagation de l'hétérochromatine par la modification des nucléosomes voisins tout en renforçant l'empreinte épigénétique de ces régions par le recrutement de l'enzyme SUV4-20, qui assure la triméthylation de la lysine 20 de l'histone H4 (Kourmouli, Jeppesen et al. 2004; Schotta, Lachner et al. 2004). Le rôle d'HP2 dans ce processus est encore mal connu. Cette protéine, compagnon d'HP1 (leurs localisations sont interdépendantes), est codée par un gène dont la mutation est associée à une suppression dose-dépendante de la variégation dans la lignée *In(1)wm4h*. Bien qu'elle contienne deux motifs A•T Hook, elle ne semble pas posséder de propriétés d'interaction directe avec l'ADN (Shaffer, Stephens et al. 2002; Stephens, Slawson et al. 2005) et sa localisation sur le chromocentre ne semble pas affectée par un traitement à l'aide de l'oligopyrrole P9 un mimétique des motifs A•T Hook (S. Elgin, communication personnelle ; voir plus loin pour P9 et le motif A•T Hook).

Une question majeure quant au processus d'assemblage de l'hétérochromatine péricentrique subsiste: Quel est le déterminant spécifique de l'assemblage de l'hétérochromatine sur les séquences satellites A•T riches qui constituent les régions péricentriques du chromosome X chez la drosophile ?

En effet, si l'existence de petits ARN correspondant en séquence aux répétitions satellites SAT III a été mise en évidence chez la drosophile ((Aravin, Lagos-Quintana et al. 2003) et Manfred Schmid 2001, non publié), l'origine exacte de ces transcrits n'a pas été formellement établie. On sait par exemple que de telles séquences sont retrouvées dispersées dans le génome à la fois dans des localisations euchromatiques sur le chromosome X mais aussi sur les autosomes (Losada and Villasante 1996). De plus, les petits ARN impliqués dans l'assemblage d'hétérochromatine agissant en *cis*, il n'est pas évident que les transcrits identifiés par Aravin proviennent d'une transcription bidirectionnelle des copies de ces séquences présentes au niveau des régions péricentriques. Ainsi il n'est pas possible de conclure que ces petits ARN sont responsables de l'initiation de l'assemblage d'un compartiment d'hétérochromatine sur les régions péricentriques. Il

semble en effet peu probable que la présence de promoteurs cryptiques au niveau de ces régions suffise à rendre compte de l'existence de ces transcrits.

Par ailleurs, il n'existe aucune démonstration expérimentale de l'implication de la machinerie d'interférence à l'ARN dans l'établissement d'une structure de type hétérochromatinienne dans les régions péricentriques du chromosome X. Si les mutations des gènes codants pour des facteurs intervenant dans la voie RNAi suppriment la PEV de transgènes *miniwhite* en tandem ([Dorer and Henikoff 1994](#); [Dorer and Henikoff 1997](#); [Pal-Bhadra, Leibovitch et al. 2004](#)), elles sont sans effet sur la PEV de *white-mottled* (résultats non montrés). Seule la mutation de *Dicer*, semble avoir un impact sur la PEV, non pas en provoquant sa suppression, mais plutôt en modifiant le patron d'expression de *white-mottled* qui d'une répartition « poivre et sel » (patches de cellules exprimant *white* dispersés) passe à une sectorisation des cellules exprimant ou non *white* (Pal-Bhadra, communication personnelle). Cette dernière observation semble refléter un impact de la mutation de *Dicer* sur le moment où est prise la décision d'inactiver l'allèle *white-mottled* plutôt qu'un effet direct sur la PEV. De récents travaux chez *Dictyostelium* suggèrent que chez cet organisme la localisation d'HP1 et H3K9me est indépendante de la machinerie de RNAi ([Kaller, Euteneuer et al. 2006](#)) ce qui indique que la dépendance de l'assemblage de l'hétérochromatine sur la machinerie d'interférence à l'ARN n'est pas conservé au cours de l'évolution et n'intervient pas dans l'assemblage de tous les compartiments hétérochromatiniens.

Une piste a été ouverte chez la levure où de nombreux travaux soulignent le rôle des homologues de la protéine humaine CENP-B ([Masumoto, Nakano et al. 2004](#)) et du variant de l'histone H3 centromérique CENP-A (respectivement Abp1, Cbh1 et Cbh2 pour CENP-B et Cse4p pour CENP-A) dans ce mécanisme. Par analogie avec ce qui est observé chez l'homme, où l'interaction entre CENP-B et les boîtes CENP-B des séquences satellites alphas et le recrutement consécutif de CENP-A sont essentiels à l'assemblage du kinétochore, les homologues de ces protéines chez la levure assureraient des fonctions identiques en permettant l'assemblage d'une structure hétérochromatinienne à partir des sites de nucléation constitués par les séquences A•T riches. Ceci est notamment suggéré par l'aptitude de ces protéines (Cse4p, Cbh1, Cbh2 et Abp1) à s'associer spécifiquement aux séquences satellites de l'hétérochromatine centromérique chez la levure et le fait qu'elles constituent des composants essentiels des centromères

leur présence étant nécessaire à la désacétylation d'H3K9 et au recrutement de Swi6, l'homologue d'HP1 ([Meluh, Yang et al. 1998](#); [Nakagawa, Lee et al. 2002](#)). Jusqu'à il y a peu, l'absence d'homologues de CENP-B chez la drosophile supposait l'existence, chez cet organisme, d'un autre type de facteur assurant cette fonction de nucléation d'un domaine hétérochromatinien au niveau des séquences satellites riches en dA•dT.

Récemment, l'équipe de Victor Corces a démontré que le variant d'histone H2Av jouait un rôle, non seulement dans le silencing des gènes homéotiques par les complexes Polycomb, mais aussi dans l'établissement de l'hétérochromatine péricentrique chez la drosophile. Le recrutement de ce variant d'histone non centromérique sur les régions à hétérochromatiser interviendrait en amont de la méthylation d'H3K9. Il permettrait de plus l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4 identifiée par ce travail comme une nouvelle marque épigénétique de l'hétérochromatine ([Swaminathan, Baxter et al. 2005](#)). Pour preuve, la mutation d'H2Av entraîne une diminution de la méthylation d'H3K9 et du recrutement d'HP1 ainsi que la suppression de la PEV de l'allèle *white-mottled*. H2Av semble également intervenir dans le recrutement des répresseurs Polycomb en aval de la méthylation d'H3K27 par l'histone méthyltransférase Enhancer of zeste E(z) ([Cao, Wang et al. 2002](#); [Czermin, Melfi et al. 2002](#)). En plus des régions péricentriques et des sites Polycomb, H2Av pourrait être recrutée dans l'euchromatine pour la mise en silence de transgènes portant des copies multiples du gène *miniwhite*, par la formation de sites d'hétérochromatine ectopiques ([Dorer and Henikoff 1994](#); [Dorer and Henikoff 1997](#); [Swaminathan, Baxter et al. 2005](#)). Malgré ces nouvelles indications, l'identité du déterminant de localisation de ce variant H2Av sur les séquences A•T riches demeure une question ouverte.

I.3.3.3. D1 et fonction d'initiation.

Les travaux de l'équipe ont permis de proposer D1 ([Aulner, Monod et al. 2002](#)), l'unique représentant de la famille des protéines Multi A•T Hook (MATH) ([Amirand, Viari et al. 1998](#); [Aravind and Landsman 1998](#); [Beaujean, Bouniol-Baly et al. 2000](#); [Reeves 2001](#)) chez la drosophile, comme candidat pour cette fonction d'initiation.

Cette protéine de 37 kDa est essentiellement constituée par la répétition du motif A•T Hook ([Reeves and Nissen 1990](#)) qui lui permet de s'associer spécifiquement et avec une haute affinité aux régions A•T riches. En effet, ce motif en forme de croissant plan

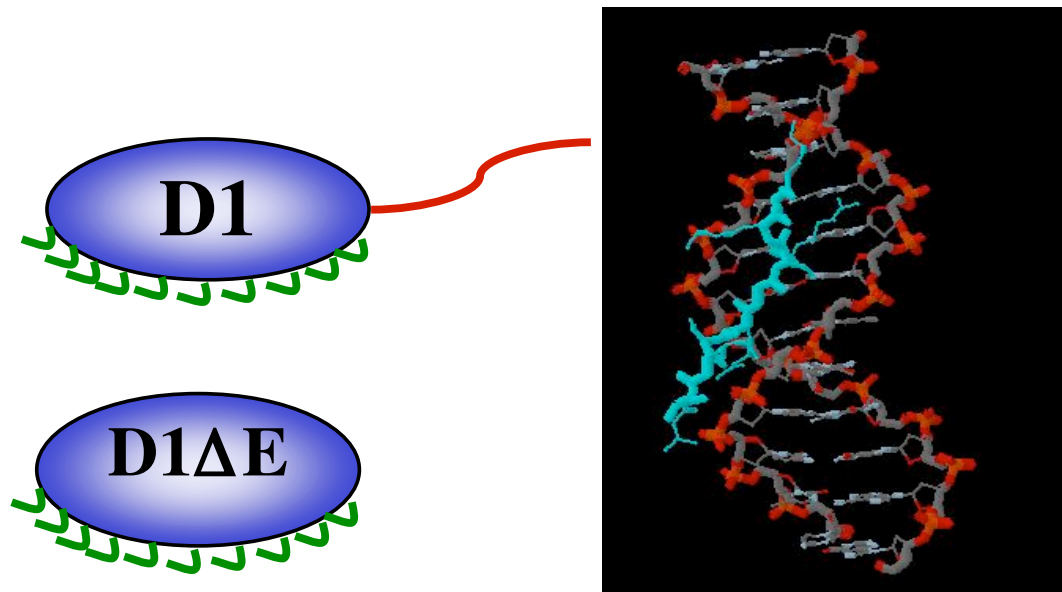


Figure 19 : Représentation schématique de la protéine D1

La protéine D1 est composée de deux modules. La région amino-terminale (ovale bleu) est constituée par la répétition des motifs A•T hook (crochets verts) qui permettent son interaction avec les séquences satellites A•T riches. L'encadré à droite représente l'interaction d'un motif A•T hook unique (en turquoise) avec le petit sillon d'une double hélice d'ADN (en rouge et gris). L'extrémité carboxy-terminale de cette protéine est enrichie en acides aminés acides (le domaine carboxy-terminal acide est ici représenté en rouge). Ce domaine d'interaction protéique essentiel à la fonction de D1 est absent dans la protéine mutante D1ΔE (en bas).

permet une interaction de D1 avec les séquences riches en paires de bases dA•dT par le biais du petit sillon. Comme nous l'avons souligné plus haut, ces séquences sont caractérisées sur le plan structural par une courbure de l'axe de l'hélice et par leur petit sillon étroit et profond. Outre ses 10 motifs A•T Hook la protéine D1, porte sur son extrémité carboxy-terminale de nombreux résidus acides impliqués dans des interactions protéines-protéines (voir figure 19).

La protéine D1 a tout d'abord été identifiée du fait de son enrichissement au niveau des séquences SAT III A•T riches (Rodriguez Alfageme, Rudkin et al. 1980) et dans une moindre mesure sur les satellites I (répétitions de la séquence (AATAT)_n). Son implication dans la formation d'une structure hautement compacte, autrement dit d'hétérochromatine, sur les séquences satellites a immédiatement été suggérée (Levinger and Varshavsky 1982; Levinger and Varshavsky 1982; Levinger 1985).

Mais ce n'est que 20 ans plus tard que la démonstration que le gène codant D1 est un suppresseur de P.E.V. est venu conforter cette idée. En effet, sa mutation à l'état hétérozygote (+/EP473) provoque une suppression de la PEV de l'allèle *white-mottled* alors qu'elle est létale à l'état homozygote après épuisement du stock maternel de la protéine. D1 est donc une protéine essentielle et sa surexpression entraîne une augmentation de la variégation de *white-mottled* (Aulner, Monod et al. 2002). Ces caractéristiques et le phénotype d'haplo-suppresseur, triplo-enhanceur indiquent que D1 joue un rôle important dans l'assemblage de l'hétérochromatine.

Par ailleurs, cette même étude a révélé que l'expression de la protéine D1ΔE (forme de D1 délétée de son domaine carboxy-terminal acide) conduit à une suppression de la PEV. Compte tenu que cette protéine tronquée possède toujours ses 10 motifs A•T Hook permettant son interaction avec les séquences A•T riches, elle agit comme un dominant négatif de D1 et la suppression de la PEV résulte d'une compétition entre D1ΔE et la protéine D1 endogène pour la fixation aux séquences SAT III. Ces derniers résultats soulignent le rôle essentiel du domaine carboxy-terminal de D1 dans le recrutement de la machinerie d'assemblage de l'hétérochromatine (Aulner, Monod et al. 2002) (voir figure 20).

I.3.3.4. Les modificateurs synthétiques de PEV

I.3.3.4.1. MATH20

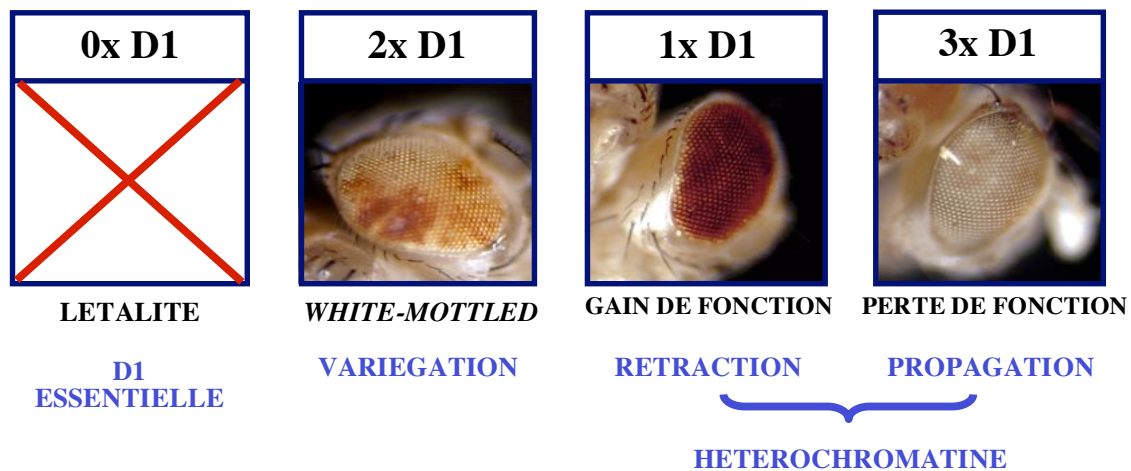


Figure 20 : Protéine D1 et modification dose-dépendante de la PEV de *white-mottled*

La protéine D1 est une protéine essentielle dont la mutation à l'état homozygote est létale à épuisement du stock maternel de protéine. L'happloinsuffisance de D1 (mutation EP473 à l'état hétérozygote) induit une suppression de la PEV qui se traduit par la restauration d'une coloration rouge normale de l'œil (la quantité de protéine est indiquée sous la forme n x D1 où n représente la dose). À l'inverse, l'ajout d'une dose de D1 conduit à une augmentation de la PEV et une répression de l'expression de l'allèle *white-mottled*. Cet effet haplo-suppresseur, triplo-enhanceur de PEV est caractéristique des facteurs impliqués dans l'assemblage de l'hétérochromatine. Un tel phénotype est retrouvé pour la protéine HP1 qui reconnaît la lysine 9 de l'histone H3 méthylée ainsi que pour les protéines HDAC et SUVAR3-9 qui participent à réaliser cette modification. L'expression des protéines artificielles D1ΔE et MATH20 composées exclusivement de motifs A•T hook et dépourvues de la fonctionnalité de recrutement de partenaires protéiques portée par le domaine carboxy-terminal de D1 provoque également une suppression de la PEV selon un mécanisme de compétition avec la protéine D1 endogène pour la fixation aux séquences satellites III (voir figure suivante et texte).

MATH20 s'associe aux séquences A•T riches

Initialement développée dans l'équipe d'Ulrich Laemmli afin de démontrer la fonction des séquences SAR (Scaffold Associated Regions) riches en A•T dans la dynamique des chromosomes ([Strick and Laemmli 1995](#)), la protéine artificielle MATH20 est constituée par la répétition de 20 motifs A•T Hook ([Reeves and Nissen 1990](#)) issus de la protéine HMG-A humaine. Les auteurs de ce travail ont proposé que les SAR jouent un rôle dans la définition des boucles de chromatine en assurant l'attachement de celles-ci à l'échafaudage protéique qui constitue en métaphase le « squelette » des chromosomes et permet leur assemblage. En accord avec cette hypothèse, les séquences SAR constituent un site préférentiel d'interaction pour la protéine topoisomérase II, cette dernière assurant un rôle majeur dans la condensation des chromosomes ([Adachi, Luke et al. 1991](#)).

De par leur composition nucléotidique particulière (les SAR sont composées de nombreux enchaînements homopolymériques dA•dT), ces séquences possèdent des caractéristiques structurales typiques des séquences A•T riches et communes aux séquences satellites III. Ces caractéristiques sont une courbure intrinsèque de la double hélice et un sillon mineur à la fois étroit et profond. L'importance de ces propriétés structurales pour l'attachement des séquences SAR au « scaffold » est souligné par les travaux de l'équipe de Laemmli ([Adachi, Kas et al. 1989](#); [Kas, Izaurralde et al. 1989](#)).

En effet, l'utilisation de la distamycine ([Baraldi, Nunez Mdel et al. 2004](#)), un antibiotique isolé du champignon *Streptomyces distallicus* et capable de s'insérer dans le petit sillon des séquences riches en A•T, provoque la dissociation des interactions entre les séquences SAR d'une part et la topoisomérase II et l'histone H1 d'autre part ([Adachi, Kas et al. 1989](#)). Compte tenu du mode de reconnaissance des SAR par la distamycine, Strick mit au point une stratégie basée sur la reconnaissance du petit sillon afin d'interférer au niveau des SAR avec les interactions protéines-ADN. De par l'homologie entre le motif A•T Hook et la distamycine, la protéine MATH20 est capable d'interagir avec une très haute affinité ainsi qu'une grande spécificité avec ces séquences riches en A•T. Utilisée pour titrer les séquences SAR cette protéine gêne la structuration des chromosomes mitotiques ainsi que, dans certaines conditions, leur condensation.

Expression de MATH20 et suppression de PEV dans la lignée de drosophile In(1)wm4h :

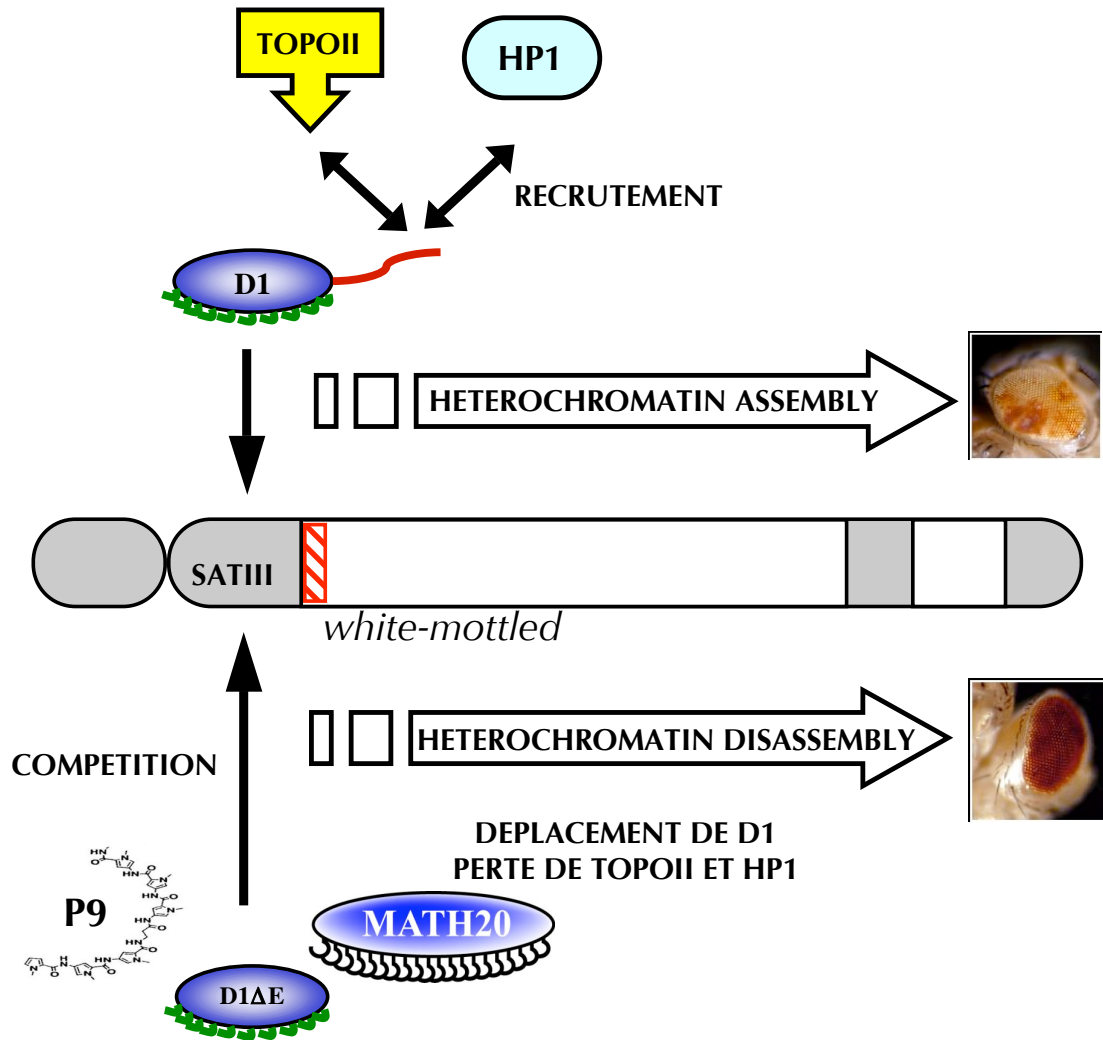


Figure 21 : Modèle d'initiation de l'assemblage de l'hétérochromatine péricentrique par la protéine MATH D1

Selon ce modèle, l'interaction entre D1 et les séquences satellites III via l'insertion du motif A•T hook dans le petit sillon des séquences A•T riches permet le recrutement des protéines HP1 et TOPOII via le domaine carboxy-terminal acide de D1. Le recrutement d'HP1 permettrait l'assemblage d'un compartiment d'hétérochromatine et, dans le contexte de l'inversion *In(1)wm4h*, l'inactivation stochastique de l'allèle *white-mottled*. L'expression de D1ΔE, une forme de D1 tronquée de son domaine carboxy-terminal agit comme un dominant négatif de D1 par compétition avec la protéine endogène pour la fixation aux séquences SATIII. Elle conduit à la suppression de PEV de *white-mottled* qui traduit la perte des protéines HP1 et TOPOII des séquences SATIII observée par immunofluorescence. L'expression de la protéine artificielle MATH20 composée exclusivement de 20 motifs A•T hook et le traitement par l'oligopyrrole P9 conduisent tous deux par un mécanisme similaire de compétition à la suppression de la PEV et la perte des marqueurs HP1 et TOPOII de l'hétérochromatine péricentrique. Image adaptée de (Susbielle *et al.* 2005).

Sur la base de ces résultats, Franck Girard a utilisé le système de ciblage mis au point par Bruno Bello chez Walter Gehring (Bello, Resendez-Perez et al. 1998) afin d'analyser, *in vivo*, l'influence sur les SAR de l'expression de MATH20 chez la drosophile (Girard, Bello et al. 1998). Un des résultats majeurs de ce travail est que l'expression de MATH20 dans les disques imaginaux d'oeil au troisième stade larvaire provoque la suppression de la PEV de l'allèle *white-mottled* dans la lignée *ln(1)wm4h*.

Suppression de PEV par MATH20 et perte de D1 au niveau des séquences SAT III :

Plus récemment les travaux menés dans notre équipe (Monod, Aulner et al. 2002) ont permis d'élucider le mécanisme de suppression de la PEV de *white-mottled* par MATH20. Une analyse à la fois *in vitro* et *in vivo* de l'interaction de MATH20 avec les séquences satellites III a permis de mettre en évidence une compétition entre la protéine Multi A•T Hook artificielle MATH20 et la protéine Multi A•T Hook endogène D1 pour la fixation sur les séquences satellites III. Ces deux protéines reconnaissent les mêmes sites comme le révèlent les expériences de protection à la DNase et l'expression de MATH20 conduit à une perte du marquage des satellites III par D1 *in vivo* (voir figure 21).

I.3.3.4.2. Polyamides

L'oligopyrrole P9 supprime la PEV de white-mottled :

L'oligopyrrole P9 appartient à la classe des polyamides, des polymères constitués par la répétition de noyaux pyrrole, imidazoles ou de combinaisons de ces deux motifs ou de leurs dérivés. Initialement développées par Dervan, ces molécules sont capables (tout comme la distamycine composée de trois noyaux pyrroles) d'interagir spécifiquement avec les séquences d'ADN via le petit sillon. Les efforts constants menés par Dervan et ses collaborateurs pour comprendre le mode d'interaction de ces composés avec l'ADN ont permis des améliorations notables dans leur conception aussi bien que dans leur production (Wemmer and Dervan 1997; Kielkopf, Baird et al. 1998; Kielkopf, White et al. 1998; Bremer, Szewczyk et al. 2000; Kielkopf, Bremer et al. 2000; Wurtz, Turner et al. 2001; Belitsky, Nguyen et al. 2002; Fattori, Kinzel et al. 2002; Dervan and Edelson 2003; Dudouet, Burnett et al. 2003; Melander, Burnett et al. 2004; Dervan, Doss et al. 2005). L'élucidation par cristallographie de la structure des complexes polyamide:ADN (Kielkopf, Baird et al. 1998; Kielkopf, White et al. 1998; Kielkopf, Bremer et al. 2000) a par ailleurs

permis à Dervan d'établir un code de reconnaissance des paires de bases Watson Crick par les polyamides (Wemmer and Dervan 1997; Dervan, Doss et al. 2005). Ces travaux ont donc ouvert la voie pour la synthèse de longs polyamides capables de reconnaître et de cibler virtuellement n'importe quelle séquence d'ADN avec une grande spécificité et une grande sélectivité. Les polyamides pouvant, à l'instar de la distamycine, (Adachi, Kas et al. 1989; Kas and Laemmli 1992) perturber les interactions ADN-protéines au niveau du petit sillon et l'essor de la chimie combinatoire offrant des possibilités croissantes de fonctionnalisation de ces composés, les opportunités de créer des outils hautement spécifiques rendent infini le nombre d'applications de ces molécules (Arndt, Hauschild et al. 2003; Melander, Burnett et al. 2004).

Sur la base de ces travaux et compte tenu de la difficulté d'étudier les séquences hautement répétées liée au manque d'outils adaptés, Laemmli et ses collaborateurs ont développé des polyamides conçus pour cibler spécifiquement les séquences satellites de la drosophile (Janssen, Cuvier et al. 2000; Janssen, Durussel et al. 2000). Parmi ces composés, le polyamide P9 cible les séquences satellites A•T riches (SAT I = (AATAT)_n et SATIII) et supprime la PEV de *white-mottled* lorsqu'il est ingéré par des larves au troisième stade de développement (Janssen, Cuvier et al. 2000). Ces travaux indiquent que P9 provoque une ouverture de la chromatine au niveau des séquences satellites III comme le révèle l'accessibilité accrue des sites de coupure par l'enzyme de restriction HaeIII et par la topoisomérase II. Ces résultats sont semblables à ceux déjà observés avec la distamycine (Kas and Laemmli 1992; Bell, Kittler et al. 1997). La corrélation entre ouverture de la chromatine et augmentation de l'expression de l'allèle *white-mottled* suggère que les polyamides peuvent être utilisés pour activer ou réactiver des gènes mis en silence par l'hétérochromatine.

Suppression de PEV par P9 et compétition avec D1 pour la fixation aux satellites III :

Les travaux engagés dans l'équipe ont permis, comme dans le cas de l'expression de MATH20, d'élucider le mécanisme moléculaire impliqué dans la suppression de la PEV après traitement par l'oligopyrrole P9. Par des méthodes de protection à la DNase, Nous avons ainsi pu montrer que les sites d'association de P9 sur les satellites III *in vitro* sont les mêmes que ceux reconnus par D1 et MATH20. De plus, par suite aux expériences de retard sur gel / compétition, il apparaît que P9 est capable de déplacer spécifiquement la

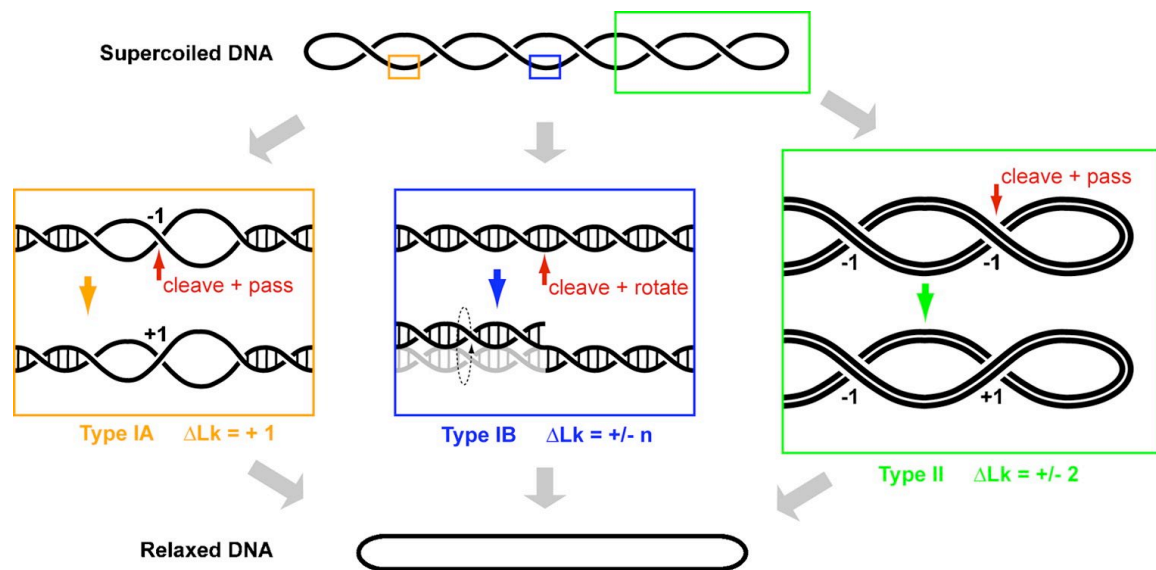


Figure 22 : Topoïsomérase et réactions de topoïsomérisation

Il existe trois types de topoïsomérase capables de modifier la superhélicité de l'ADN selon trois mécanismes distincts.

Les topoïsomérase de type IA (à gauche) catalysent le passage d'un brin de la double hélice au travers du second brin (le brin clivé).

Les topoïsomérase de type IB (au centre) clivent un brin de la double hélice ce qui permet la rotation libre du brin clivé autour du brin demeuré intact.

Enfin, les topoïsomérase de type II (à droite) réalisent le clivage des deux brins d'une hélice d'ADN et le passage d'une double hélice à travers le duplex clivé.

ΔLk représente la variation du nombre de liaison pour un cycle catalytique ; sa valeur traduit la modification de la contrainte topologique.

Image tirée de (Corbett et Berger 2004).

protéine D1 d'un monomère SAT III. Plus frappant encore, le traitement de cerveaux de larves de drosophile perméabilisés puis incubés en présence d'oligopyrrole P9 provoque une totale délocalisation de la protéine D1 des séquences cibles de P9 (SATIII puis SATI) comme révélé par immunomarquage (Blattes, Monod et al. 2006) (voir figure 21).

Pris ensemble, ces résultats confirment le rôle essentiel assuré par D1 dans la mise en silence de l'allèle *white-mottled* par les séquences satellites III. De manière remarquable, dans chacun des cas présentés ci-dessus, la perte de D1 des séquences SAT III s'accompagne d'une délocalisation de la topoïsomérase II, une cible majeure des thérapies anti-tumorales. Comme nous le verrons dans la section suivante, l'identification de la topoïsomérase II comme composant fonctionnel de l'hétérochromatine, une des avancées majeures liée à nos travaux, éclaire d'un jour nouveau l'observation de son enrichissement sur les SAT III connue de longue date, mais pour lequel il n'était pas encore proposé d'explication (Kas and Laemmli 1992; Maeshima and Laemmli 2003).

I.4. Les topoïsomérases

I.4.1. Généralités

L'ancienneté phylogénétique et la conservation, à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes, des ADN topoïsomérases reflètent leur fonction vitale pour la biologie de la cellule. De leur activité dépendent aussi bien la structure que le maintien des génomes et sans elles, la réplication de l'ADN et la division cellulaire seraient impossibles. Elles interviennent dans virtuellement tous les processus qui impliquent l'ADN double brin (transcription, réplication, recombinaison homologue, condensation des chromosomes et ségrégation des chromatides sœurs).

Du fait de sa structure en double hélice, l'ADN est soumis à des contraintes conformationnelles de torsion. Lors de la transcription ou de la réplication, la nécessité pour les polymérase d'accéder à l'ADN surenroulé requiert que l'ADN soit relâché. Cette fonction est assurée dans la cellule par les topoïsomérases. On distingue deux types d'ADN topoïsomérases définis par la nature de la réaction qu'elles catalysent (voir figure 22).

Les topoïsomérases de type I sont des enzymes essentiellement monomériques qui réalisent des coupures simple brin transitoires qui permettent soit le passage d'une hélice au travers de la seconde (type IA) (Wang 1971) soit la rotation du duplex d'ADN autour du

brin demeuré intact (type IB) ([Champoux and Dulbecco 1972](#)). Cette réaction ne nécessite pas d'hydrolyse d'ATP. La fonction des ADN topoisomérases de type I est notamment requise lors de la réplication, de la transcription et de la recombinaison homologue.

Chez les eucaryotes, les topoisomérases de type II fonctionnent sous la forme de dimères et catalysent la rupture simultanée des deux brins de la double hélice. Il se forme alors un complexe covalent ADN-protéine qui permet le passage d'une double hélice au travers d'une autre ([voir figure 24](#)). Chaque cycle catalytique requiert l'hydrolyse de deux molécules d'ATP. L'activité de ces enzymes est essentielle à la viabilité cellulaire de par leur rôle dans la ségrégation des chromatides sœurs et lors de la condensation des chromosomes en mitose et en méiose ([DiNardo, Voelkel et al. 1984](#); [Sumner 1995](#)).

Les génomes des eucaryotes supérieurs codent cinq différentes topoisomérases, trois d'entre elles appartiennent au type I (topoisomérase I, III α et III β) et deux appartiennent au type II (topoisomérases II α et II β) (pour revue ([Wang 2002](#); [Cortes, Pastor et al. 2003](#); [Corbett and Berger 2004](#))).

I.4.2. Topoisomérase II

Si toutes les topoisomérases sont en mesure de résoudre le stress conformationnel induit par le surenroulement de l'ADN, seules les topoisomérases de type II sont capables de décaténer des duplex d'ADN. Cette activité de décaténation permet notamment la résolution des chromatides sœurs entrelacées à la suite de la réplication et est requise pour le remodelage chromatinien en mitose ([Null, Hudson et al. 2002](#)). L'altération de la fonction de la topoisomérase II conduit donc à un défaut de séparation des chromatides sœurs en anaphase (pour revue ([Porter and Farr 2004](#))).

En dehors de la mitose, la fonction des topoisomérases de type II est également requise pour la relaxation du surenroulement de l'ADN induit par le passage des hélicases lors de la transcription, surenroulement semblable à celui induit lors de la progression de la fourche de réplication.

Chez les vertébrés, on trouve deux isoformes de la topoisomérase II, chacune produite à partir d'un gène spécifique ([Drake, Zimmerman et al. 1987](#); [Drake, Hofmann et al. 1989](#); [Austin, Sng et al. 1993](#)). L'isoforme alpha de la topoisomérase II (TOPOII α) est une protéine de 170 kDa, l'isoforme beta (TOPOII β) est, quant à elle, une protéine de 180 kDa

(Horn, Crowley et al. 2002), les séquences en acides aminés de ces deux isoformes présentant 72% d'homologie.

La fonction de la topoisomérase II requiert sa dimérisation majoritairement sous la forme d'homodimères mais la formation d'hétérodimères a également été rapportée (Woessner, Mattern et al. 1991; Jensen, Andersen et al. 1996). Cette dimérisation nécessite la liaison de deux molécules d'ATP au niveau d'un domaine ATPase amino-terminal appelé domaine GHKL (Dutta and Inouye 2000). L'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP est utilisée pour le transfert et le passage de la double hélice intacte (aussi appelée segment T pour transféré) au travers de la double hélice clivée (segment G pour gate). La nécessité d'hydrolyser deux molécules d'ATP pour relâcher une molécule surenroulée est longtemps demeurée une énigme, une telle réaction de relaxation étant à priori favorisée énergétiquement. L'hypothèse proposée par Rybenkov (Rybenkov, Ullsperger et al. 1997), selon laquelle l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP permet à la topoisomérase II d'éloigner la réaction de topoisomérisation de l'équilibre, nécessite encore à ce jour une confirmation expérimentale (Maxwell, Costenaro et al. 2005).

L'expression de la topoisomérase II alpha mais pas de l'isoforme beta est régulée au cours du cycle cellulaire. Dans des cellules en prolifération, on détecte l'isoforme alpha en fin de phase G1 et son niveau dans la cellule augmente progressivement jusqu'à atteindre un pic à la transition G2/M (Woessner, Mattern et al. 1991). De plus le niveau d'expression de la topoisomérase II α corrèle avec le niveau de prolifération des cellules et est plus élevé dans les cellules tumorales que dans les cellules normales. Cette surexpression dans les cellules cancéreuses a fait de la topoisomérase II α une cible majeure dans les thérapies antitumorales (Walker and Nitiss 2002; Larsen, Escargueil et al. 2003; Baldwin and Osheroff 2005).

Chez la drosophile comme chez la levure, en revanche, un seul gène code pour une isoforme unique de la topoisomérase II (Goto and Wang 1984; Wyckoff, Natalie et al. 1989) qui s'accumule sur les centromères en prométaphase jusqu'au début de l'anaphase (Taagepera, Rao et al. 1993; Rattner, Hendzel et al. 1996; Krasikova, Kulikova et al. 2004).

La topoisomérase II (TOPOII) est retrouvée à la fois associée aux chromosomes métaphasiques en mitose et en méiose ainsi qu'à la « matrice nucléaire » des noyaux en in-

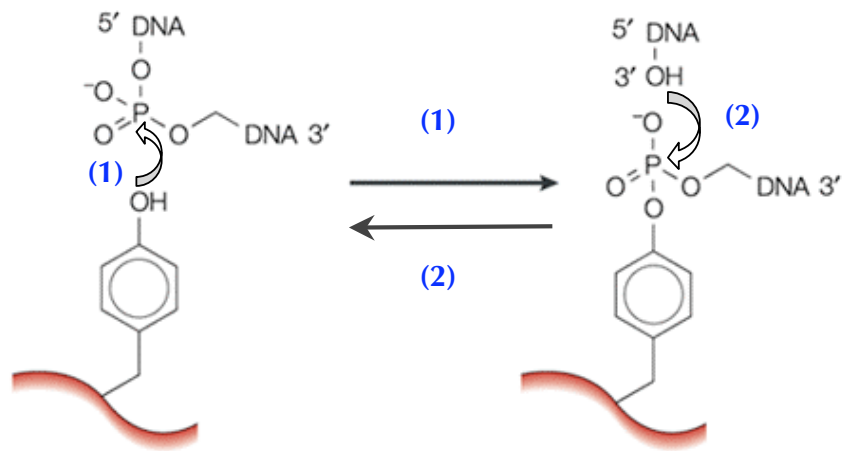


Figure 23 : Réaction de transtérification catalysée par les topoïsomérase

Le clivage est réalisé par une réaction de transtérification qui est initiée lors de l'attaque du pont phosphodiester qui relie deux nucléotides dans la molécule d'ADN par la tyrosine active du cycle catalytique de l'enzyme (1). Le pont phosphotyrosine covalent formé lors de cette réaction de transtérification est rompu par l'attaque du groupement hydroxyle libre en 3' du brin d'ADN clivé sur le groupement phosphate reliant l'ADN à la topoïsomérase (2).

terphase. Elle est enrichie sur les séquences SAR d'attachement à la matrice qu'elle clive *in vivo* au niveau de sites de coupures préférentiels (Kas and Laemmli 1992; Laemmli, Kas et al. 1992; Strick and Laemmli 1995; Kallio and Lahdetie 1996; Strissel, Espinosa et al. 1996; Miassod, Razin et al. 1997; Girard, Bello et al. 1998; Hart and Laemmli 1998; Maeshima and Laemmli 2003). De même, elle est enrichie au niveau des séquences satellites alphas A•T riches qui définissent les régions péricentriques chez les vertébrés (Warburton and Earnshaw 1997). Sur ces séquences, elle est présente sous une forme catalytique active et clive également des sites précis (Spence, Critcher et al. 2002; Spence, Fournier et al. 2005). Sa localisation au cours du cycle suggère donc que la topoisomérase II joue un rôle structural et fonctionnel dans l'assemblage et la régulation de la structure chromatinienne et notamment dans l'organisation et la condensation des chromosomes mitotiques (Cuvier and Hirano 2003; Porter and Farr 2004). Ceci est confirmé par les nombreuses études qui indiquent que l'inhibition de la topoisomérase II perturbe la structure et la fonction des centromères, notamment l'assemblage du kinétochore et la séparation des chromatides soeurs (Downes, Mullinger et al. 1991; Sumner 1995; Kallio and Lahdetie 1996; Rattner, Hendzel et al. 1996). Néanmoins, comme nous le détaillerons plus loin, des données plus récentes obtenues par déplétion de la TOPOII par interférence à l'ARN ne semblent pas confirmer son rôle dans l'assemblage du kinétochore (Chang, Goulding et al. 2003).

I.4.2.1 Mode d'action

Le mode d'action de la topoisomérase II repose sur une réaction de transestérification réversible au cours de laquelle l'oxygène du groupement hydroxyle d'une tyrosine du coeur catalytique de l'enzyme attaque le groupement phosphate du squelette de la molécule d'ADN (voir figure 23). L'énergie dégagée par la rupture du pont phosphodiester permet la formation d'une liaison covalente phosphotyrosine entre l'enzyme et son substrat. Cette étape ne requiert aucun apport énergétique et se déroule donc sans consommation d'ATP. Le complexe covalent formé par le dimère de topoisomérase et le duplex d'ADN clivé est appelé complexe de clivage, les coupures sur chacun des brins étant espacées de 4 paires de bases.

La durée de vie de cet intermédiaire du cycle catalytique de la topoisomérase II peut être augmentée par de nombreux agents chimiques. Les lésions transitoires de l'ADN ca-

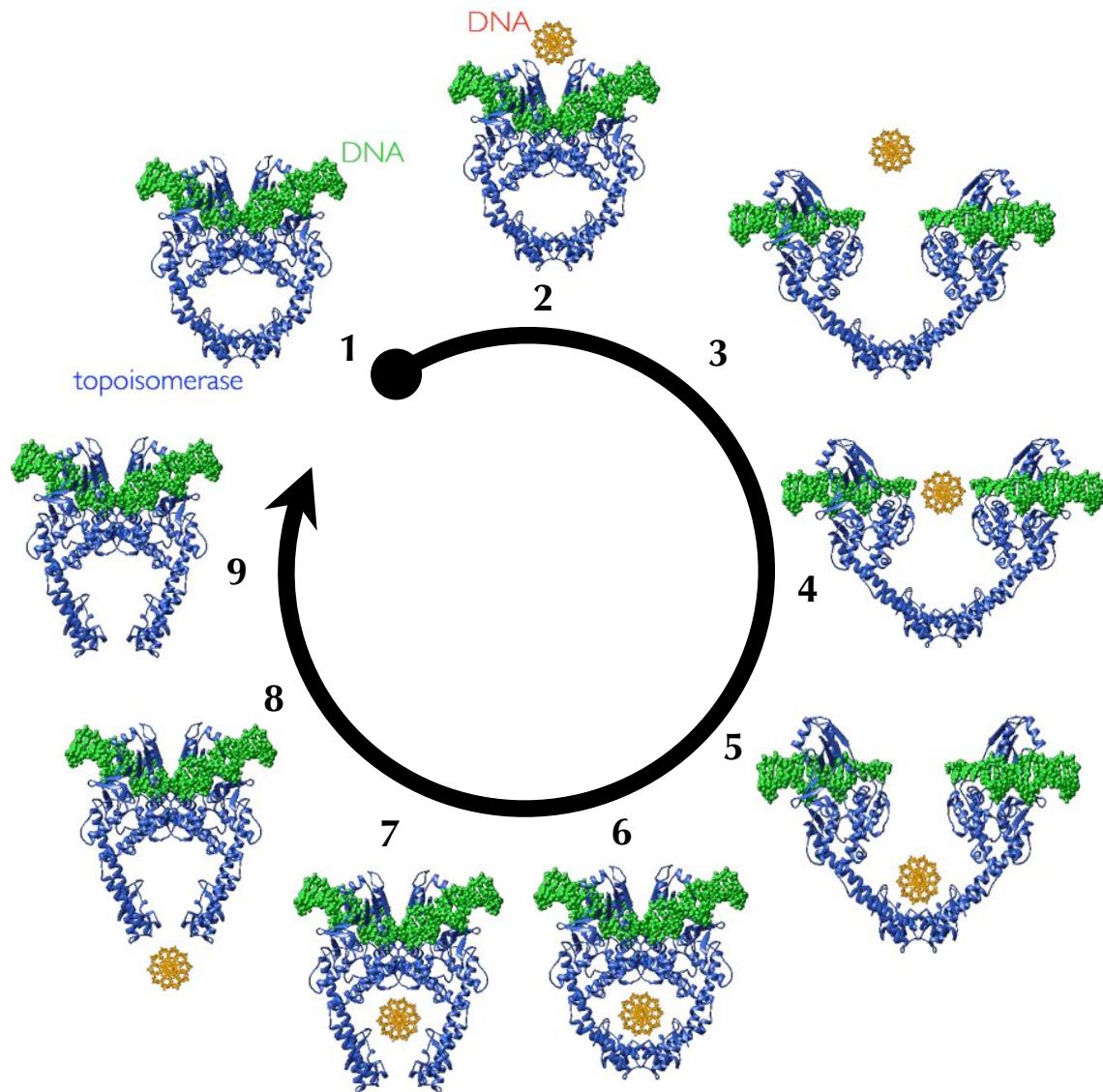


Figure 24 : Cycle catalytique de la topoïsomérase II

Le cycle s'amorce lorsqu'un duplex d'ADN, le segment G (en vert) s'associe à la topoïsomérase II (en bleu, le domaine ATPase n'est pas représenté) **(1)**. Lors du rapprochement d'un deuxième duplex d'ADN **(2)**, le segment transduit T (vu selon l'axe de l'hélice et représenté par une rosace couleur or), le dimère de topoïsomérase II induit la coupure de chacun des deux brins du segment G, les coupures étant espacées de 4 paires de bases. L'écartement des deux domaines GHKL « ouvre » la double hélice d'ADN G **(3)**. Le segment T passe à travers la double-hélice G **(4 et 5)** puis lors de l'étape de réversion, une seconde réaction de transestérification permet la fermeture du segment G **(6)**. Un nouveau changement conformationnel de la topoïsomérase II permet l'ouverture de la pince formée par les domaines accessoires qui conduit à la libération du segment transduit T **(7 et 8)**. Le recyclage de la topoïsomérase II s'achève par la dimérisation des domaines accessoires qui restaurent la structure initiale de l'enzyme et la rendent disponible pour un nouveau cycle catalytique **(8 vers 9)**.

talysées par la topoïsomérase II peuvent ainsi être converties en coupures permanentes soit par la dénaturation de l'enzyme à l'aide notamment de détergents ioniques soit par la collision de la topoïsomérase II avec une fourche de réplication ou la machinerie transcriptionnelle. Dans la section suivante, nous verrons comment la modulation de la durée de vie du complexe de clivage et la transformation de la TOPOII en enzyme de clivage de l'ADN ont été exploitées depuis plus de 20 ans dans un but thérapeutique ou de recherche fondamentale.

La réversion de la réaction se fait après le passage d'une double hélice d'ADN (le segment T) au travers de la double hélice clivée (segment G), ce passage constituant vraisemblablement l'étape consommatrice d'ATP. Cette réversion repose sur une seconde étape de trans-estérification au cours de laquelle l'oxygène du groupement hydroxyle de l'ADN généré durant la première réaction attaque le phosphore du pont phosphotyrosine. Ceci conduit à la rupture de la liaison entre l'enzyme et l'ADN et à la reformation du squelette de la molécule d'ADN ((voir figure 24) et pour revue (Corbett and Berger 2004; Baldwin and Osheroff 2005) et références incluses).

I.4.2.2. Structure de la topoïsomérase II eucaryote

Il n'existe à l'heure actuelle aucune structure cristallographique d'un dimère de topoïsomérase II complet associé à l'ADN. La configuration structurale supposée de l'enzyme a donc été déduite par la synthèse des données structurales et biochimiques des différents domaines protéiques constituant la topoïsomérase II isolés chez différents organismes.

Ces domaines sont au nombre de 4 (voir figure 25) :

- L'extrémité amino-terminale de la topoïsomérase II porte le domaine ATPase de l'enzyme qui contient le motif structural « GHKL » de liaison à l'ATP (Dutta and Inouye 2000) ainsi que le domaine transducteur qui coordonne les étapes d'ouverture de l'enzyme et de transport de l'ADN au travers du brin clivé (Wigley, Davies et al. 1991).

- Le domaine B' correspond au motif structural « toprim » conservé entre les topoïsomérases de type IA et II et également retrouvé dans certaines primases bactériennes (d'où il tire son nom topoïsomérase-primase toprim). Il est également retrouvé dans certaines nucléases et l'enzyme recR. Ce domaine d'une centaine d'acides aminés est constitué de deux motifs conservés centrés autour de résidus chargés, un glutamate et un dou-

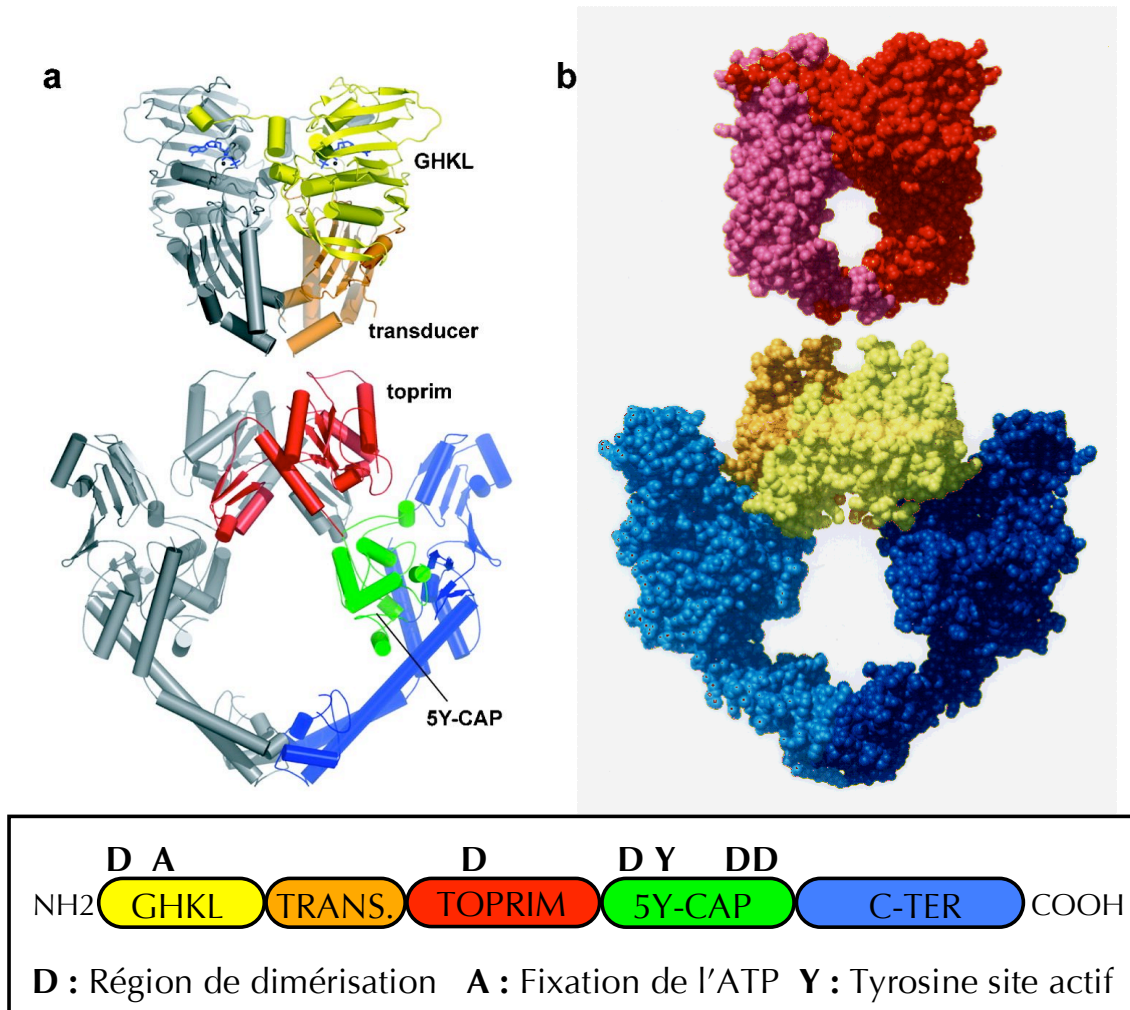


Figure 25 : Structure de la topoisomérase II de *S. cerevisiae* déduite des structures cristallographiques de ses différents domaines

a : Représentation schématique du dimère de TOPOII (un seul des monomères est coloré et le code couleur relatif aux différents domaines est reporté sur la représentation linéaire de la séquence protéique (en bas et voir texte pour détails). Les hélices α sont symbolisées par des cylindres, les feuillets β sont représentés par des flèches pleines, les boucles par des lignes courbes.

b : Sur cette représentation, les atomes sont représentés par des sphères (le code couleur sur cette représentation est différent de la représentation a).

Image tirée de (Corbett et Berger 2004)

blet d'aspartates (DxD). Ces résidus et plus particulièrement le glutamate interviendraient dans l'étape de religation de l'ADN clivé par les topoïsomérases et l'étape de polymérisation de l'ADN par les primases. Ce domaine intervient également dans la dimérisation de l'enzyme ([Aravind, Leipe et al. 1998](#)).

- Le domaine A' contient le site CAP-like de liaison à l'ADN ([Strumberg, Nitiss et al. 2002](#)). Celui-ci intervient dans la reconnaissance de la séquence d'ADN et serait la cible de certains inhibiteurs de la topoïsomérase II telles que la quinolone mais aussi probablement tout un panel d'agents antinéoplasiques parmi lesquels l'etoposide ([Elsea, Westergaard et al. 1997](#)). Le domaine A' contient également le site catalytique de l'enzyme renfermant la tyrosine impliquée dans la réaction de trans-estérification ([Liu and Wang 1998](#)).

- Le domaine carboxy-terminal non essentiel de la topoïsomérase II eucaryote correspond aux domaines accessoires et porte entre autres les signaux d'adressage nucléaire (NLS) ([Shiozaki and Yanagida 1992](#); [Feldhoff, Mirski et al. 1994](#)) ainsi que des sites de phosphorylation. Ce domaine pourrait intervenir dans la régulation de l'activité de la TOPOII par le biais de phosphorylations de résidus sérines ([Cardenas and Gasser 1993](#); [Wells and Hickson 1995](#)).

I.4.2.3. Outils d'étude de la topoïsomérase

L'absence de mutants de la topoïsomérase II chez les eucaryotes supérieurs a longtemps empêché d'apporter la preuve de son rôle essentiel en mitose et en méiose comme cela avait été démontré chez la levure ([Uemura, Ohkura et al. 1987](#); [Hartsuiker, Bahler et al. 1998](#); [Cortes, Pastor et al. 2003](#)). Cette difficulté a en partie été levée par l'utilisation de nombreuses drogues ciblant la topoïsomérase II.

Les poisons classiques de la topoïsomérase II agissent en stabilisant le complexe de clivage (*i.e.* le complexe covalent formé entre le dimère de topoïsomérase II et le duplex d'ADN clivé) qui est un intermédiaire dans le cycle catalytique normal de l'enzyme. L'accumulation de ces complexes de clivage dans les cellules traitées à l'aide d'un de ces poisons conduit naturellement à la génération de cassures double brin de la molécule d'ADN lors de la collision d'un complexe de clivage stabilisé avec un complexe moteur de l'ADN (fourche de réplication, complexe de transcription). L'accumulation de ces cassures double-brins en saturant les machineries de réparation de l'ADN provoque une

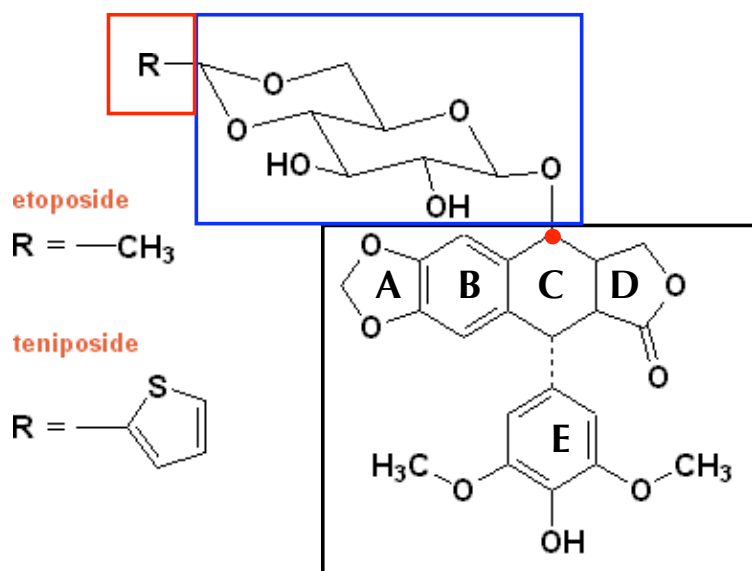


Figure 26 : Structures de l'étoposide (VP16) et du téniposide (VM26)
 Ces deux poisons de la topoisomérase II sont des dérivés de la phyllotoxine. L'encadré noir représente la structure de la phyllotoxine, formé par un cœur polycyclique (A-B-C-D) et l'anneau E. Dans ce composé, la position 4 du noyau C (ici indiquée en rouge) est substituée par un groupement hydroxyle. L'étoposide et le téniposide sont eux mêmes obtenus par substitution de ce groupement hydroxyle par un groupement glycosidique (encadré bleu). Ces deux dernières molécules ne se différencient que par un seul substituant, le groupement R (encadré rouge) qui correspond à un groupement méthyle dans le cas de l'étoposide et à un cycle thiophène pour le téniposide.
 Image adaptée de (Baldwin et Osheroff 2005).

fragmentation du génome qui déclenche alors l'apoptose. Ces molécules provoquent la mort cellulaire programmée en transformant une enzyme essentielle - la topoisomérase II - en une puissante toxine, raison pour laquelle on qualifie ces drogues de poisons.

Les deux premières molécules décrites comme ayant ce potentiel de stabilisation du complexe de clivage ([Wilstermann and Osheroff 2003](#)) sont deux dérivés synthétiques de la podophyllotoxine, une substance extraite de *Podophyllum peltatum*, ou pomme de mai. Cette herbacée est utilisée depuis plus de 1000 ans en médecine traditionnelle et dès le XIX^{ème}, la podophylline était connue pour soigner les cancers de la peau (pour une revue historique, voir ([Hande 1998](#); [Baldwin and Osheroff 2005](#))). Du fait de sa capacité à inhiber la polymérisation de la tubuline, la podophyllotoxine est un puissant antimitotique mais, malgré son fort pouvoir antiprolifératif, l'utilisation de cette substance a été freinée du fait de sa toxicité élevée.

Dans les années 50, une série de dérivés de la podophyllotoxine fût produite afin de générer des composés moins toxiques mais présentant les mêmes propriétés antiprolifératives que le composé parent. Ces travaux ont conduit à la synthèse de deux molécules, l'étoposide et le téniposide (respectivement VP16 et VM26) ([voir figure 26](#)). L'usage de l'étoposide en thérapie anticancéreuse fut autorisé aux Etats-Unis à partir de 1983 par la F.D.A. (Food and Drug Administration) après des essais cliniques initiés en 1971. La capacité de ces composés à cibler la topoisomérase II et leur mode d'action ne furent cependant découverts qu'en 1984 ([Chen, Yang et al. 1984](#); [Ross, Rowe et al. 1984](#)).

Contrairement à la podophyllotoxine, l'étoposide et le téniposide n'inhibent pas l'assemblage du faisceau de microtubules mais, comme le composé parent, elles ciblent la topoisomérase II ([Baldwin and Osheroff 2005](#); [You 2005](#)). Du fait de leur mode d'action par stabilisation du complexe de clivage, ces drogues provoquent la fragmentation des chromosomes ce qui explique leur effet cytotoxique sur les cellules anticancéreuses dans lesquelles la topoisomérase II est largement surexprimée. Nous verrons plus loin que l'emploi d'étoposide dans le cadre d'un traitement anticancéreux est loin d'être innocent et que les conséquences néfastes de tels traitements incitent aujourd'hui à la plus grande prudence quant à l'emploi de ces substances à des doses élevées.

Outre les poisons, la topoisomérase II est également la cible de drogues qui agissent comme des inhibiteurs catalytiques. Contrairement aux premiers, ceux-ci n'induisent

pas de cassures double-brin mais agissent sur une étape particulière du cycle catalytique de l'enzyme ; liaison de l'enzyme à l'ADN dans le cas de l'aclarubicine (Jensen, Sorensen et al. 1990), coupure de l'ADN pour la merbarone (Fortune and Osheroff 1998) ou encore passage du segment T au travers du segment G pour la novobiocine ou la coumarmycine (Gellert, O'Dea et al. 1976).

La dernière classe d'inhibiteurs de la topoisomérase II correspond à une série de composés appelés ICRF qui agissent sur la topoisomérase II en empêchant le relargage de l'ADN. L'enzyme ainsi bloquée dans sa conformation fermée est piégée sur l'ADN (Roca, Ishida et al. 1994). Ces dernières molécules ont été largement utilisées en recherche fondamentale pour l'étude des topoisomérases et l'élucidation de leur rôle dans les divers processus au cours desquels elles interviennent.

Récemment, une nouvelle avancée a été réalisée par l'analyse des conséquences de la déplétion partielle de la topoisomérase II par RNAi dans des cellules S2 de drosophile (Chang, Goulding et al. 2003). Ces travaux ont permis de déterminer qu'en absence de topoisomérase II, la condensation des chromosomes mitotiques se déroule normalement mais que les structures observées en fin de condensation sont atypiques. Ces résultats indiquent que la topoisomérase II joue un rôle essentiel dans l'architecture des chromosomes, ce qui était déjà suggéré par de précédents travaux (Maeshima and Laemmli 2003). Ces résultats ont également confirmé le rôle essentiel de la topoisomérase II dans la ségrégation des chromatides sœurs. Bien que cette étude ait confirmé le rôle de la TOPOII dans la séparation des chromatides sœurs, les différences sensibles entre les observations réalisées après traitement RNAi et les précédentes études basées sur des inhibiteurs et des anticorps dirigés contre la TOPOII révèlent certains aspects inattendus de la fonction de cette enzyme. Entre autres, ce travail révèle que la condensation peut se dérouler au moins en partie en absence de TOPOII, qui n'est requise que pour atteindre le niveau maximum de compaction des chromosomes mitotiques. Plus intrigant, la TOPOII n'est pas requise pour l'assemblage du kinétochore puisque la localisation du variant d'histone Cid (l'homologue de CENP-A) n'est pas affectée par le traitement RNAi anti TOPOII. Ces derniers résultats contredisent de précédentes observations qui indiquaient que, dans des cellules traitées par des inhibiteurs de la topoisomérase II, la structure du kinétochore est anormale (Rattner, Hendzel et al. 1996).

Des expériences similaires ont depuis été conduites dans des cellules Hela où des RNAi dirigés contre l'une, l'autre ou les deux isoformes de la topoisomérase II ont largement confirmé les conclusions des travaux réalisés chez la drosophile. De plus, ces travaux ont confirmé que, dans des cellules de mammifères en culture, l'isoforme beta peut se substituer à l'isoforme alpha ce qui souligne une certaine redondance de fonction de ces deux isoformes ([Sakaguchi and Kikuchi 2004](#); [Toyoda and Yanagida 2006](#)).

De manière intéressante, il semble que certains dommages à l'ADN agissent comme des poisons de la topoisomérase II. Ceci est souligné par les nombreux travaux qui révèlent une induction des clivages par la topoisomérase II en présence de sites abasiques ([Kingma, Corbett et al. 1995](#); [Kingma, Greider et al. 1997](#); [Kingma and Osheroff 1997](#); [Kingma and Osheroff 1997](#); [Cline, Jones et al. 1999](#); [Cline and Osheroff 1999](#)). Par ailleurs, les lésions abasiques ne seraient pas les seules lésions de l'ADN capables d'induire un clivage par la TOPOII un effet semblable ayant été démontré pour des oxydations et alkylations de la molécule d'ADN ([Sabourin and Osheroff 2000](#); [Velez-Cruz, Riggins et al. 2005](#)). Une étude suggère même que la topoisomérase II serait impliquée dans la carcinogénèse induite par un pH acide selon un mécanisme semblable d'empoisonnement de la TopoII et d'induction de coupures double-brin ([Xiao, Li et al. 2003](#)).

Récemment enfin, une nouvelle technique est venue compléter l'éventail des outils permettant d'étudier les topoisomérases. Largement utilisées par l'équipe de Vincent Croquette ([Crisona, Strick et al. 2000](#); [Strick, Croquette et al. 2000](#); [Charvin, Bensimon et al. 2003](#); [Charvin, Strick et al. 2005](#); [Charvin, Strick et al. 2005](#)), la micromanipulation à l'aide de pinces magnétiques ou optiques et l'observation de molécules uniques d'ADN et de leur comportement en présence de topoisomérases permettra certainement dans un avenir proche et en combinaison avec l'utilisation de drogues spécifiques de ces enzymes, d'améliorer notre compréhension de leur fonctionnement.

I.4.2.4. La topoisomérase II comme cible thérapeutique

La fonction de la topoisomérase II étant essentielle et, du fait de l'absence de redondance pour cette fonction dans la cellule, cette enzyme est rapidement devenue une cible majeure des thérapies anticancéreuses ([Walker and Nitiss 2002](#); [Larsen, Escargueil et al. 2003](#)) et antiparasitaires ([Maxwell 1999](#); [Das, Dasgupta et al. 2004](#)).

Des inhibiteurs ou poisons de la TOPOII tels que l'étoposide sont aujourd'hui utilisés à la fois comme traitement principal mais aussi comme adjuvant dans les chimiothérapies des transformations néoplasiques ([Baldwin and Osheroff 2005](#); [Martincic and Hande 2005](#)).

Du fait de ses nombreuses fonctions dans les processus liés à l'ADN, l'activité de la topoisomérase II, lorsqu'elle est dérégulée, est parfois associée à des effets mutagènes et oncogènes. C'est par exemple le cas lors de traitements avec des poisons de la topoisomérase II. Ainsi l'étoposide, en dépit de son importance thérapeutique dans le traitement des cancers chez l'homme, est souvent associé à des types spécifiques de leucémies. Ces effets mutagènes induits par les poisons de la topoisomérase II sont liés à l'induction de cassures double-brins qui, une fois prises en charge dans la cellule, peuvent conduire, par recombinaison illégitime ([Umanskaya, loudinkova et al. 2005](#)), à des aberrations chromosomiques et à une instabilité génétique ([Degrassi, Fiore et al. 2004](#)). Ce phénomène aboutit notamment à des translocations chromosomiques précises (liées à des sites préférentiels de clivage de la topoisomérase II) qui sont à l'origine de lymphomes et de leucémies caractéristiques liées à l'expression de protéines de fusion possédant un fort potentiel oncogène. Les exemples des leucémies induites par l'expression de ces chimères protéiques et des effets mutagènes des thérapies anti-topoisomérase II sont connus depuis plus de 10 ans et sont aujourd'hui largement documentés ([Smith, Rubinstein et al. 1994](#); [Baguley and Ferguson 1998](#); [Kudo, Yoshida et al. 1998](#); [Andersen, Christiansen et al. 2001](#); [Blanco, Dervieux et al. 2001](#); [Leone, Voso et al. 2001](#); [Tsuboi, Komatsu et al. 2003](#); [Milot, Brizard et al. 2005](#)). Bien que l'occurrence de ces leucémies induites par les traitements basés sur les poisons de la topoisomérase II avoisine les 3%, et malgré leur effet cardiotoxique ([Zucchi and Danesi 2003](#)), ces molécules restent à ce jour les médicaments anticancéreux les plus prescrits. Leur utilisation thérapeutique se heurte donc désormais à un problème de taille, l'apparition de résistances qui, problématique en thérapie anticancéreuse ([Fedier, Schwarz et al. 2001](#); [Kellner, Sehested et al. 2002](#)), devient critique dans le cas des thérapies antiparasitaires ([Sengupta, Mukherjee et al. 2005](#)).

II. Résultats

II.1. Vers un nouvel outil d'étude de l'hétérochromatine

II.1.1. Introduction bibliographique

De par la nature des séquences qui la composent (séquences satellites complexes de 359 paires de bases répétées sur près de 11 mégabases), l'hétérochromatine péricentrique du chromosome X est largement réfractaire aux outils classiques de génétique qui, malgré la puissance du modèle drosophile, trouvent ici leurs limites. Bien que récemment des tentatives chez la drosophile aient permis quelques avancées dans la compréhension du rôle en *cis*- et en *trans*- des séquences d'ADN répétées sur la compartimentalisation du génome et la variégation (Sun, Haynes et al. 2004; Sage, Jones et al. 2005), de nouvelles approches sont nécessaires pour l'étude de cette région qui correspond à plus de 5% du génome chez *Drosophila melanogaster*.

Afin de pallier ce manque et pour compléter la palette d'outils déjà disponibles pour l'étude du rôle des différents facteurs protéiques et marques épigénétiques établissant le code des histones, j'ai mis au point un système original de ciblage de fonctionnalités d'intérêt sur les séquences satellites III (SAT III) formant l'hétérochromatine péricentrique du chromosome X de *Drosophila melanogaster*.

S'appuyant sur les travaux de Laemmli et Gehring, ce système consiste à fusionner le domaine catalytique ou le motif peptidique d'intérêt à la protéine artificielle MATH20 (Strick and Laemmli 1995). Celle-ci, par la répétition de 20 motifs A•T Hook issus de la protéine HMGA humaine, interagit spécifiquement et avec une très haute affinité avec les séquences A•T riches et notamment les séquences SAT III ($K_D \approx 20$ pM). Exprimée seule, elle supprime la P.E.V de *white-mottled* (Girard, Bello et al. 1998) par le déplacement de la protéine MATH endogène D1 (Monod, Aulner et al. 2002).

L'enjeu de ce travail est la construction et la validation d'un système de ciblage hautement polyvalent. La première de ses fonctions est de permettre d'évaluer l'impact de la présence d'un motif catalytique ou d'un domaine protéique donné sur la structure de l'hétérochromatine péricentrique (*i.e.* la composition protéique de la chromatine ainsi que la nature des marques épigénétiques portées par les histones). L'autre intérêt majeur du système est, par la perturbation orientée de la structure de l'hétérochromatine, d'évaluer

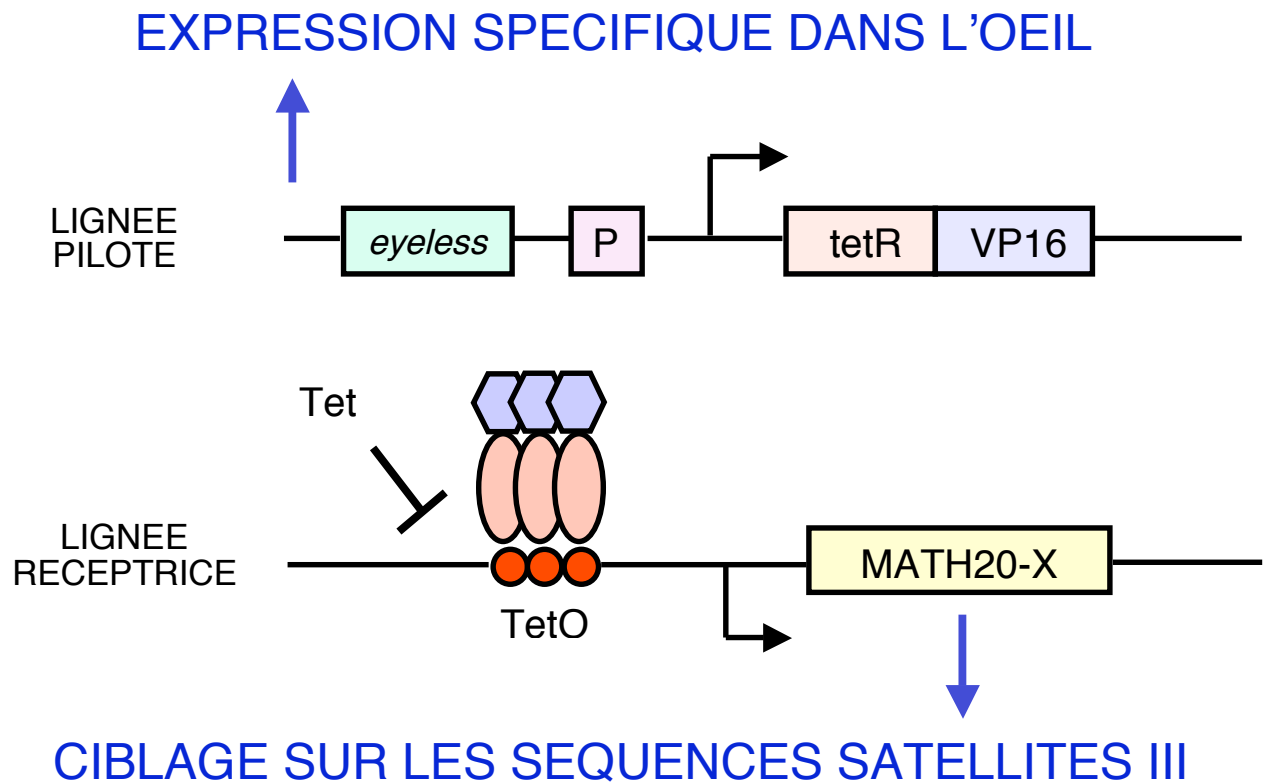


Figure 27: Stratégie de ciblage des fonctions de modification des histones sur les séquences satellites III de drosophile

Dans la lignée pilote (en haut), l'expression du transactivateur constitué par la fusion entre le domaine de fixation à l'ADN du répresseur à la tétracycline (tetR) et le domaine d'activation de la transcription de la protéine VP16 de l'herpès simplex virus (VP16) est placée sous le contrôle des séquences promotrices du gène *eyeless* qui permettent son expression spécifique dans les disques imaginaux d'œil des larves de drosophile au troisième stade larvaire.

Dans la lignée réceptrice, l'expression du transgène d'intérêt (fusion entre les séquences codant la protéine artificielle MATH20 et la séquence correspondant au domaine protéique ou la protéine à étudier (ici indiquée par la lettre X) est régulée par la fixation du transactivateur tetR-VP16 aux séquences opératrices TetO. L'interaction spécifique TetR-VP16/TetO active la transcription du transgène (MATH20-X) et peut être inhibée par l'ajout de tétracycline (Tet) dans la nourriture des larves.

Dans notre expérience, la séquence fusionnée en phase à celle de MATH20 correspond à la séquence de l'ADN complémentaire de l'isoforme α de la protéine HP1 mais peut-être substituée pour les besoins expérimentaux par toute séquence d'intérêt. Si l'expression du transactivateur TetR-VP16 est ici sous la dépendance des séquences promotrices du gène *eyeless*, d'autres applications de ce système sont possibles en substituant les séquences promotrices d'intérêt à celle de *eyeless* afin de modifier à loisir le patron d'expression du transgène MATH20-X.

l'impact de ces perturbations sur divers mécanismes comme la condensation et la ségrégation des chromosomes en mitose ou en méiose et ainsi de permettre une analyse fonctionnelle de ces régions dans les contextes tissulaires correspondant aux différents processus cellulaires d'intérêt.

Comme ces régions sont constituées de séquences satellites alphanucléotidiques et qu'elles interagissent avec la seule protéine MATH de drosophile D1, nous proposons que les satellites III du chromosome X sont un bon modèle d'étude de l'interaction entre les protéines HMGA humaines et les séquences satellites alphanucléotidiques qui, chez les mammifères, composent également les régions péricentriques. Nous proposons également que les conclusions d'expériences poursuivies dans ce modèle puissent être élargies aux vertébrés.

II.1.2. Résultats préliminaires

Notre projet s'appuyait sur les travaux de Bruno Bello et de Franck Girard qui ont mis au point le système de régulation par la tétracycline chez la drosophile (Bello, Resendez-Perez et al. 1998) et démontré le potentiel de MATH20 à supprimer la PEV de *white-mottled* (Girard, Bello et al. 1998).

Il s'agit d'un système bipartite de type Tet_{Off} où l'expression du transgène d'intérêt par la lignée dite réceptrice est sous le contrôle d'un transactivateur tetR-VP16 (fusion entre le domaine d'interaction avec l'ADN du répresseur à la tétracycline tetR et le domaine d'activation de la transcription de la protéine VP16 du virus de l'herpès (Gossen and Bujard 1992)). L'expression du transactivateur tetR-VP16 dans la lignée dite pilote est placée sous le contrôle de séquences promotrices d'intérêt permettant le ciblage spatio-temporel du transactivateur et donc du transgène. L'interaction entre le module tetR du transactivateur et les séquences opératrices *tetO* en amont du transgène est inhibée en présence de tétracycline (Baron and Bujard 2000) (voir figure 27).

Le système initial construit par Bello et Girard n'étant plus disponible, je l'ai reconstruit au laboratoire et afin de le valider, j'ai généré une fusion entre MATH20 et la protéine HP1 dont l'expression est placée sous le contrôle de ce système.

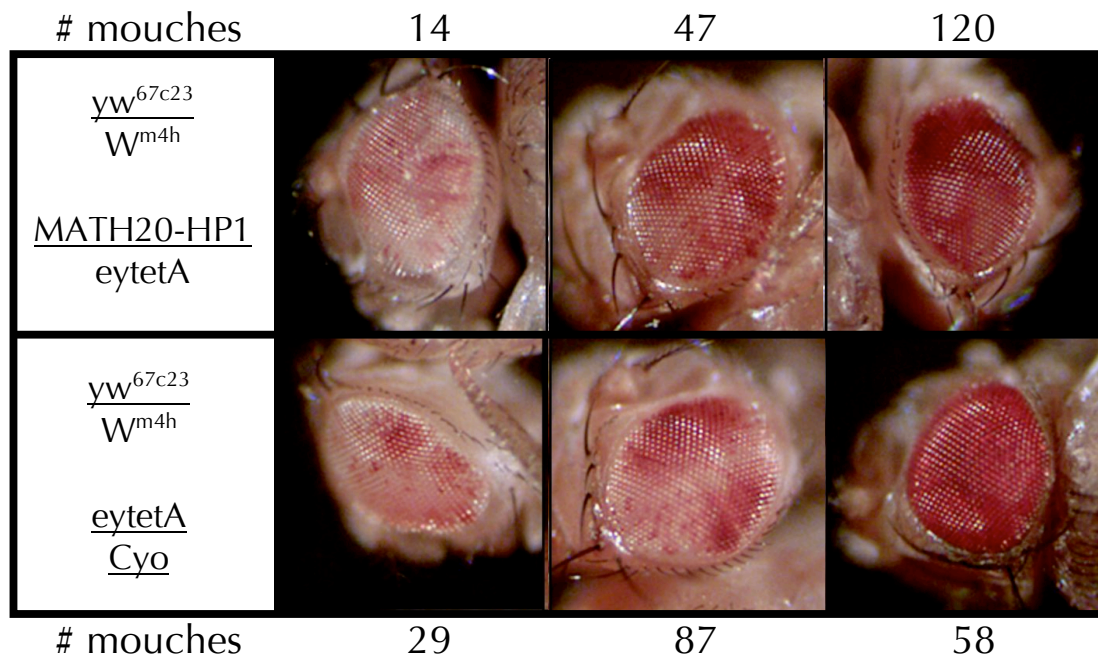


Figure 28 : Suppression de la PEV de *white-mottled* par l'expression du transgène MATH20-HP1

Distribution des phénotypes de PEV de *white-mottled* dans la descendance femelle d'un croisement entre la lignée transgénatrice (W^{m4h} ; eytetA) et la lignée réceptrice (yw^{67c23} ; MATH20-HP1FL). La répartition des phénotypes est la suivante :

- pour les femelles exprimant le transgène (en haut), de gauche à droite :
Forte : 14/181 (8%); Moyenne à Faible : 47/181 (26%); Faible à Nulle : 120/181 (66%)
- pour les femelles n'exprimant pas le transgène (en bas), de gauche à droite :
Forte : 29/174 (17%); Moyenne à Faible : 87/174 (50%); Faible à Nulle : 58/174 (33%)

L'expression du transgène MATH20-HP1FL sous la dépendance des séquences promotrices du gène *eyeless* provoque une forte suppression de la PEV comme en atteste la modification brutale du patron de distribution phénotypique par rapport au témoin. Il n'est pas possible, sur la base de ces travaux, de déterminer la cause de la suppression de PEV que nous observons. En effet, comme dans le cas de l'expression de MATH20 seule, le mécanisme impliqué dans cette suppression pourrait reposer sur la simple compétition entre notre fusion et les protéines endogènes D1, HP1 et TOPOII pour la fixation aux séquences SATIII. Des expériences complémentaires seront nécessaires afin de donner un sens à ces observations notamment afin de déterminer la fonctionnalité d'HP1 fusionnée. Néanmoins, la suppression de PEV observée, bien qu'elle n'aille pas dans le sens attendu par rapport à la fonction majoritaire de répression d'HP1, suggère fortement que notre système permet bien le ciblage des SATIII.

Par ailleurs, la lignée transactivatrice exprimant la fusion tetR-VP16 sous le contrôle des séquences promotrices du gène *eye/less* (qui s'exprime dans les disques imaginaux d'œil des larves de drosophile au troisième stade de développement) a été placée dans un fond génétique *In(1)wm4h* pour le chromosome X (lignée *In(1)wm4h, eytetA*). Ceci permet d'observer directement l'effet de l'expression du transgène d'intérêt (ici MATH20-HP1) sur la coloration de l'œil, les variations de la variéation d'expression de l'allèle *white-mottled* traduisant de manière indirecte la perturbation de l'hétérochromatine péri-centrique. Ce changement de fond génétique a été réalisé par croisements génétiques.

Je m'attache aujourd'hui, après avoir réalisé la transgénèse de la fusion MATH20-HP1 chez la drosophile et établi une lignée stable qui par croisement avec la lignée pilote *In(1)wm4h, eytetA* exprime MATH20-HP1 dans les disques imaginaux d'œil, à en évaluer l'influence sur la PEV de *white-mottled* et sur la localisation des constituants de l'hétérochromatine (figure 28).

II.1.3. Perspectives

Le but premier est de valider le système par la lignée MATH20-HP1 déjà établie et à terme de tester différentes fonctions de modification des histones. Au-delà de mieux comprendre le rôle des modifications des histones et leur influence sur la structure de la chromatine, cet outil permettrait à terme d'appréhender la fonction biologique des séquences satellites alphas qui, chez la drosophile comme chez l'homme, constituent les régions d'hétérochromatine péri-centrique. Nous proposons donc d'utiliser ce système de ciblage des séquences SATIII afin d'évaluer directement leur contribution aux processus biologiques impliqués dans la prolifération cellulaire. Pour cela, il conviendra d'étudier l'impact de l'expression de ces fusions au sein de tissus en division rapide, à l'instar des tissus germinaux, sur la condensation et la ségrégation des chromosomes mitotiques dans lesquels le centromère assume un rôle majeur.

De telles études sont rendues aisées par la grande polyvalence de ce système qui permet le ciblage spatio-temporel de n'importe quel motif protéique sur les SAT III à tout stade du développement et dans le tissu de son choix (déterminés par les séquences promotrices en amont du transactivateur tetR-VP16). Il permet de plus une régulation fine du niveau d'expression du transgène par la modulation de la quantité de tétracycline présente dans le milieu nourricier des larves de drosophiles. La validation de ce système par

l'analyse de la fusion MATH20-HP1 n'est que l'étape initiale de son utilisation qui rapidement pourra être étendue à l'analyse de la fusion MATH20-SETD (où SETD correspond au domaine catalytique de l'enzyme SU(VAR)3-9 responsable de la modification reconnue par HP1). Cette construction, par ailleurs déjà réalisée, permettra, comme dans le cas d'HP1 (voir discussion sur les travaux de Kourmouli *et al.*), de disséquer la fonction précise de cette enzyme sur les séquences SATIII et d'élucider les relations au sein de la triade HP1/SU(VAR)3-9/H3K9me dans les régions péricentriques. Notamment, la possibilité offerte par la drosophile de changer facilement le fond génétique des lignées transgéniques nous permettra d'étudier l'impact de ces fusions dans des contextes mutants pour les protéines HP1 ou SU(VAR)3-9.

II.2. Perturbation de la structure de l'hétérochromatine : approche pharmacologique

II.2.1. Introduction bibliographique

Les travaux conduits dans l'équipe ([Blattes, Monod et al. 2006](#)) à l'aide de l'oligopyrrole P9 ([Janssen, Cuvier et al. 2000](#); [Janssen, Durussel et al. 2000](#)) ont révélé que le déplacement sélectif de D1 des séquences SAT III s'accompagne de la délocalisation de la protéine HP1 mais surtout de la topoisomérase II, cible majeure dans les thérapies anti-tumorales et enzyme essentielle à la séparation des chromatides soeurs en anaphase ([Chang, Goulding et al. 2003](#)). La localisation de cette enzyme dans les régions péricentriques chez la drosophile ([Kas and Laemmli 1992](#)) rappelle son enrichissement chez les mammifères sur les séquences satellites alphas ([Maeshima and Laemmli 2003](#)) et références ci-inclues) et suggère que sa fonction soit nécessaire à l'établissement d'une structure d'hétérochromatine.

II.2.2. Résultats

Ceci m'a conduit à entreprendre une approche de type pharmacologique afin d'étudier l'éventuelle implication fonctionnelle de la topoisomérase II dans le processus d'hétérochromatinisation des régions péricentriques. Cette approche, seule possible compte tenu de l'absence de mutants conditionnels de la topoisomérase chez les eucaryotes supérieurs et des effets pléiotropes observés après inactivation par siRNA, consistait à nourrir des larves de drosophile de la lignée *In(1)wm4h* avec du téniposide (VM26, poison spécifique de la topoisomérase II).

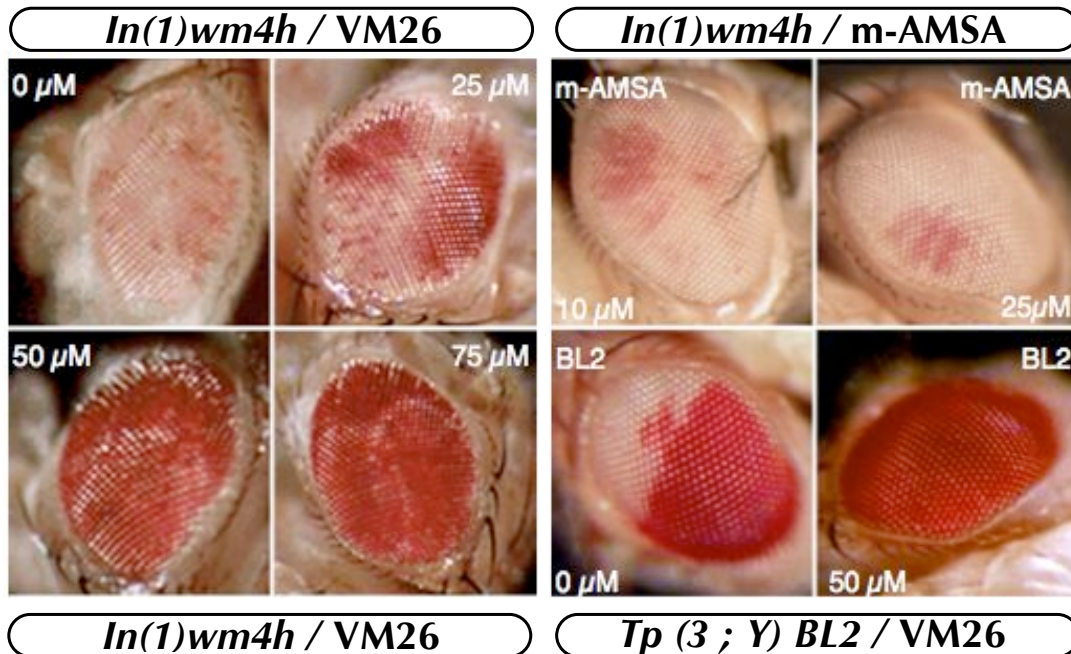


Figure 29 : Suppression de la PEV par des poisons de la topoïsomérase II
 Phénotype majoritaire observé chez les individus adultes issus de larves de drosophile au troisième stade de développement, nourries par un mélange de levure réhydraté additionné de différents poisons de la topoïsomérase II.
 Sur le panneau de gauche, on observe une suppression dose-dépendante de la PEV de l'allèle *white-mottled* dans la lignée *In(1)wm4h* lors du traitement par le téniposide (VM26). Lors du traitement par l'amsacrine (m-AMSA), un poison de la topoïsomérase II n'agissant pas sur les séquences SATIII, il n'y a pas de modifications observables de la PEV de *white-mottled* (en haut à droite). En revanche le traitement par VM26 de larves de la lignée *Tp (3 ; Y) BL2* conduit à une suppression de la PEV du transgène *miniwhite* inséré dans l'hétérochromatine du chromosome Y (en bas à droite). Le traitement par des quantités identiques de DMSO est sans effet sur le phénotype de PEV. Voir le texte pour plus de détails.

Pour des doses sublétales de ce poison de la topoisomérase II, nous observons une suppression dose-dépendante de la variégation de l'expression de l'allèle *white-mottled*, cette suppression étant totale dès 50 μ M (voir figure 29 A). Ceci suggère que la fonction de clivage de l'ADN par la topoisomérase II au niveau des séquences satellites A•T riches qui constituent les régions péricentriques joue un rôle dans l'établissement d'une structure d'hétérochromatine et donc qu'il existe bien un rôle fonctionnel de la topoisomérase II dans ce mécanisme au delà de son rôle structural déjà connu.

Afin de déterminer si cette fonction de la topoisomérase II suggérée par les résultats précédents était confinée aux séquences satellites III alphas, nous avons reproduit cette expérience dans la lignée *T(3 ; Y) BL2* (Lu, Bishop et al. 1996; Lu, Ma et al. 1998). Dans cette lignée où le gène *white* endogène est muté, un élément P portant un transgène *white* et le gène rapporteur *lacZ* placé sous la dépendance d'un promoteur inducible de type heat shock ($P[(w^+),HS/lacZ]$) est relocalisé sur le chromosome Y à proximité d'un bloc de séquences satellites I (SAT I). Ces satellites 100% A•T riches sont constitués par la répétition de la séquence simple $(AATAT)_n$ ou $(AATATAT)_n$. Dans cette localisation, l'expression du transgène *white* est soumise au phénomène de variégation d'effet de position conduisant à l'inactivation stochastique de son expression. Contrairement à ce qui est observé dans la lignée *In(1)wm4h*, son patron d'expression dans l'oeil n'est pas bigarré mais sectorisé (comparer 10 μ M m-AMSA et 0 μ M BL2 de la figure 29). Compte tenu de l'hérédité clonale de l'état d'activité d'un gène soumis à PEV, ce phénotype traduit dans la lignée *T(3 ; Y) BL2* une « prise de décision » d'activer ou inactiver l'allèle *white* soumis à PEV plus précoce que pour l'allèle *white-mottled*.

Comme pour la lignée *In(1)wm4h*, le traitement de larves *T(3 ; Y) BL2* de troisième stade à l'aide de téniposide conduit à une suppression dose-dépendante de la PEV du transgène *white* (voir figure 29). Cette observation confirme le rôle fonctionnel de la topoisomérase II dans le processus d'assemblage de l'hétérochromatine suggérant que son implication n'est pas restreinte à l'hétérochromatine péricentrique du chromosome X mais pourrait correspondre à un rôle plus général de cette enzyme.

Afin de s'assurer que la suppression de PEV par VM26 dans la lignée *In(1)wm4h* est liée à l'activité de clivage de la topoisomérase II sur les séquences satellites et non pas à un effet indirect, nous avons repris cette expérience avec de l'amsacrine. Cet autre poi-

son de la topoisomérase agit lui aussi par stabilisation du complexe de clivage mais, à la différence du téniposide, n'est pas actif sur les séquences satellites III (Borgnetto, Zunino et al. 1996). Dans ce cas, le traitement par l'amsacrine s'est révélé sans effet sur la PEV de *white-mottled* (voir figure 29 C).

Ce dernier résultat indique clairement que la suppression de PEV de *white-mottled* par le téniposide VM26 est due à un effet local du piégeage de la topoisomérase II sur les séquences SAT III plutôt qu'un effet global de l'empoisonnement de la topoisomérase sur la dynamique de la chromatine. Prises ensembles, ces expériences suggèrent fortement un rôle fonctionnel général de cette enzyme dans le processus d'assemblage de l'hétérochromatine (voir Blattes, Monod et al. 2006).

Suite à ces résultats et sous l'impulsion de Christian Bailly, nous avons établi une collaboration avec les chimistes David Wilson et David Boykin, spécialistes américains de la synthèse de diamidines et de leurs dérivés. Ces ligands du petit sillon des séquences A•T riches ont initialement été développés pour leur activité antiparasitaire. Ces drogues possèdent en effet un pouvoir antiprolifératif marqué contre *Plasmodium falciparum*, *Pneumocystis carinii* et *Trypanosoma brucei*, agents infectieux responsables respectivement du paludisme, de la pneumonie à PCP (une forme de pneumonie opportuniste touchant principalement les patients atteints du SIDA) et de la maladie du sommeil, trois fléaux majeurs dont sont frappés les pays les plus pauvres. Les propriétés d'un de ces composés, DB 289, dérivé de la pentamidine et progéniteur de la furamidine DB 75 ont été étudiées notamment dans le cadre du projet « oral diamidines for sleeping sickness » développé par l'université de Caroline du Nord et financé par la Fondation Bill and Melinda Gates. Après avoir passé les phases IIa d'essais cliniques sur des patients atteints par le stade I de la maladie du sommeil (infection par *Trypanosoma brucei gambiense*), ce composé a été évalué sur des patients atteints de malaria en Thaïlande avec des résultats encourageants (source : Swiss Tropical Institute rapport 2003-2004 http://www.sti.ch/fileadmin/user_upload/Pdfs/rreport4.pdf).

Ces drogues, à l'instar de P9, sont affines pour les séquences d'ADN A•T riches ce qui explique leur efficacité contre ces parasites. En effet, les génomes de *P. falciparum* et *T. brucei* sont composés respectivement de 70 et 80% de paires de bases dA•dT et les kinétoplastes, structures d'ADN caractéristiques des trypanosomes codant pour les pro-

téines ribosomales et celles de la chaîne respiratoire, ont également une composition nucléotidique biaisée en paires de bases dA•dT ([Steck, Kinnamon et al. 1982](#); [Ginsburg, Nissani et al. 1993](#); [Wynia, Ioannidis et al. 1998](#); [Bailly, Dassonneville et al. 1999](#)).

Compte tenu de cette analogie avec les séquences SATIII (richesse en dA•dT), nous avons entrepris de tester ces molécules dans le système modèle de la drosophile et plus particulièrement dans la lignée *In(1)wm4h*, l'objectif de ce travail étant double.

Nous proposons d'utiliser les diamidines pour l'étude de l'hétérochromatine péri-centrique A•T riche, en tirant parti à la fois de leur spécificité pour ce type de séquences et de leurs propriétés autofluorescentes lorsqu'elles sont associées à l'ADN qui font de ces molécules des outils très utiles pour le contre-marquage dans des expériences d'immunofluorescence. Compte tenu de leur mode d'interaction avec les séquences A•T riches via le petit sillon, les diamidines présentent également un intérêt lié à leur aptitude supposée à interférer, à l'instar de l'oligopyrrole P9, avec les interactions ADN-protéines passant par le petit sillon. En complément des marqueurs hautement spécifiques que sont les polyamides couplés à des fluorophores, les diamidines offrent une alternative meilleur marché et constituant, du fait de la grande diversité de cette famille de composés et de leurs propriétés de reconnaissance respectives, un bon complément pour l'étude des interactions protéines-petit sillon de l'ADN.

Dans une approche complémentaire, nous proposons d'utiliser le modèle de l'hétérochromatine péri-centrique du chromosome X chez la drosophile pour étudier le mode d'action antiparasitaire de ces molécules et évaluer, parmi le panel de drogues fournies par nos collaborateurs, les plus prometteuses en termes de biodisponibilité et de non-toxicité dans un organisme métazoaire vivant grâce au test fonctionnel de la PEV de *white-mottled* jouant ici le rôle de système rapporteur de l'état de la chromatine.

Les premiers résultats de ces approches originales sont présentés ci-dessous et détaillés dans l'article ci-joint paru dans la revue spécialisée *Current Medicinal Chemistry - Anti Cancer Agent* ([Susbielle, Blattes et al. 2005](#)). Les implications de ces résultats sont discutées dans la section suivante.

Les travaux entrepris au sein de l'équipe ont permis de montrer qu'à l'instar de ce que l'on observe avec la distamycine, l'interaction *in vitro* de la diamidine DB75 avec les séquences SATIII provoque un changement conformationnel de ces séquences d'ADN comme le révèle la modification de leur mobilité électrophorétique (voir figure 30 et (Susbielle, Blattes et al. 2005)). Cette observation n'est pas sans rappeler celle faite avec l'oligopyrrole P9 (Blattes, Monod et al. 2006)). Du fait de la courbure naturelle des séquences SATIII, liée à la présence d'enchaînements homopolymériques dA•dT, et du mode d'interaction de ces molécules (diamidines, distamycine, oligopyrrole P9) avec l'ADN A•T riches, nous proposons que l'insertion de ces drogues en forme de croissant plan dans le petit sillon des séquences SATIII A•T riches corrige leur courbure naturelle et rétablit un comportement « normal » de ces molécules d'ADN lors de l'électrophorèse.

La comparaison des comportements relatifs des séquences contrôle (pUC18) et SATIII A•T riches révèle également une différence fondamentale entre deux de ces molécules, DB75 et DB293. Alors que DB75 ne se lie de manière non spécifique à la séquence contrôle (pUC18) qu'à des concentrations élevées (piste DB75 50µM, léger retard de migration du fragment pUC18), DB293, quant à elle, interagit avec le contrôle dès la plus basse concentration utilisée (DB293, 2.5µM retard du fragment pUC18 et augmentation de la mobilité électrophorétique du monomère SATIII). Ces différences de comportement reflètent la spécificité de reconnaissance de DB293 pour les séquences 5'-ATGA-3' (Wang, Bailly et al. 2000; Bailly, Tardy et al. 2001; Wang, Carrasco et al. 2001).

Nous avons par ailleurs montré qu'*in vivo*, les diamidines DB75 et DB293 interagissent préférentiellement avec les séquences satellites A•T riches et notamment les séquences SATIII (voir figure 31). Nous souhaitons donc savoir si, comme nous l'avons observé pour P9, l'interaction des diamidines avec les séquences SATIII pouvait interférer avec les interactions ADN/protéines dont ces séquences sont le siège. Pour cela nous avons déterminé la localisation nucléaire de la topoisomérase II par immunomarquage en présence ou en absence de diamidines. En effet, lors d'un traitement par l'oligopyrrole P9, nous avons observé une délocalisation de la topoisomérase des séquences satellites III concomitante au déplacement des protéines D1 et HP1. Cette observation nous avait conduit à émettre, entre autres hypothèses, que la protéine MATH D1 était impliquée dans le recrutement de la topoisomérase II sur ces séquences (pour une discussion plus détaillée voir (Blattes, Monod et al. 2006)). Contrairement à ce que nous observions avec

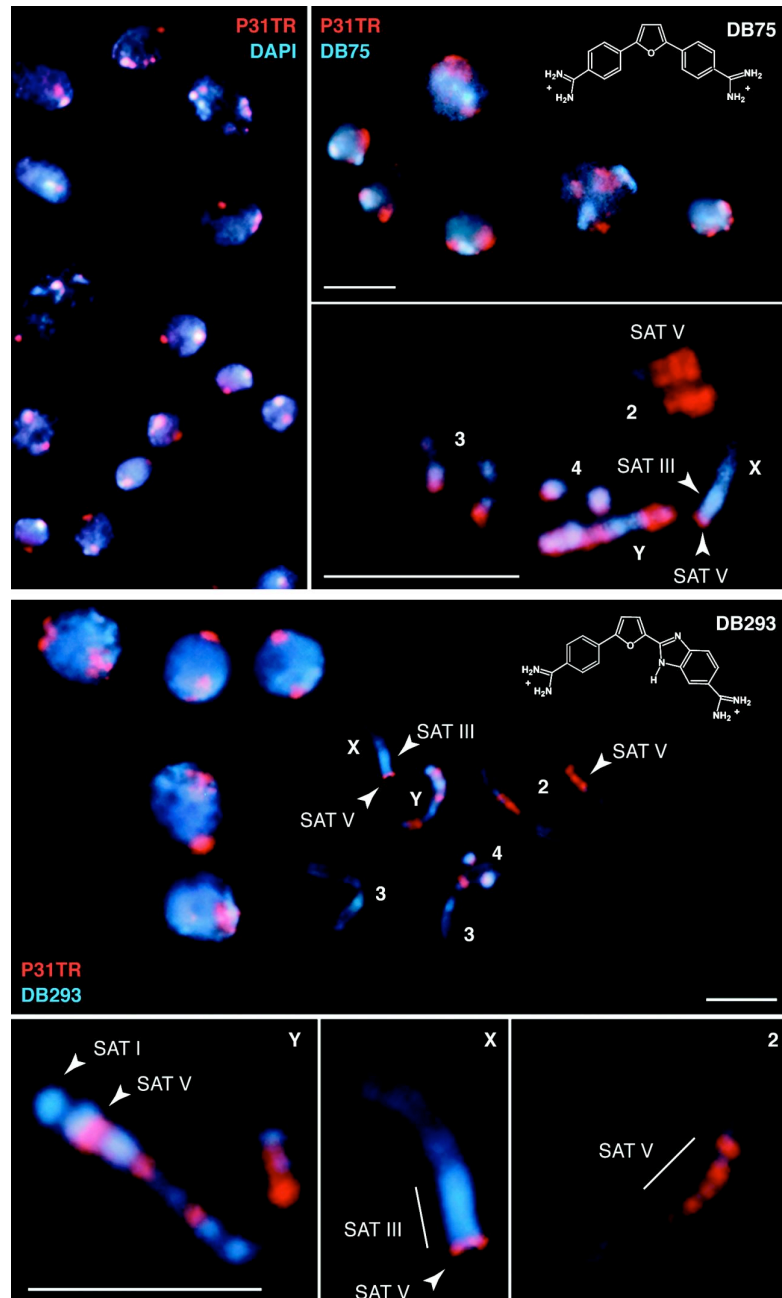


Figure 31 : Localisation de diamidines dans des noyaux de drosophile en interphase et métaphase

Après fixation, des cerveaux de larves de drosophile ont été marqués par 2.5 μ M de DB75 ou DB293 (en bleu) et contremarqués à l'aide d'un dérivé fluorescent de P31 (P31TR) couplé au Texas Red (en rouge) reconnaissant spécifiquement les séquences satellites V (SATV séquence (GAGAA)_n). Pour comparaison, des cellules marquées au DAPI et contremarquées par P31TR sont représentées en haut à gauche. Le marquage des chromosomes mitotiques indique clairement la préférence marquée des diamidines pour les séquences A•T riches telles que les séquences SATIII et SATI. La barre blanche donne l'échelle, elle équivaut à 5 μ m.

P9, dans les cellules de cerveaux de larves de drosophile perméabilisées, le traitement par 2,5 μ M de DB75 conduit en interphase, à une redistribution de la topoïsomérase II vers les régions A•T riches (SATIII) marquées par la diamidine (voir figure 32) (Susbielle, Blattes et al. 2005).

L'observation de ce « recrutement » de la TOPOII sur les séquences SATIII par DB75 nous éclaire-t-il sur le mode d'action antiparasitaire de ces drogues ? Les récents travaux de l'équipe de Wilson, publiés dans le même numéro de la revue Current Medicinal Chemistry que ceux que nous présentons ici, montrent que le kinétoplaste constitue la cible préférentielle de ces molécules chez le trypanosome (Wilson, Nguyen et al. 2005). De plus, ces mêmes travaux révèlent que l'interaction de la diamidine avec le kinétoplaste provoque une dégradation rapide de sa structure et suggèrent que la perte de l'intégrité structurale du kinétoplaste est à la base de l'arrêt de la prolifération du parasite.

Les auteurs de ces travaux firent l'hypothèse que la dégradation du kinétoplaste induite par DB75 reposait sur une dérégulation de la fonction de la topoïsomérase II. Un mécanisme similaire impliquant la topoïsomérase II avait par ailleurs déjà été proposé pour expliquer le mode d'action antiparasitaire de la pentamidine (Shapiro and Englund 1990). Cette molécule synthétisée en 1937, le prototype des diamidines, est l'un des rares médicaments (4 au total) utilisés à ce jour pour lutter contre la trypanosomiase (maladie du sommeil). L'observation plus récente que les phénotypes induits par l'inactivation partielle par RNAi de la topoïsomérase II chez *Trypanosoma brucei* (l'agent de la trypanosomiase) sont similaires à ceux observés lors d'un traitement par la pentamidine (rétrécissement puis perte du kinétoplaste) confortent cette hypothèse (Wang, Morris et al. 2000).

Nos travaux, en dévoilant un lien direct entre l'interaction SATIII/DB75 et la redistribution de la topoïsomérase II *in vivo* semblent soutenir ces conclusions. Bien que le mécanisme par lequel l'association de DB75 aux séquences d'ADN A•T riches qui forment le kinétoplaste conduit à une perturbation de cette structure d'ADN mitochondrial ne soit pas encore compris, nous nous proposons de discuter, dans la section suivante, des scénarios possibles permettant de rendre compte de ces observations.

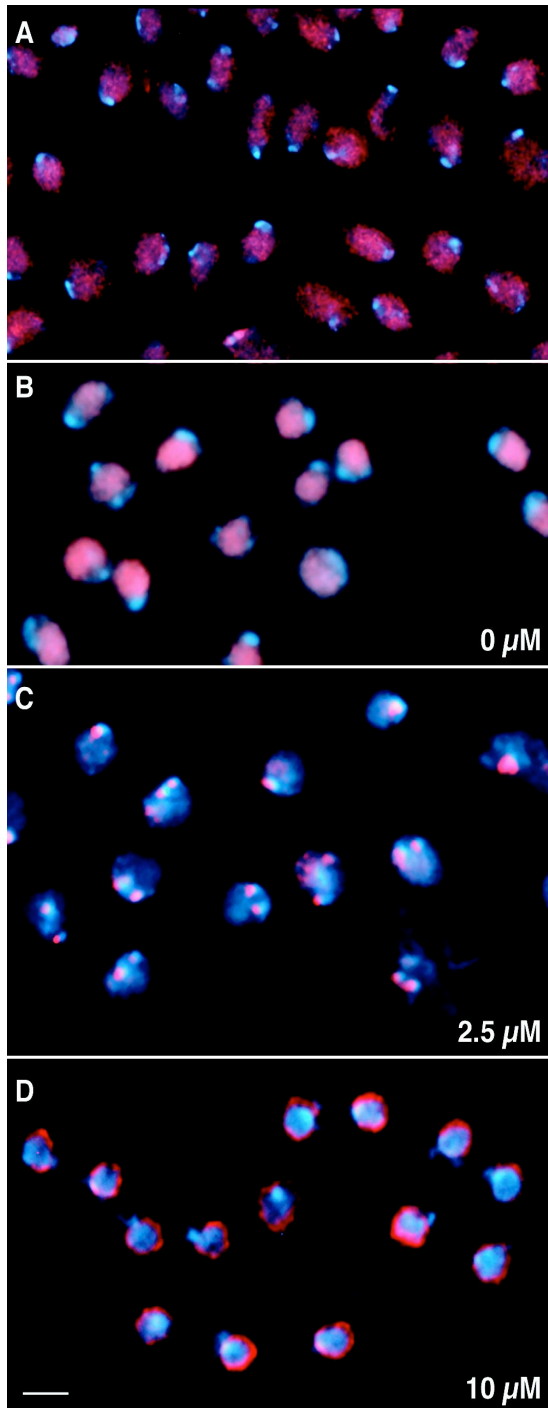


Figure 32 : Relocalisation de la topoïsomérase II par DB75

Des cerveaux de larves de drosophile perméabilisés ont été incubés en présence de concentrations croissantes de DB75 et après fixation, une immunolocalisation de la topoïsomérase II a été réalisée.

A : Immunolocalisation contrôle de la topoïsomérase II en absence de DB75 (contremarquage par le DAPI).

B : Immunolocalisation de la topoïsomérase II similaire à celui présenté en A sans traitement préalable par DB75. Ici le contremarquage est réalisé avec du DB75 ajouté après fixation.

Comme dans le cas du DAPI, la topoïsomérase II est exclue du point brillant qui correspond au DAPI ou à DB75 respectivement.

C et D : L'ajout de DB75 avant fixation provoque une complète redistribution dans le noyau de la topoïsomérase II. A 2,5 μM de DB75 (C), on observe une réversion de la distribution de la TOPOII vers les foci saturés en DB75 alors qu'à 10 μM de DB75, la topoïsomérase II semble exclue du nucléoplasme vers la périphérie du noyau (D).

L'échelle est conservée entre les 4 images, la barre blanche correspondant à 5 μm .

Image tirée de (Susbielle et al. 2005).

III. Discussion

Perturbation de l'hétérochromatine par ciblage de fonctions de modification : déchiffrement du code des histones et étude des séquences péricentriques.

Apparentée à D1, la protéine MATH humaine HMG-A interagit par ses motifs A•T hook préférentiellement avec les séquences satellites alphas de l'hétérochromatine péricentrique. L'interaction D1-SAT III peut donc être vue comme un modèle d'étude de HMGA dont la localisation dans l'hétérochromatine ([Reeves 2001](#)) reste une énigme, aucune fonctionnalité ne lui ayant été attribuée. Chez les mammifères, les protéines HMGA sont fréquemment associées à la régulation –activation ou répression– de l'expression génique ainsi qu'à l'induction de la transformation néoplasique et la progression métastatique de nombreuses tumeurs. En particulier, le mécanisme par lequel la protéine MATH MLL/ALL est impliquée dans certaines leucémies aiguës est aujourd'hui mieux compris ([Tkachuk, Kohler et al. 1992](#); [Dobson, Warren et al. 2000](#)).

Dans ce type de tumeurs, un réarrangement chromosomique associe aux motifs A•T Hook de MLL/ALL de nouvelles fonctionnalités ([Tkachuk, Kohler et al. 1992](#)). Il a clairement été établi que c'est la protéine chimère contenant le motif A•T Hook mais pas le produit réciproque qui constitue le produit oncogène et cette observation a été étendue à l'hypothèse générale selon laquelle le motif A•T Hook seul pourrait induire des transformations néoplasiques ([Dobson, Warren et al. 2000](#)). Ces travaux suggèrent donc que les séquences d'ADN riches en dA•dT pourraient être la cible du signal oncogène et que le ciblage de nouvelles fonctionnalités vers ces séquences serait à l'origine du dérèglement conduisant à la prolifération cellulaire.

L'élucidation de la fonction de ces séquences pourrait donc améliorer notre compréhension de leur rôle dans la perte de contrôle de la prolifération liée au cancer. Les approches moléculaires (système de ciblage des SAT III) et pharmacologique (utilisation de ligands du petit sillon des séquences A•T riches) représentent un pas en avant dans la compréhension de la fonction de ces séquences.

Par ailleurs, la pertinence d'une stratégie consistant à cibler des fonctions de modifications des histones sur les séquences péricentriques à la fois pour disséquer la ou les fonctions des protéines du code et étudier celles des séquences satellites d'hétérochromatine s'est récemment vu confirmée par la publication d'un travail similaire à celui que nous avons entrepris chez la drosophile ([Kourmouli, Sun et al. 2005](#)).

Cette étude a été conduite dans des cellules ES de souris dont les gènes Suvar39h1 et h2 codant les histones méthyltransférases spécifiques d'H3K9 au niveau des régions d'hétérochromatine péricentrique ont été invalidés. Les auteurs de ces travaux ont tiré avantage de l'enrichissement des séquences péricentriques en répétitions A•T riches chez la souris –caractéristique commune avec l'hétérochromatine péricentrique du chromosome X de la drosophile- ainsi que de l'affinité particulière du motif A•T hook pour ces séquences afin de cibler spécifiquement la protéine HP1 sur ces régions en absence de la modification (H3K9me) qui en permet normalement le recrutement. Les auteurs ont ainsi pu démontrer l'aptitude d'une fusion entre HP1 et les 3 motifs A•T hook de HMG-A humaine (fusion MATH-HP1) à récapituler le processus d'assemblage de l'hétérochromatine en absence de Suvar39h1 et h2 et d'H3K9me dans ces régions. MATH-HP1 est ainsi capable de recruter l'enzyme ESET/SETDB1 (une H3K9 histone méthyltransférase euchromatinienne normalement exclue de l'hétérochromatine ([Harte, Wu et al. 1999](#))) et ainsi de restaurer la méthylation d'H3K9 sur ces séquences. De plus, le ciblage de la fusion MATH-HP1 rétablit la méthylation du résidu H4K20, une autre marque de l'hétérochromatine, probablement par le recrutement de l'enzyme SUVAR4-20 ([Schotta, Lachner et al. 2004](#)). Ces travaux confirment que le rôle d'HP1 n'est pas restreint à la lecture du code mais que cette protéine joue également un rôle intermédiaire dans l'établissement de ce code par le recrutement de fonctions de modifications des histones.

Si le système utilisé par les auteurs a permis une dissection du rôle d'HP1 dans l'assemblage d'un compartiment d'hétérochromatine et de pointer son rôle essentiel à la fois dans la lecture et l'écriture du code, le système que nous avons mis au point chez la drosophile en étend les possibilités. Tout d'abord, la lignée *ln(1)wm4h* offre un test fonctionnel simple des transgènes d'intérêt (visualisation directe de leur impact sur la PEV de *white-mottled*). Ensuite, notre système bénéficie de la grande souplesse et de

l'incomparable puissance du modèle drosophile comme outil génétique. Ce modèle permet, entre autres, par la diversité des lignées pilotes, de déterminer le tissu et la période du développement pour l'expression du transgène. Il permet également, grâce aux nombreuses lignées mutantes disponibles, de modifier aisément le fond génétique dans lequel est placée l'expression du transgène. Cette souplesse permet de s'adapter à une problématique donnée et la possibilité de travailler dans un organisme métazoaire vivant, permet d'aborder certaines questions pour lesquelles les systèmes cellulaires ne sont pas pertinents, en tête desquelles le rôle des séquences satellites au cours du développement.

Bien qu'à ce jour, le système que nous avons mis au point ne soit que partiellement validé, l'utilisation des outils construits durant ma thèse permettrait de pousser plus loin les résultats de Kourmouli et ses collaborateurs. Les fusions entre différents domaines fonctionnels d'HP1 (chromodomaine, chromo-shadow domaine associé ou non à la région charnière) et MATH20 sont déjà construites. Ces constructions permettraient de compléter cette dissection de la fonction d'HP1 en caractérisant les domaines protéiques nécessaires et suffisants pour récapituler l'assemblage de l'hétérochromatine péricentrique. Un tel système pourrait ainsi permettre de disséquer la fonction de chacun des nombreux (plus de 30) suppresseurs de variégation identifiés dans la lignée *In(1)wm4h* et compléter la panoplie d'outils d'étude du code des histones. Un des premiers facteurs à l'étude duquel nous pensons appliquer ce système est l'enzyme SU(VAR)3-9, pour lequel, comme dans le cas des fragments d'HP1, la fusion entre MATH20 et le domaine fonctionnel (domaine SET) a déjà été établie.

Perturbation de l'hétérochromatine par des ligands du petit sillon : les séquences péricentriques comme nouvelle cible thérapeutique.

La séquence de la molécule d'ADN influence directement ses propriétés structurales (Travers and Klug 1987). Un des exemples les plus frappants est celui des enchaînements réguliers de poly (A)•Poly (T) qui altèrent la structure générale de la conformation B de l'ADN, conformation canonique de l'ADN dans des conditions physiologiques. Les structures non canoniques adoptées par ce type de séquences influencent à leur tour la nature des facteurs protéiques interagissant avec elles (Hibino, Nakamura et al. 1993). Lorsqu'ils

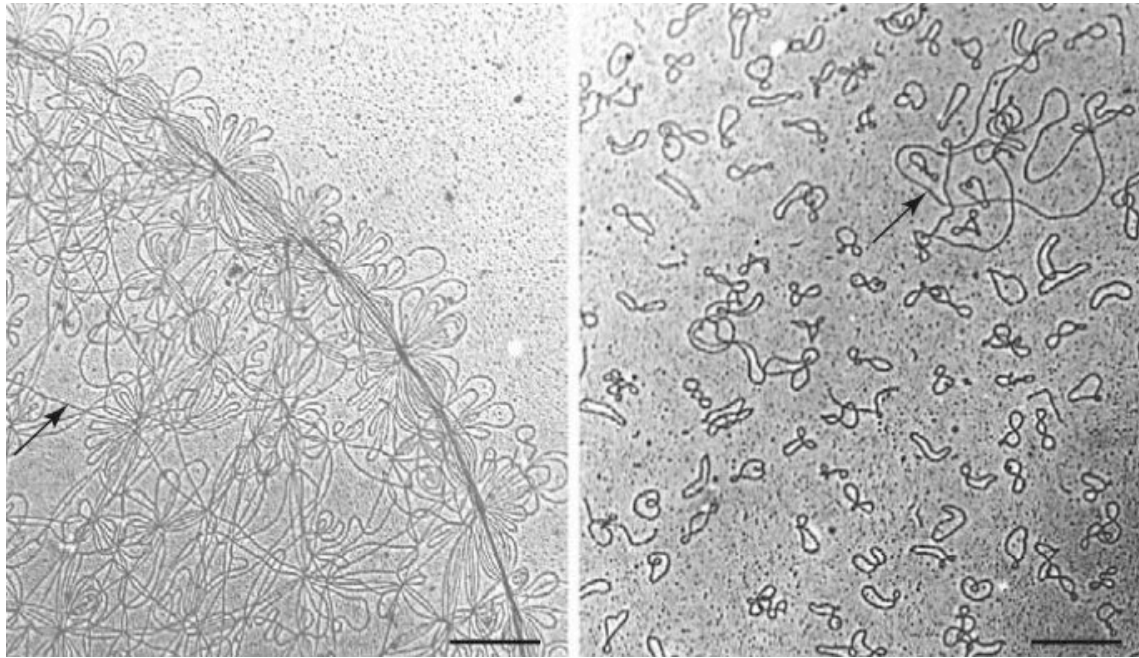


Figure 33 : Electromicrographie du réseau de kinétoplaste de *Crithidia fasciculata*. Ces images de microscopie électronique illustrent la complexité structurale du réseau de kinétoplaste qui correspond au génome mitochondrial chez les protozoaires parasites appartenant au genre des kinétoplastides (*Trypanosoma*, *Leishmania* et *Crithidia*). Ce réseau est constitué de minicercles et de maxicercles d'ADN concaténés. Les maxicercles codent l'ARN et les protéines ribosomales dont les transcrits sont édités par des guides codés sur les minicercles d'ADN, ainsi que les protéines de la chaîne respiratoire. La fonction de la topoïsomérase II est indispensable à la réplication du kinétoplaste pour la déconcaténation des minicercles avant la réplication et des cercles néosynthétisés après réplication.

A gauche : Portion d'un kinétoplaste intact.

A droite : Après action de la topoïsomérase II, réseau décaténé.

L'échelle est indiquée par la barre grise qui correspond à 0.5 μm . la flèche pointe un maxicercle (c.a. 38 kb) au milieu d'un réseau de minicercles (c.a. 2.5 kb).

Image tirée de (Liu et al. 2005).

sont en phase avec le pas de l'hélice, les enchaînements de courtes répétitions d'adénines appelées A-tracts provoquent une courbure des molécules d'ADN qui les arborent ([Crothers, Haran et al. 1990](#)). Celle-ci se traduit, lors de leur migration sur gel de polyacrylamide, par une mobilité électrophorétique réduite par rapport à des séquences de même taille mais de composition nucléotidique non biaisée. À cette courbure inhabituelle de l'hélice, viennent s'ajouter d'autres caractéristiques structurales des séquences portant des A-tracts, en particulier un petit sillon particulièrement étroit et profond.

De telles caractéristiques (courbure, migration anormale) ont été initialement décrites pour l'ADN du kinétoplaste, structure atypique adoptée par l'ADN mitochondrial des parasites du genre *kinetoplastidae* tels que les trypanosomes et *Leishmania* ([Ntambi, Marini et al. 1984](#)). Ces structures sont constituées de minicercles et maxicercles d'ADN entrelacés et codent pour des fonctions essentielles à la viabilité de ces parasites. Les ARN et protéines ribosomales ainsi que certaines protéines de la chaîne respiratoire sont codées par les maxicercles (quelques dizaines de copies entre 20 et 40 kb), certains de ces transcrits étant maturés par des ARN guides majoritairement codés sur les minicercles (plusieurs milliers de copies de taille très variable) (pour revue ([Lukes, Guilbride et al. 2002](#); [Liu, Liu et al. 2005](#)) voir [figure 33](#)). La prolifération des kinétoplastides, tels les trypanosomes, nécessite donc la réplication du kinétoplaste.

Du fait de la complexité structurale de cet assemblage de cercles d'ADN concaténés, les étapes initiales et finales de la réplication des kinétoplastes nécessitent l'activité des topoisomérases et notamment de la topoisomérase II ([Burri, Bodley et al. 1996](#)). En effet, selon le modèle actuel, la réplication des minicercles requiert au préalable leur libération du réseau du kinétoplaste qui repose sur la fonction de décaténation portée par la topoisomérase II. L'activité de la TOPOII est également requise au cours de ce processus pour l'attachement des minicercles nouvellement synthétisés et de leur progéniteur au réseau périphérique du kinétoplaste ([Liu, Liu et al. 2005](#)). Une fois de plus, le caractère essentiel des topoisomérases en a fait des cibles préférentielles dans les stratégies antiparasitaires dirigées contre les trypanosomes et *Leishmania*, responsables de pandémies qui freinent considérablement le développement des pays pauvres ([Das, Dasgupta et al. 2001](#); [Das, Dasgupta et al. 2004](#)).

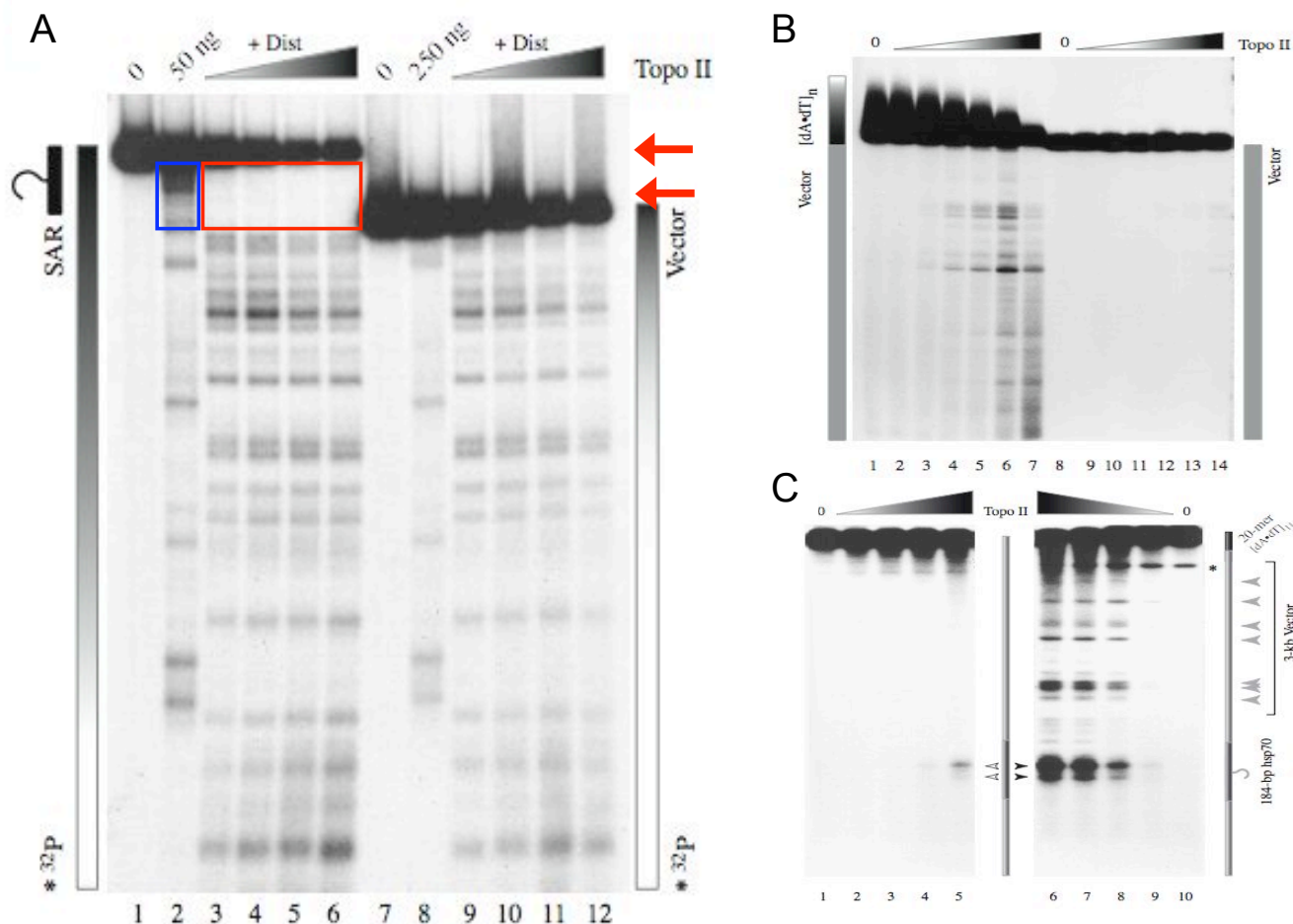


Figure 34 : Impact des séquences A•T riches et de leurs ligands sur l'activité de clivage par la topoisomérase II.

Autoradiogrammes de molécules d'ADN linéaires radiomarquées après clivage par la TOPOII en présence de VM26.

A : Les séquences SAR A•T riches sont des sites préférentiels d'interaction et de clivage par la topoisomérase II (piste 2 cadre bleu). La présence d'une séquence SAR à l'extrémité d'une molécule d'ADN (vector) augmente l'interaction de cette molécule avec la topoisomérase II comme le traduit son clivage accru en présence de VM26 (comparer pistes 2 et 8: il faut 5 fois plus de Topoisomérase II pour une même intensité de clivage). L'ajout de distamycine (ligand du petit sillon spécifique des séquences A•T riches), bien qu'il inhibe l'interaction SAR-TOPOII, stimule l'activité de clivage TOPOII par la séquence SAR (comparer pistes 3 à 6 et 9 à 12).

B : De la même manière, l'activité de clivage TOPOII est fortement stimulée par la présence d'une répétition d'un enchaînement [dA•dT]_n (où dA•dT= 11 paires de bases et n=20) à l'extrémité de la molécule d'ADN vecteur. Cette séquence A•T riche n'étant pas elle-même une cible de la topoisomérase II (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que c'est l'enrichissement en dA•dT seul et non pas la nature particulière des SAR ou leur interaction préférentielle avec la TOPOII qui est le déterminant majeur de cette aptitude des SAR à activer le clivage par la topoisomérase II (voir discussion pour une analyse plus complète).

L'aptitude des ligands du petit sillon à moduler à distance l'activité de la topoisomérase II a largement été décrite dans la littérature ([Wojnarowski, McHugh et al. 1989](#); [Wojnarowski, Sigmund et al. 1989](#); [Bell, Kittler et al. 1996](#); [Bell, Kittler et al. 1997](#)) et notamment celle de la distamycine à faciliter le clivage de séquences d'ADN ([Fesen and Pommier 1989](#)) telles que les séquences SAT III ([Kas and Laemmli 1992](#)). Ces derniers travaux avaient par ailleurs conduit les auteurs à émettre l'hypothèse que les séquences A•T riches jouaient le rôle de point d'entrée de la topoisomérase II dans une séquence d'ADN et que les molécules interagissant avec l'ADN, notamment les molécules structuellement apparentées à la distamycine telles que les diamidines, permettaient une modulation de la fixation et de l'activité de la topoisomérase II à proximité des sites de fixation mais aussi à distance.

Nous présentons ci-dessous de nouveaux résultats soulignant une aptitude générale des séquences A•T riches à faciliter l'interaction de la topoisomérase II avec l'ADN et à favoriser son activité de clivage en présence du poison VM26. Ces résultats démontrent également l'aptitude de la distamycine (comme prototype des ligands du petit sillon des séquences A•T riches) à stimuler l'activité de la TOPOII.

Les séquences SAR d'attachement à la matrice nucléaire sont des sites préférentiels d'association de la TOPOII et portent des sites forts de coupure (voir plus haut et [voir figure 34 A](#) et encadré bleu). Nous montrons ici que leur présence sur l'extrémité d'une molécule d'ADN libre stimule son clivage par la topoisomérase II en présence du poison VM26 d'un facteur supérieur à 5 ([voir figure 34 A](#), comparer les pistes 2 et 8 et les concentrations de TOPOII). Cette première observation suggère que le mode de fixation coopératif de la topoisomérase II ([Adachi, Kas et al. 1989](#)) intervient dans la stimulation du clivage TOPOII/VM26 par les SAR.

En effet, l'ajout de quantités croissantes de distamycine inhibe l'interaction de la TOPOII avec le SAR et abolit son clivage ([voir figure 34 A](#), observer la zone protégée correspondant au SAR sur les pistes 3 à 6 encadrée en rouge), l'augmentation de l'activité de clivage de la TOPOII par le SAR est également abolie. Ce résultat suggère que, en absence de fixation de TOPOII sur le SAR, la seule présence de cette séquence A•T riche ne suffit plus à stimuler le clivage à distance de l'ADN par la TOPOII.

Comme nous le proposons plus haut, cette expérience montre que l'interaction TOPOII/SARIII est nécessaire à la stimulation du clivage TOPOII et suggère que la coopérativité de la topoisomérase II est le déterminant majeur de la stimulation du clivage TOPOII/VM26 par les SAR.

Outre la corrélation qui existe entre la séquence de l'ADN et sa structure (notion de microhétérogénéité), une caractéristique essentielle de l'ADN repose sur l'aptitude du squelette phosphodiester à transmettre l'information structurale à distance le long de la double-hélice ([Burd, Wartell et al. 1975](#)). Cette caractéristique appelée téléstabilité, a initialement été mise en évidence pour des séquences homopurine-homopyrimidine poly(G)•poly(C) ([Kohwi-Shigematsu and Kohwi 1985](#)). L'expérience que nous présentons ici prouve que l'interaction d'un ligand du petit sillon tel que la distamycine avec une séquence A•T riche influence à distance les interactions entre la molécule d'ADN qui porte cette séquence et les protéines qui la reconnaissent (ici la topoisomérase).

Tout d'abord, nous avons vu que la présence d'une séquence SAR modifie l'intensité mais ne modifie pas le profil de clivage de l'ADN par la TOPOII (comparer les pistes 2 et 8 ou les pistes 3 et 9).

En revanche, l'ajout de distamycine modifie à la fois les profils de clivage TOPOII/VM26 (comparer les pistes 2 et 3 *idem* pistes 8 et 9) et son intensité (comparer les pistes 3 à 6 *idem* pistes 9 à 12). La stimulation de l'activité TOPOII par la distamycine, déjà décrite dans la littérature (voir plus haut) est révélée ici par la diminution dose-dépendante de l'intensité des bandes correspondant aux fragments non clivés (flèches). La modification de profil de clivage TOPOII par la distamycine est liée à la protection par la drogue des sites préférentiels de coupure TOPOII A•T riches comme le révèle l'inversion des sites clivés entre les pistes 2 et 3.

Enfin, la distamycine, inhibe l'interaction SAR-TOPOII, ainsi que la stimulation de l'activité TOPOII par la séquence SAR (mêmes intensités des pistes 3 à 6 et des pistes 9 à 12).

Sur la base de ces observations, nous proposons :

- Premièrement, que la présence de séquences SAR dans une molécule d'ADN stimule l'activité de clivage par la topoisomérase II en présence de VM26 et que la coopérativité de la topoisomérase II pour la fixation à l'ADN (au site de nucléation que constitue le SAR) est la force majeure qui explique la stimulation de l'activité de clivage TOPOII par les SAR conduisant, soit à la facilitation du recrutement de la TOPOII sur la molécule d'ADN (interaction favorisée), soit à la stimulation directe de son activité (cinétique augmentée).
- Deuxièmement, nous observons que la distamycine stimule également le clivage TOPOII/VM26 indépendamment de la présence de SAR. Nous suggérons que l'effet de la distamycine repose sur l'induction de changements de conformation de la double hélice.
- Néanmoins, nos résultats révèlent une absence de synergie entre la stimulation du clivage TOPOII/VM26 induite par les SAR et celle induite par la distamycine. Ceci est dû à la protection des sites d'interaction préférentiels de la TOPOII sur les SAR par les diamidines empêchant l'interaction SAR/TOPOII.

Afin de déterminer si cette stimulation de l'activité TOPOII par les séquences SAR est liée à leur nature ou s'il s'agit d'une propriété générale des séquences A•T riches, nous avons réalisé des expériences similaires de clivage TOPOII en présence de VM26 en substituant un polymère dA•dT à la séquence SAR présente à l'extrémité de la molécule d'ADN (vecteur) (voir figure 34 B). Comme observé pour les SAR, la présence d'une séquence 100% A•T riche de 220 paires de bases (oligomère (dA•dT) de 11 paires de bases répété 20 fois) stimule l'activité de clivage TOPOII sur la séquence portant le polymère dA•dT par rapport à la séquence contrôle qui en est dépourvue. Il semble donc que cette capacité d'activation de la topoisomérase II ne se limite pas aux seules séquences SAR et semble une caractéristique plus générale des séquences A•T riches.

Nous montrons de plus que cette stimulation de la TOPOII par les séquences A•T riches est transmise à distance (voir figure 34 C) comme le prouve la réactivation du clivage des sites dits « forts » de coupure TOPOII présents sur les séquences SAR et décrits il y a plus de 20 ans (Sander and Hsieh 1983; Sander and Hsieh 1985) séparé de la séquence A•T riche par plus de 3 kilopaires de bases. Nous notons de plus que, contrai-

rement à ce qui était supposé jusqu'à présent, les SAR ne constituent pas en soi des sites préférentiels de clivage par la TOPOII mais que ce clivage dépend plutôt de l'environnement de cette séquence et plus particulièrement de la présence de séquences A•T riches. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de l'équipe de Laemmli qui avait démontré la nécessité d'une séquence minimale de 120 paires de bases 100% A•T pour la fixation de la topoïsomérase II à l'ADN ([Adachi, Kas et al. 1989](#)).

Les résultats que nous discutons ci-dessous nous poussent à étendre nos précédentes conclusions sur la distamycine et les séquences A•T riches, aux diamidines et leur interaction avec les séquences SATIII et à les préciser. Nos expériences indiquent en effet que l'interaction *in vitro* des diamidines avec un monomère SATIII modifie sa structure et corrige sa courbure naturelle ([voir figure 30](#) et commentaires associés). Nous avons attribué les changements conformationnels observés, que traduisait l'augmentation de mobilité électrophorétique du fragment SATIII, au mode d'interaction connu des diamidines par insertion dans le petit sillon ([Susbielle, Blattes et al. 2005](#)). Alternativement, compte tenu de l'existence de dinucléotides CpG dans la séquence de SATIII, la correction de la courbure que nous observons pourrait être due à l'aptitude des diamidines à s'insérer, à fortes concentrations au niveau des sites GC. Ce mode d'interaction non spécifique des diamidines avait notamment été proposé pour le DAPI ([Wilson, Tanious et al. 1989](#); [Trotta, D'Ambrosio et al. 1995](#)) et DB60 ([Bailly, Dassonneville et al. 1999](#)) et semblait conforté par des études structurales indiquant que l'insertion de DB75 dans le petit sillon au niveau de la séquence centrale AATT d'un dodécamère d(CGCGAATTCGCG)₂ n'induisait pas de modification notable de la structure secondaire de cette séquence d'ADN ([Trent, Clark et al. 1996](#)).

Néanmoins, l'analyse des profils de migration que nous avons obtenus pour DB75 suggère que les modifications structurales à la base de l'augmentation de la mobilité électrophorétique de SATIII lié par DB75 sont liées au mode de fixation spécifique des diamidines par insertion dans le petit sillon. Cette conclusion est basée sur la comparaison des profils de migration des séquences SATIII et contrôle (pUC18) pour de faibles concentrations de drogues. En effet, en dessous de 50 µM de DB75, on n'observe aucune modification du comportement de la séquence pUC18 (pas de retard de migration) suggérant que, pour cette gamme de concentration, le seul mode de fixation de DB75 passe par son mode d'interaction spécifique au niveau du petit sillon. A 50µM en revan-

che, le fragment pUC18 est retardé, D75 s'intercalant de manière non spécifique entre les plateaux de bases aux sites CG.

L'apparente contradiction entre nos résultats et les observations plus anciennes de la structure du cristal formé par DB75 lié au dodécamère d(CGCGAATTCGCG)₂ (Trent, Clark et al. 1996) suggérant que l'insertion des diamidines dans le petit sillon ne peut rendre compte de ces modifications structurales, ne sont pourtant pas inconciliables. En effet, le travail de Trent et collaborateurs repose sur l'analyse de la structure cristallographique du complexe ADN-DB75. L'obtention d'un cristal reposant sur l'augmentation de la concentration saline, il nous semble, compte tenu de la nature polyanionique du polymère d'ADN et de l'influence de la concentration ionique sur ses propriétés structurales, que l'analyse cristallographique introduit un fort biais dans le comportement du complexe ADN-diamidine. Pour cette raison, et du fait des différences évidentes entre l'oligomère utilisé par Trent dans son étude et la complexité des séquences naturelles auxquelles nous nous intéressons (SATIII de 359 paires de bases ou cercles d'ADN kinétoplastiques de plusieurs kilobases), nous faisons l'hypothèse que l'absence de modifications notables de la structure secondaire du dodécamère lié par DB75 dans le cristal, ne peut en aucun cas rendre compte du comportement des séquences satellites liées par DB75 *in vitro* et encore moins *in vivo* dans le contexte physiologique de l'hétérochromatine péri-centrique ou celui structurellement très différent du kinétoplaste.

Ainsi nous proposons que la fixation *in vivo* des diamidines dans le petit sillon des séquences kinétoplastiques A•T riches induit des changements conformationnels de la molécules d'ADN. Ces derniers favoriseraient l'interaction de la topoïsomérase II avec ces séquences (comme le suggère le recrutement de cette dernière sur les SATIII *in vivo* [figure 32](#)). L'accumulation de topoïsomérase II sur ces séquences augmenteraient l'activité de clivage qui conduirait, à terme, à l'accumulation de cassures double brins par collision avec les enzymes motrices de l'ADN (complexes polymérases de la fourche de réplication ou de la machinerie de transcription). L'accumulation de ces cassures double brin, naturellement prises en charge par la cellule, deviendrait au niveau d'un certain seuil, toxique car elle conduirait à la destruction du réseau du kinétoplaste processus observé par Wilson lors d'un traitement aux diamidines sur des trypanosomes (Wilson, Nguyen et al. 2005).

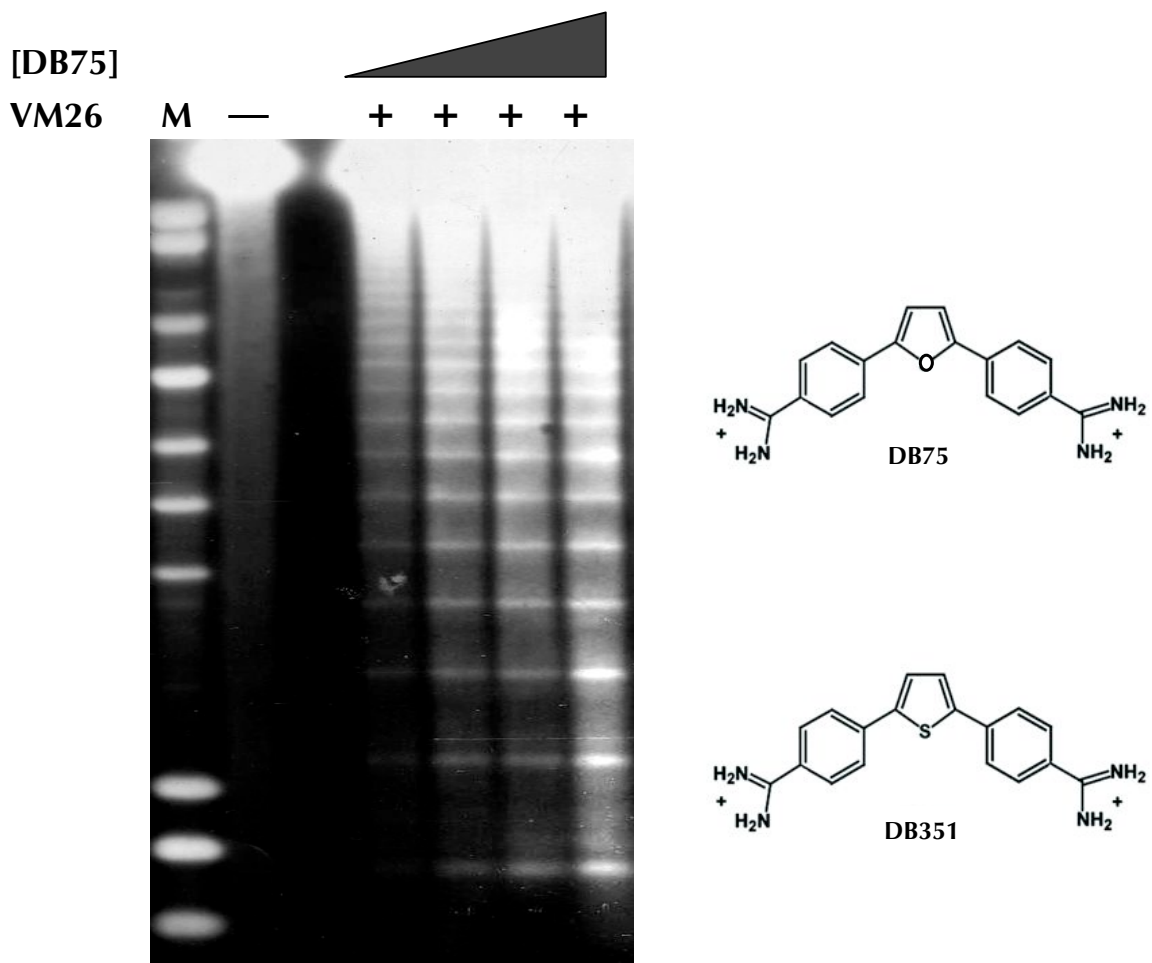


Figure 35 : Test de clivage par la topoïsomérase de séquences satellites SATIII induit par le téniposide VM26 en présence de diamidine DB75.

L'ADN génomique de cellules S2 de drosophile incubées dans du DB75 (dont la structure est représenté en haut à droite) puis dans du téniposide a été purifié. Après migration sur gel d'agarose puis transfert sur membrane, cet ADN a été hybridé à l'aide de sondes correspondant aux séquences satellites alphoïdes SATIII. On observe que le traitement par des concentrations croissantes de DB75 augmente l'activité de clivage des SATIII par la topoïsomérase. Cette observation fait écho à l'accumulation *in vivo* de la topoïsomérase II sur les séquences satellites lors du traitement par DB75. De manière intéressante, le dérivé DB351 dont la structure est proche de celle de DB75 est capable de supprimer la PEV de *white-mottled* dans la lignée *In(1)wm4h* (voir figure 36) (Vanessa Brevet, résultats non publiés et Susbielle et al. 2005).

Un corollaire de cette hypothèse serait que, lors du recrutement de la topoïsomérase II vers les séquences satellites III par la diamidine DB75, l'accumulation de complexes clivables devrait se traduire par une augmentation de l'activité de clivage par la topoïsomérase II en présence de VM26. En accord avec cette hypothèse, des résultats préliminaires obtenus sur des embryons de drosophile traités par des doses croissantes de diamidines puis traitées au VM26, indiquent une augmentation de l'activité de clivage de la topoïsomérase II sur les séquences satellites III qui constituent les sites majeurs de fixation de DB75 *in vivo* (voir figure 35). DB75 ne possédant pas d'activité d'empoisonnement de la TOPOII (Bailly, Dassonneville et al. 1999), cette augmentation du clivage des SATIII par DB75 repose intégralement sur le recrutement massif de cette enzyme sur ces séquences.

Alternativement, nous ne pouvons exclure, qu'*in vivo*, la fragmentation du kinétoplaste observée par Wilson soit liée non pas à une augmentation de l'activité de clivage par la TOPOII mais plutôt à son inhibition, l'inactivation de cette enzyme par RNAi conduisant également à la destruction de la structure kinétoplastique (Wang and Englund 2001).

Jusqu'ici, nos expériences, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, sur les séquences satellites de drosophile, bien qu'elles identifient la fonction de la topoïsomérase II au niveau du kinétoplaste comme cible des diamidines, ne permettent pas d'élucider le mode d'action anti-parasitaire de cette classe de ligands du petit sillon, notamment elles ne permettent pas de trancher entre une activation ou une répression de la fonction de clivage ce à quoi répondraient des tests de clivage TOPOII/VM26 réalisés sur des kinétoplastes en présence de diamidines.

Enfin, un résultat riche en perspectives, est notre observation que le traitement de larves de drosophile de la lignée *In(1)wm4h* par DB351, un dérivé très proche de DB75 (voir figure 36), supprime la PEV de *white-mottled*. Ce dernier résultat renforce l'idée, déjà suggérée par ceux obtenus avec l'oligopyrrole P9, d'un rôle fonctionnel de la topoïsomérase II dans l'établissement d'une structure d'hétérochromatine. De plus, DB75 n'induisant pas de modification de la PEV de *white-mottled in vivo*, la suppression de la PEV par DB351, le composé le plus proche sur le plan structural de DB75, va dans le sens d'une augmentation de l'activité de clivage par la topoïsomérase II (tout comme VM26). L'aptitude de DB351 à stabiliser les complexes de clivage n'ayant pas été décrite

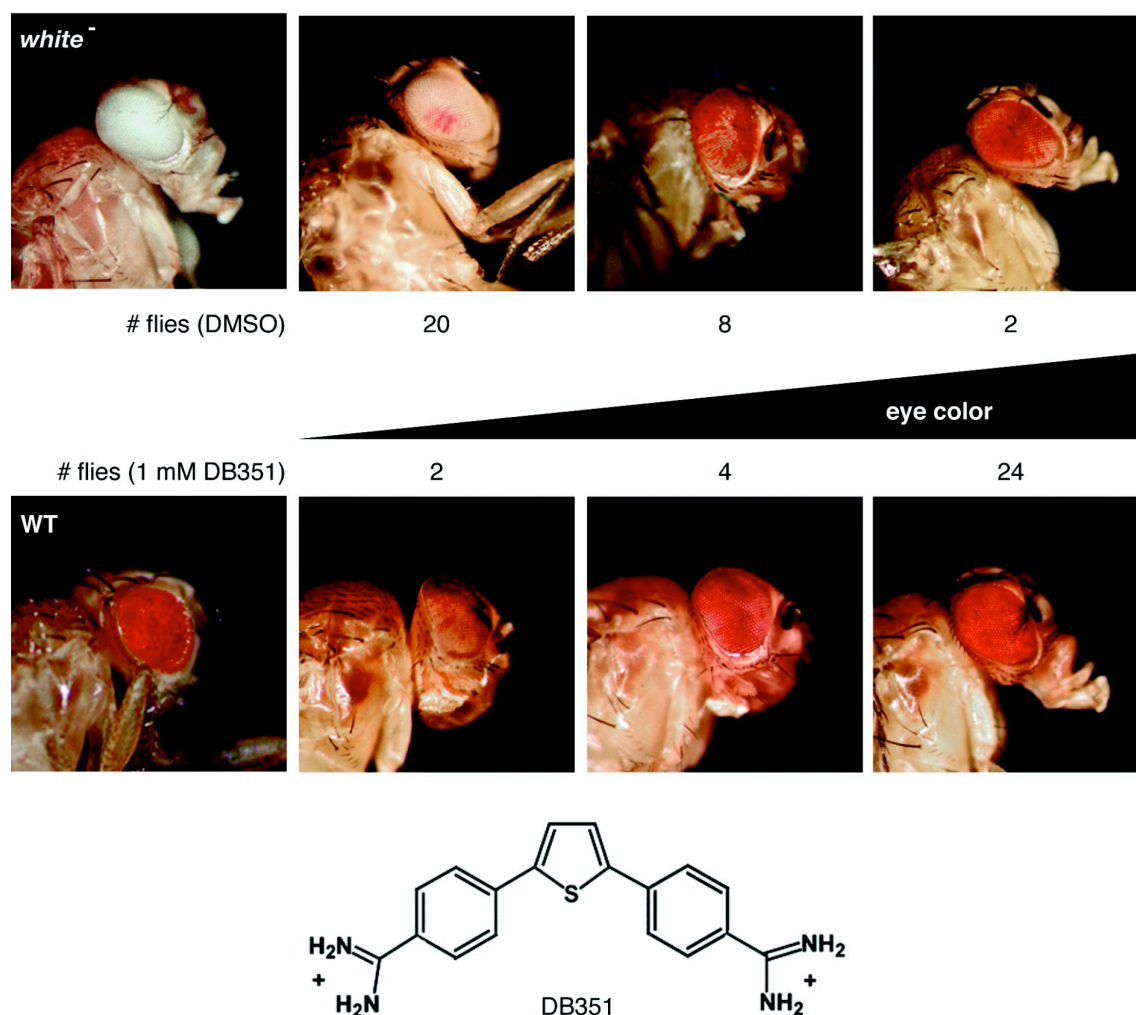


Figure 36 : Suppression de la PEV de *white-mottled* par le composé DB351
Des larves de troisième stade de la lignée *ln(1)wm4h* ont été nourries d'une pâte de levure réhydratée supplémentée de 1mM de DB351 dont la structure est représentée. Cette molécule très proche structurellement de DB75 ne diffère de cette dernière que par un atome de soufre (cycle thiophène de DB351) substitué à un atome d'oxygène (cycle pyrrole de DB75). La répartition des phénotypes de 30 individus issus de larves nourries par du DB351 est comparée à celle des individus contrôles issus des larves nourries par du DMSO (le solvant dans lequel sont diluées les diamidines). Chez les individus traités au DB351, on note une forte suppression de la PEV de *white-mottled* qui traduit une perturbation de la structure de l'hétérochromatine dont une des causes pourrait être un déplacement de la topoïsomérase II comme observé avec DB75 (voir figure 32). L'œil d'un individu sauvage (WT) et mutant pour le gène *white* (*white⁻*) sont présentés pour comparaison.
Image tirée de (Susbielle et al. 2005).

dans la littérature, nous ne pouvons exclure que cette suppression de PEV par DB351 puisse résulter de l'empoisonnement de la TOPOII.

Dans le milieu naturel, la production de distamycine par *Streptomyces distallicus* dont le génome est enrichi en paires de bases G•C, participe d'une stratégie de ciblage des génomes A•T riches des microorganismes avec lesquels ce champignon entre en compétition. Nous proposons que le ciblage de génomes ou portions de génome (e.g. kinétoplaste) A•T riches pourrait constituer une alternative aux stratégies chimiothérapeutiques classiques prenant généralement pour cible une protéine. L'apparition de résistances à ce type de stratégies, bien que déjà observé ([Basselin, Badet-Denisot et al. 1998](#)) est beaucoup plus rare que ce qui est observé lorsque la pression de sélection est exercée sur un facteur protéique car, dans ce cas, elle implique un remaniement beaucoup plus vaste du génome pour en modifier la composition nucléotidique générale.

Nous proposons enfin que le ciblage des régions péricentriques et la modulation de l'activité de la topoïsomérase II sur les séquences qui les composent à l'aide de ligands du petit sillon (et notamment de diamidines) puisse constituer, à terme, une stratégie alternative de lutte contre le cancer. En effet, la perturbation des séquences péricentriques pourrait, en altérant l'aptitude des cellules tumorales à se diviser, limiter la progression tumorale. Contrairement aux approches actuelles prenant pour cible une protéine (e.g. la topoïsomérase), le ciblage de séquences par le biais de leur composition nucléotidique biaisée et dont la fonction dans les cellules quiescentes est relativement limitée pourrait permettre de s'affranchir du caractère toxique des thérapeutiques classiques liées entre autres aux remaniements chromosomiques consécutifs aux cassures double-brins induites par les poisons de la TOPOII et conduisant à des formes spécifiques de leucémies (voir plus haut).

Le modèle des séquences satellites III alphas qui composent les régions d'hétérochromatine péricentriques du chromosome X de la drosophile, et plus particulièrement la lignée modèle *In(1)wm4h*, a déjà permis de nombreux progrès dans notre compréhension du mode d'assemblage de l'hétérochromatine. Nos travaux soulignent la possibilité d'étendre à l'avenir l'utilisation de ce modèle à l'évaluation des propriétés pharmacologiques (biodisponibilité, toxicité) de molécules dont ces séquences sont la cible. Les larves de drosophile offrent ainsi un nouveau moyen d'étudier, dans un organisme

métazoaire vivant et au cours du développement, l'impact de la prise par voie orale de molécules d'intérêt thérapeutique sur la structure chromatinienne. Le test fonctionnel de la modification de la PEV de *white-mottled* autorise le criblage rapide de nombreux composés tout en permettant de s'affranchir dans un premier temps de modèles animaux plus lourd à manipuler et donc moins adaptés pour les premières étapes de sélection et d'évaluation de larges familles de composés et de leurs dérivés.

IV. Conclusion

L'hypothèse selon laquelle les modifications post-traductionnelles des extrémités amino-terminales des histones constituent un code, bien qu'elle fut formalisée en l'an 2000 dans l'article de Strahl et Allis est apparue il y a plus de 13 ans ([Turner, Birley et al. 1992](#); [Turner 1993](#)). L'identification d'un nombre croissant de modifications ([Nightingale, O'Neill L et al. 2006](#)), d'enzymes de modifications et de facteurs reconnaissant ces modifications ([Bottomley 2004](#); [Daniel, Pray-Grant et al. 2005](#); [Kim, Daniel et al. 2006](#)) a depuis fait passer ce qui n'était à l'origine qu'une théorie au rang de fait scientifique établi.

Ce changement de paradigme est une révolution scientifique tout aussi importante que la découverte du code génétique. Mais à l'inverse de ce dernier qui est caractérisé par son universalité, sa simplicité et son caractère univoque, le code des histones ou code de la chromatine ([Lesne 2006](#)) semble quant à lui d'une complexité infinie et comme le soulignent des travaux récents ([Vakoc, Mandat et al. 2005](#); [Hediger and Gasser 2006](#); [Huisinga, Brower-Toland et al. 2006](#); [Lomberg, Bensi et al. 2006](#)), loin du pouvoir prédictif du code génétique. Là où le code génétique assigne une correspondance unique en acide aminé à un triplet de nucléotides, le code des histones ne s'entend que par la combinaison des modifications, non seulement sur l'extrémité d'une histone mais aussi des histones au sein d'un nucléosome, voire de nucléosomes voisins dans un faisceau compact de chromatine comme la fibre de 30 nm. Et encore faut-il ajouter qu'à une combinaison de modifications données ne correspond pas seulement un état figé de la chromatine mais aussi la possibilité latente pour cette chromatine d'adopter une conformation spécifique en temps voulu en réponse à un facteur environnemental ou à des signaux développementaux.

De certitudes bien établies, le tableau dressé aujourd'hui est celui d'un code complexe basé sur la coexistence d'activités antagonistes agissant sur un même locus parfois même au sein d'un même complexe pour « entraîner » la chromatine dans une direction donnée et où l'ordre même dans lequel sont réalisées ces modifications est source d'information ([Agalioti, Chen et al. 2002](#); [Metivier, Penot et al. 2003](#); [Huang, Litt et al. 2005](#); [Morillon, Karabetsou et al. 2005](#); [Ng, Chandrasekharan et al. 2006](#)). Non seulement les possibilités et les niveaux de modifications (mono-, di- ou triméthylation, diméthyla-

tion symétrique ou asymétrique) et donc les combinaisons de ces modifications sont nombreux, mais surtout les niveaux sur lesquels influent ces modifications sont multiples.

De la reconnaissance d'une modification par un facteur de transcription (interaction biochimique spécifique) au recrutement de complexes de remodelage de la chromatine, de l'influence croisée de modifications (inhibition, synergie, empêchement stérique) au contrôle de la charge globale des histones (donc des interactions électrostatiques entre les différents composants de la chromatine), de l'exclusion de certains complexes par condensation de la chromatine aux contraintes topologiques et mécaniques de l'ADN qui régulent l'affinité des facteurs protéiques associés ou encore l'effacement partiel du code par désassemblage des nucléosomes ou incorporation de variants, les différentes nappes qui interviennent dans la régulation de l'accessibilité du message génétique aux machineries cellulaires d'expression génique sont autant de niveaux de complexité de ce code de la chromatine. Celui-ci, on le voit, va bien au delà d'un simple code basé sur des corrélations simples « OFF:H3K9me / H3K9ac:ON ».

Ce code de la chromatine implique des rétrocontrôles intégrés entre les différents niveaux de régulation et à différentes échelles : affinité d'un facteur de transcription pour un acide aminé modifié ou non, contrôle de la charge et de la stabilité du nucléosome et de son interaction avec l'ADN, régulation du niveau de condensation du faisceau de nucléosomes de la fibre de 11 ou 30 nm aux superstructures des chromosomes mitotiques. Les modes mêmes de lecture de ce code s'influencent mutuellement selon un modèle intégratif : mode mécanique (affinité biochimique, remodelage chromatinien), mode cinétique (réversibilité des modifications par le jeu de fonctions antagonistes), mode topologique (modulation de l'affinité de fixation à l'ADN, transitions allostériques de la chromatine) ne peuvent être dissociés les uns des autres.

Si ce nouveau paradigme a révolutionné notre compréhension des mécanismes d'expression génique et donné les bases moléculaires de l'information épigénétique soulevant le couvercle de la boîte noire du développement et de la différenciation cellulaire, il est loin d'avoir livré tous ses secrets. Sa compréhension est d'une importance majeure, de nouvelles thérapies viendront s'appuyer sur cette connaissance du code pour permettre, entre autres applications, de reprogrammer les cellules transformées, des travaux dans cette direction ayant déjà donné des résultats significatifs ([Coombes, Briggs et al. 2003](#);

Garcia, Busby et al. 2005; Schafer and Jung 2005; Minucci and Pelicci 2006) voire de déprogrammer des cellules afin de restaurer leur pluripotence dans le cadre de thérapies cellulaires basées sur l'utilisation de cellules souches.

Pour cela il faudra accroître notre savoir sur les processus épigénétiques à la base de la mémoire cellulaire (Turner 2002; Margueron, Trojer et al. 2005) ainsi que les dérégulations du code intervenant dans l'étiologie des cancers (Toyota and Issa 2005; Feinberg, Ohlsson et al. 2006). Ce type de défi nécessite la mise au point de nouveaux outils d'étude, de nouvelles stratégies. Ce besoin répond à une double nécessité, celle d'améliorer notre compréhension fondamentale des mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression génique qui lui même répond à l'exigence de trouver de nouvelles stratégies pour lutter contre les diverses pathologies humaines face au déficit thérapeutique actuel. Dans le cas du cancer, il s'agit avant tout de pallier aux effets toxiques, oncogènes des chimiothérapies basées sur les poisons de la topoïsomérase II. Concernant les divers parasites aux génomes A•T riches ciblés par les diamidines, il est essentiel de développer de nouvelles molécules afin d'enrayer ces fléaux que sont la malaria, la maladie du sommeil, les leishmanioses qui s'ajoutent dans les pays sous-développés aux ravages causés par le SIDA et par les maladies opportunistes associées comme la pneumonie à PCP causée par *Pneumocystis carinii*, une autre cible potentielle des diamidines.

Nous espérons que les premiers résultats obtenus dans l'équipe pour la validation de l'utilisation du modèle de drosophile pour la compréhension du mécanisme d'action des diamidines seront poursuivis et développés dans un effort collaboratif, l'enjeu de la mise sur le marché de nouveaux antipaludiques efficaces, faciles à synthétiser et donc potentiellement bons marchés étant crucial pour les régions les plus touchées par cette maladie responsable de plus de 2 millions de morts par an rien que pour le continent africain.

Références bibliographiques

- Adachi, Y., E. Kas, et al. (1989). "Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions." *Embo J* **8**(13): 3997-4006.
- Adachi, Y., M. Luke, et al. (1991). "Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation." *Cell* **64**(1): 137-48.
- Agalioti, T., G. Chen, et al. (2002). "Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene." *Cell* **111**(3): 381-92.
- Ahmad, K. and S. Henikoff (2002). "The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly." *Mol Cell* **9**(6): 1191-200.
- Ajiro, K. (2000). "Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells. An association with DNA fragmentation." *J Biol Chem* **275**(1): 439-43.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner, et al. (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.
- Amirand, C., A. Viari, et al. (1998). "Three distinct sub-nuclear populations of HMG-I protein of different properties revealed by co-localization image analysis." *J Cell Sci* **111** (Pt 23): 3551-61.
- Andersen, M. K., D. H. Christiansen, et al. (2001). "Therapy-related acute lymphoblastic leukaemia with MLL rearrangements following DNA topoisomerase II inhibitors, an increasing problem: report on two new cases and review of the literature since 1992." *Br J Haematol* **114**(3): 539-43.
- Aravin, A. A., M. Lagos-Quintana, et al. (2003). "The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development." *Dev Cell* **5**(2): 337-50.
- Aravind, L. and D. Landsman (1998). "AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins." *Nucleic Acids Res* **26**(19): 4413-21.
- Aravind, L., D. D. Leipe, et al. (1998). "Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins." *Nucleic Acids Res* **26**(18): 4205-13.
- Arents, G. and E. N. Moudrianakis (1995). "The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11170-4.
- Arndt, H. D., K. E. Hauschild, et al. (2003). "Toward artificial developmental regulators." *J Am Chem Soc* **125**(44): 13322-3.
- Aulner, N., C. Monod, et al. (2002). "The AT-hook protein D1 is essential for *Drosophila melanogaster* development and is implicated in position-effect variegation." *Mol Cell Biol* **22**(4): 1218-32.
- Austin, C. A., J. H. Sng, et al. (1993). "Novel HeLa topoisomerase II is the II beta isoform: complete coding sequence and homology with other type II topoisomerases." *Biochim Biophys Acta* **1172**(3): 283-91.
- Avner, P. and E. Heard (2001). "X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation." *Nat Rev Genet* **2**(1): 59-67.
- Baguley, B. C. and L. R. Ferguson (1998). "Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs." *Biochim Biophys Acta* **1400**(1-3): 213-22.

- Bailly, C., L. Dassonneville, et al. (1999). "Relationships between topoisomerase II inhibition, sequence-specificity and DNA binding mode of dicationic diphenylfuran derivatives." Anticancer Drug Des **14**(1): 47-60.
- Bailly, C., C. Tardy, et al. (2001). "Recognition of ATGA sequences by the unfused aromatic dication DB293 forming stacked dimers in the DNA minor groove." Biochemistry **40**(33): 9770-9.
- Baldwin, E. L. and N. Osheroff (2005). "Etoposide, topoisomerase II and cancer." Curr Med Chem Anticancer Agents **5**(4): 363-72.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (1996). "The CBP co-activator is a histone acetyltransferase." Nature **384**(6610): 641-3.
- Bannister, A. J., R. Schneider, et al. (2002). "Histone methylation: dynamic or static?" Cell **109**(7): 801-6.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, et al. (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." Nature **410**(6824): 120-4.
- Baraldi, P. G., C. Nunez Mdel, et al. (2004). "Distamycin A as stem of DNA minor groove alkylating agents." Curr Top Med Chem **4**(2): 231-9.
- Barber, C. M., F. B. Turner, et al. (2004). "The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved." Chromosoma **112**(7): 360-71.
- Baron, U. and H. Bujard (2000). "Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances." Methods Enzymol **327**: 401-21.
- Basselin, M., M. A. Badet-Denisot, et al. (1998). "Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant Leishmania." Acta Trop **70**(1): 43-61.
- Beaujean, N., C. Bouniol-Baly, et al. (2000). "Induction of early transcription in one-cell mouse embryos by microinjection of the nonhistone chromosomal protein HMG-I." Dev Biol **221**(2): 337-54.
- Becker, P. B. (1994). "The establishment of active promoters in chromatin." Bioessays **16**(8): 541-7.
- Becker, P. B. and W. Horz (2002). "ATP-dependent nucleosome remodeling." Annu Rev Biochem **71**: 247-73.
- Bednar, J., R. A. Horowitz, et al. (1998). "Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14173-8.
- Belitsky, J. M., D. H. Nguyen, et al. (2002). "Solid-phase synthesis of DNA binding polyamides on oxime resin." Bioorg Med Chem **10**(8): 2767-74.
- Bell, A., L. Kittler, et al. (1996). "Influence of minor groove binders on the eukaryotic topoisomerase II cleavage reaction with 41 base pair model oligonucleotides." Invest New Drugs **13**(4): 271-84.
- Bell, A., L. Kittler, et al. (1997). "DNA binding properties of minor groove binders and their influence on the topoisomerase II cleavage reaction." J Mol Recognit **10**(6): 245-55.
- Bello, B., D. Resendez-Perez, et al. (1998). "Spatial and temporal targeting of gene expression in Drosophila by means of a tetracycline-dependent transactivator system." Development **125**(12): 2193-202.
- Blattes R., C. Monod, Susbielle G et al. (2006). "Displacement of D1, HP1 and topoisomerase II from satellite heterochromatin by a specific polyamide." EMBO J. **25**(11) : 2397-2408.

- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.
- Bird, A. W., D. Y. Yu, et al. (2002). "Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair." Nature **419**(6905): 411-5.
- Blanco, J. G., T. Dervieux, et al. (2001). "Molecular emergence of acute myeloid leukemia during treatment for acute lymphoblastic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10338-43.
- Blander, G. and L. Guarente (2004). "The Sir2 family of protein deacetylases." Annu Rev Biochem **73**: 417-35.
- Borgnetto, M. E., F. Zunino, et al. (1996). "Drug-specific sites of topoisomerase II DNA cleavage in Drosophila chromatin: heterogeneous localization and reversibility." Cancer Res **56**(8): 1855-62.
- Bottomley, M. J. (2004). "Structures of protein domains that create or recognize histone modifications." EMBO Rep **5**(5): 464-9.
- Boudreault, A. A., D. Cronier, et al. (2003). "Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin." Genes Dev **17**(11): 1415-28.
- Bremer, R. E., J. W. Szewczyk, et al. (2000). "Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides: comparison of desmethyl- and N-methylpyrrole." Bioorg Med Chem **8**(8): 1947-55.
- Brockdorff, N. (2002). "X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind Xist RNA." Trends Genet **18**(7): 352-8.
- Brownell, J. E. and C. D. Allis (1996). "Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation." Curr Opin Genet Dev **6**(2): 176-84.
- Burd, J. F., R. M. Wartell, et al. (1975). "Transmission of stability (telestability) in deoxyribonucleic acid. Physical and enzymatic studies on the duplex block polymer d(C15A15) - d(T15G15)." J Biol Chem **250**(13): 5109-13.
- Burke, T. W., J. G. Cook, et al. (2001). "Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1." J Biol Chem **276**(18): 15397-408.
- Burri, C., A. L. Bodley, et al. (1996). "Topoisomerases in kinetoplastids." Parasitol Today **12**(6): 226-31.
- Burzio, L. O., P. T. Riquelme, et al. (1979). "ADP ribosylation of rat liver nucleosomal core histones." J Biol Chem **254**(8): 3029-37.
- Byvoet, P. (1972). "In vivo turnover and distribution of radio-N-methyl in arginine-rich histones from rat tissues." Arch Biochem Biophys **152**(2): 887-8.
- Byvoet, P., G. R. Shepherd, et al. (1972). "The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells." Arch Biochem Biophys **148**(2): 558-67.
- Camporeale, G., E. E. Shubert, et al. (2004). "K8 and K12 are biotinylated in human histone H4." Eur J Biochem **271**(11): 2257-63.
- Candau, R., P. A. Moore, et al. (1996). "Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5." Mol Cell Biol **16**(2): 593-602.
- Cao, R., L. Wang, et al. (2002). "Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing." Science **298**(5595): 1039-43.
- Cardenas, M. E. and S. M. Gasser (1993). "Regulation of topoisomerase II by phosphorylation: a role for casein kinase II." J Cell Sci **104** (Pt 2): 219-25.

- 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**(2): 375-84.
- Champoux, J. J. and R. Dulbecco (1972). "An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay)." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(1): 143-6.
- Chan, H. M. and N. B. La Thangue (2001). "p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds." J Cell Sci **114**(Pt 13): 2363-73.
- Chang, C. H. and D. S. Luse (1997). "The H3/H4 tetramer blocks transcript elongation by RNA polymerase II in vitro." J Biol Chem **272**(37): 23427-34.
- Chang, C. J., S. Goulding, et al. (2003). "RNAi analysis reveals an unexpected role for topoisomerase II in chromosome arm congression to a metaphase plate." J Cell Sci **116**(Pt 23): 4715-26.
- Charvin, G., D. Bensimon, et al. (2003). "Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9820-5.
- Charvin, G., T. R. Strick, et al. (2005). "Topoisomerase IV bends and overtwists DNA upon binding." Biophys J **89**(1): 384-92.
- Charvin, G., T. R. Strick, et al. (2005). "Tracking topoisomerase activity at the single-molecule level." Annu Rev Biophys Biomol Struct **34**: 201-19.
- Chen, G. L., L. Yang, et al. (1984). "Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II." J Biol Chem **259**(21): 13560-6.
- Cheung, P., K. G. Tanner, et al. (2000). "Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation." Mol Cell **5**(6): 905-15.
- Chew, Y. C., G. Camporeale, et al. (2005). "Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase." J Nutr Biochem.
- Chopra, V. S. and R. K. Mishra (2005). "To SIR with Polycomb: linking silencing mechanisms." Bioessays **27**(2): 119-21.
- Chow, J. C., Z. Yen, et al. (2005). "Silencing of the Mammalian X Chromosome." Annu Rev Genomics Hum Genet.
- Clarke, A. S., J. E. Lowell, et al. (1999). "Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression." Mol Cell Biol **19**(4): 2515-26.
- Cleard, F., M. Delattre, et al. (1997). "SU(VAR)3-7, a Drosophila heterochromatin-associated protein and companion of HP1 in the genomic silencing of position-effect variegation." Embo J **16**(17): 5280-8.
- Cleard, F. and P. Spierer (2001). "Position-effect variegation in Drosophila: the modifier Su(var)3-7 is a modular DNA-binding protein." EMBO Rep **2**(12): 1095-100.
- Clements, A. and R. Marmorstein (2003). "Insights into structure and function of GCN5/PCAF and yEsa 1 histone acetyltransferase domains." Methods Enzymol **371**: 545-64.
- Cline, S. D., W. R. Jones, et al. (1999). "DNA abasic lesions in a different light: solution structure of an endogenous topoisomerase II poison." Biochemistry **38**(47): 15500-7.

- Cline, S. D. and N. Osheroff (1999). "Cytosine arabinoside lesions are position-specific topoisomerase II poisons and stimulate DNA cleavage mediated by the human type II enzymes." *J Biol Chem* **274**(42): 29740-3.
- Coombes, M. M., K. L. Briggs, et al. (2003). "Resetting the histone code at CDKN2A in HNSCC by inhibition of DNA methylation." *Oncogene* **22**(55): 8902-11.
- Corbett, K. D. and J. M. Berger (2004). "Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**: 95-118.
- Cortes, F., N. Pastor, et al. (2003). "Roles of DNA topoisomerases in chromosome segregation and mitosis." *Mutat Res* **543**(1): 59-66.
- Costanzi, C. and J. R. Pehrson (1998). "Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals." *Nature* **393**(6685): 599-601.
- Crisona, N. J., T. R. Strick, et al. (2000). "Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by E. coli topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements." *Genes Dev* **14**(22): 2881-92.
- Crothers, D. M., T. E. Haran, et al. (1990). "Intrinsically bent DNA." *J Biol Chem* **265**(13): 7093-6.
- Cryderman, D. E., S. K. Grade, et al. (2005). "Role of Drosophila HP1 in euchromatic gene expression." *Dev Dyn* **232**(3): 767-74.
- Cui, Y. and C. Bustamante (2000). "Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1): 127-32.
- Cuthbert, G. L., S. Daujat, et al. (2004). "Histone deimination antagonizes arginine methylation." *Cell* **118**(5): 545-53.
- Cuvier, O., C. M. Hart, et al. (2002). "Identification of a multicopy chromatin boundary element at the borders of silenced chromosomal domains." *Chromosoma* **110**(8): 519-31.
- Cuvier, O., C. M. Hart, et al. (1998). "Identification of a class of chromatin boundary elements." *Mol Cell Biol* **18**(12): 7478-86.
- Cuvier, O. and T. Hirano (2003). "A role of topoisomerase II in linking DNA replication to chromosome condensation." *J Cell Biol* **160**(5): 645-55.
- Czermin, B., R. Melfi, et al. (2002). "Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites." *Cell* **111**(2): 185-96.
- Czermin, B., G. Schotta, et al. (2001). "Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila." *EMBO Rep* **2**(10): 915-9.
- Dai, J. and J. M. Higgins (2005). "Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment." *Cell Cycle* **4**(5): 665-8.
- Daniel, J. A., M. G. Pray-Grant, et al. (2005). "Effector proteins for methylated histones: an expanding family." *Cell Cycle* **4**(7): 919-26.
- Das, A., A. Dasgupta, et al. (2004). "Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets." *Trends Parasitol* **20**(8): 381-7.
- Das, A., A. Dasgupta, et al. (2001). "Characterisation of the gene encoding type II DNA topoisomerase from Leishmania donovani: a key molecular target in antileishmanial therapy." *Nucleic Acids Res* **29**(9): 1844-51.
- Daujat, S., U. Zeissler, et al. (2005). "HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding." *J Biol Chem* **280**(45): 38090-5.
- Daury, L., C. Chailleux, et al. (2006). "Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription." *EMBO Rep* **7**(1): 66-71.

- Davey, C. A., D. F. Sargent, et al. (2002). "Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution." J Mol Biol **319**(5): 1097-113.
- de la Cruz, X., S. Lois, et al. (2005). "Do protein motifs read the histone code?" Bioessays **27**(2): 164-75.
- Degrassi, F., M. Fiore, et al. (2004). "Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs." Curr Med Chem Anticancer Agents **4**(4): 317-25.
- Denman, R. B. (2005). "PAD: the smoking gun behind arginine methylation signaling?" Bioessays **27**(3): 242-6.
- Dervan, P. B., R. M. Doss, et al. (2005). "Programmable DNA binding oligomers for control of transcription." Curr Med Chem Anticancer Agents **5**(4): 373-87.
- Dervan, P. B. and B. S. Edelson (2003). "Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides." Curr Opin Struct Biol **13**(3): 284-99.
- Deuring, R., L. Fanti, et al. (2000). "The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo." Mol Cell **5**(2): 355-65.
- Devlin, R. H., B. Bingham, et al. (1990). "The organization and expression of the light gene, a heterochromatic gene of *Drosophila melanogaster*." Genetics **125**(1): 129-40.
- Devlin, R. H., D. G. Holm, et al. (1990). "Identifying a single-copy DNA sequence associated with the expression of a heterochromatic gene, the light locus of *Drosophila melanogaster*." Genome **33**(3): 405-15.
- Dhalluin, C., J. E. Carlson, et al. (1999). "Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain." Nature **399**(6735): 491-6.
- Dhillon, N. and R. T. Kamakaka (2000). "A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR." Mol Cell **6**(4): 769-80.
- DiNardo, S., K. Voelkel, et al. (1984). "DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(9): 2616-20.
- Dobson, C. L., A. J. Warren, et al. (2000). "Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene Mll and the bacterial lacZ gene." Embo J **19**(5): 843-51.
- Dorer, D. R. and S. Henikoff (1994). "Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*." Cell **77**(7): 993-1002.
- Dorer, D. R. and S. Henikoff (1997). "Transgene repeat arrays interact with distant heterochromatin and cause silencing in cis and trans." Genetics **147**(3): 1181-90.
- Dorigo, B., T. Schalch, et al. (2003). "Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail." J Mol Biol **327**(1): 85-96.
- Dorigo, B., T. Schalch, et al. (2004). "Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber." Science **306**(5701): 1571-3.
- Dover, J., J. Schneider, et al. (2002). "Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6." J Biol Chem **277**(32): 28368-71.
- Downes, C. S., A. M. Mullinger, et al. (1991). "Inhibitors of DNA topoisomerase II prevent chromatid separation in mammalian cells but do not prevent exit from mitosis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 8895-9.
- Downs, J. A., N. F. Lowndes, et al. (2000). "A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair." Nature **408**(6815): 1001-4.
- Drake, F. H., G. A. Hofmann, et al. (1989). "Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II." Biochemistry **28**(20): 8154-60.

- Drake, F. H., J. P. Zimmerman, et al. (1987). "Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme." J Biol Chem **262**(34): 16739-47.
- Dudouet, B., R. Burnett, et al. (2003). "Accessibility of nuclear chromatin by DNA binding polyamides." Chem Biol **10**(9): 859-67.
- Duerre, J. A. and C. T. Lee (1974). "In vivo methylation and turnover of rat brain histones." J Neurochem **23**(3): 541-7.
- Dutta, R. and M. Inouye (2000). "GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily." Trends Biochem Sci **25**(1): 24-8.
- Eberl, D. F., B. J. Duyf, et al. (1993). "The role of heterochromatin in the expression of a heterochromatic gene, the rolled locus of *Drosophila melanogaster*." Genetics **134**(1): 277-92.
- Eisenberg, J. C. and S. C. Elgin (2005). "Molecular biology: antagonizing the neighbours." Nature **438**(7071): 1090-1.
- Elsa, S. H., M. Westergaard, et al. (1997). "Quinolones share a common interaction domain on topoisomerase II with other DNA cleavage-enhancing antineoplastic drugs." Biochemistry **36**(10): 2919-24.
- Enomoto, R., H. Tatsuoka, et al. (2004). "Involvement of histone phosphorylation in apoptosis of human astrocytes after exposure to saline solution." Neurochem Int **44**(6): 459-67.
- Fan, Z., H. Zhang, et al. (2005). "Tumor suppressor p32 represses cell growth through inhibition of transcription by blocking acetylation and phosphorylation of histone H3 and initiating its proapoptotic activity." Cell Death Differ.
- Fass, E., S. Shahar, et al. (2002). "Phosphorylation of histone h3 at serine 10 cannot account directly for the detachment of human heterochromatin protein 1gamma from mitotic chromosomes in plant cells." J Biol Chem **277**(34): 30921-7.
- Fattori, D., O. Kinzel, et al. (2002). "A practical approach to the synthesis of hairpin polyamide-peptide conjugates through the use of a safety-catch linker." Bioorg Med Chem Lett **12**(8): 1143-7.
- Fedier, A., V. A. Schwarz, et al. (2001). "Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair." Int J Cancer **93**(4): 571-6.
- Feinberg, A. P., R. Ohlsson, et al. (2006). "The epigenetic progenitor origin of human cancer." Nat Rev Genet **7**(1): 21-33.
- Feldhoff, P. W., S. E. Mirski, et al. (1994). "Altered subcellular distribution of topoisomerase II alpha in a drug-resistant human small cell lung cancer cell line." Cancer Res **54**(3): 756-62.
- Fernandez-Capetillo, O., C. D. Allis, et al. (2004). "Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks." J Exp Med **199**(12): 1671-7.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, et al. (2004). "H2AX: the histone guardian of the genome." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 959-67.
- Fesen, M. and Y. Pommier (1989). "Mammalian topoisomerase II activity is modulated by the DNA minor groove binder distamycin in simian virus 40 DNA." J Biol Chem **264**(19): 11354-9.
- Finch, J. T. and A. Klug (1976). "Solenoidal model for superstructure in chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(6): 1897-901.
- Fischle, W., B. S. Tseng, et al. (2005). "Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation." Nature **438**(7071): 1116-22.
- Fischle, W., Y. Wang, et al. (2003). "Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond." Nature **425**(6957): 475-9.

- Fischle, W., Y. Wang, et al. (2003). "Histone and chromatin cross-talk." Curr Opin Cell Biol **15**(2): 172-83.
- Fischle, W., Y. Wang, et al. (2003). "Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains." Genes Dev **17**(15): 1870-81.
- Fitzgerald, D. J. and J. N. Anderson (1999). "DNA distortion as a factor in nucleosome positioning." J Mol Biol **293**(3): 477-91.
- Flanagan, J. F., L. Z. Mi, et al. (2005). "Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail." Nature **438**(7071): 1181-5.
- Forneris, F., C. Binda, et al. (2005). "Human histone demethylase LSD1 reads the histone code." J Biol Chem **280**(50): 41360-5.
- Forneris, F., C. Binda, et al. (2005). "Histone demethylation catalysed by LSD1 is a flavin-dependent oxidative process." FEBS Lett **579**(10): 2203-7.
- Fortune, J. M. and N. Osheroff (1998). "Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by blocking DNA cleavage." J Biol Chem **273**(28): 17643-50.
- Fry, C. J. and C. L. Peterson (2002). "Transcription. Unlocking the gates to gene expression." Science **295**(5561): 1847-8.
- Fukagawa, T., M. Nogami, et al. (2004). "Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells." Nat Cell Biol **6**(8): 784-91.
- Game, J. C., M. S. Williamson, et al. (2005). "X-ray survival characteristics and genetic analysis for nine *Saccharomyces* deletion mutants that show altered radiation sensitivity." Genetics **169**(1): 51-63.
- Garcia, B. A., S. A. Busby, et al. (2005). "Resetting the epigenetic histone code in the MRL-lpr/lpr mouse model of lupus by histone deacetylase inhibition." J Proteome Res **4**(6): 2032-42.
- Gaubatz, J. W. and R. G. Cutler (1990). "Mouse satellite DNA is transcribed in senescent cardiac muscle." J Biol Chem **265**(29): 17753-8.
- Gellert, M., M. H. O'Dea, et al. (1976). "Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(12): 4474-8.
- Georgakopoulos, T. and G. Thireos (1992). "Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription." Embo J **11**(11): 4145-52.
- Ghosh, M. K. and M. L. Harter (2003). "A viral mechanism for remodeling chromatin structure in G0 cells." Mol Cell **12**(1): 255-60.
- Gill, G. (2004). "SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?" Genes Dev **18**(17): 2046-59.
- Ginsburg, H., E. Nissani, et al. (1993). "Selective toxicity to malaria parasites by non-intercalating DNA-binding ligands." Mol Biochem Parasitol **58**(1): 7-15.
- Girard, F., B. Bello, et al. (1998). "In vivo analysis of scaffold-associated regions in *Drosophila*: a synthetic high-affinity SAR binding protein suppresses position effect variegation." Embo J **17**(7): 2079-85.
- Golderer, G. and P. Grobner (1991). "ADP-ribosylation of core histones and their acetylated subspecies." Biochem J **277** (Pt 3): 607-10.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-51.
- Goto, H., Y. Tomono, et al. (1999). "Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation." J Biol Chem **274**(36): 25543-9.

- Goto, T. and J. C. Wang (1984). "Yeast DNA topoisomerase II is encoded by a single-copy, essential gene." *Cell* **36**(4): 1073-80.
- Grant, P. A., L. Duggan, 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**(13): 1640-50.
- Grewal, S. I. and S. C. Elgin (2002). "Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure." *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 178-87.
- Grewal, S. I. and D. Moazed (2003). "Heterochromatin and epigenetic control of gene expression." *Science* **301**(5634): 798-802.
- Guo, X. W., J. P. Th'ng, et al. (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**(5): 976-85.
- Gurley, L. R., J. A. D'Anna, et al. (1978). "Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells." *Eur J Biochem* **84**(1): 1-15.
- Gyory, I. and J. Minarovits (2005). "Epigenetic regulation of lymphoid specific gene sets." *Biochem Cell Biol* **83**(3): 286-95.
- Hande, K. R. (1998). "Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor." *Eur J Cancer* **34**(10): 1514-21.
- Hart, C. M., O. Cuvier, et al. (1999). "Evidence for an antagonistic relationship between the boundary element-associated factor BEAF and the transcription factor DREF." *Chromosoma* **108**(6): 375-83.
- Hart, C. M. and U. K. Laemmli (1998). "Facilitation of chromatin dynamics by SARs." *Curr Opin Genet Dev* **8**(5): 519-25.
- Harte, P. J., W. Wu, et al. (1999). "Assignment of a novel bifurcated SET domain gene, SETDB1, to human chromosome band 1q21 by in situ hybridization and radiation hybrids." *Cytogenet Cell Genet* **84**(1-2): 83-6.
- Hartsuiker, E., J. Bahler, et al. (1998). "The role of topoisomerase II in meiotic chromosome condensation and segregation in *Schizosaccharomyces pombe*." *Mol Biol Cell* **9**(10): 2739-50.
- Hassa, P. O. and M. O. Hottiger (2005). "An epigenetic code for DNA damage repair pathways?" *Biochem Cell Biol* **83**(3): 270-85.
- Hearn, M. G., A. Hedrick, et al. (1991). "The effect of modifiers of position-effect variegation on the variegation of heterochromatic genes of *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **128**(4): 785-97.
- Hebbes, T. R., A. W. Thorne, et al. (1988). "A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin." *Embo J* **7**(5): 1395-402.
- Hediger, F. and S. M. Gasser (2006). "Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover!" *Curr Opin Genet Dev*.
- Hellauer, K., E. Sirard, et al. (2001). "Decreased expression of specific genes in yeast cells lacking histone H1." *J Biol Chem* **276**(17): 13587-92.
- Hendzel, M. J., Y. Wei, et al. (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**(6): 348-60.
- Henikoff, S. (1990). "Position-effect variegation after 60 years." *Trends Genet* **6**(12): 422-6.
- Henikoff, S., T. Furuyama, et al. (2004). "Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance." *Trends Genet* **20**(7): 320-6.

- Hettmann, C. and D. Soldati (1999). "Cloning and analysis of a *Toxoplasma gondii* histone acetyltransferase: a novel chromatin remodelling factor in Apicomplexan parasites." Nucleic Acids Res **27**(22): 4344-52.
- Hibino, Y., K. Nakamura, et al. (1993). "Purification and characterization of nuclear scaffold proteins which bind to a highly repetitive bent DNA from rat liver." Biochim Biophys Acta **1174**(2): 162-70.
- Hirota, T., J. J. Lipp, et al. (2005). "Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin." Nature **438**(7071): 1176-80.
- Horn, P. J., K. A. Crowley, et al. (2002). "The SIN domain of the histone octamer is essential for intramolecular folding of nucleosomal arrays." Nat Struct Biol **9**(3): 167-71.
- Howman, E. V., K. J. Fowler, et al. (2000). "Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1148-53.
- Hsu, J. Y., Z. W. Sun, et al. (2000). "Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes." Cell **102**(3): 279-91.
- Huang, S., M. Litt, et al. (2005). "Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications." Genes Dev **19**(16): 1885-93.
- Huisinga, K. L., B. Brower-Toland, et al. (2006). "The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing." Chromosoma.
- Huyen, Y., O. Zgheib, et al. (2004). "Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks." Nature **432**(7015): 406-11.
- Hwang, K. K., J. C. Eissenberg, et al. (2001). "Transcriptional repression of euchromatic genes by *Drosophila* heterochromatin protein 1 and histone modifiers." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11423-7.
- Hwang, W. W., S. Venkatasubrahmanyam, et al. (2003). "A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control." Mol Cell **11**(1): 261-6.
- Ito, T., J. K. Tyler, et al. (1997). "Chromatin assembly factors: a dual function in nucleosome formation and mobilization?" Genes Cells **2**(10): 593-600.
- Jacobs, S. A. and S. Khorasanizadeh (2002). "Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail." Science **295**(5562): 2080-3.
- Janicki, S. M., T. Tsukamoto, et al. (2004). "From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells." Cell **116**(5): 683-98.
- Janssen, S., O. Cuvier, et al. (2000). "Specific gain- and loss-of-function phenotypes induced by satellite-specific DNA-binding drugs fed to *Drosophila melanogaster*." Mol Cell **6**(5): 1013-24.
- Janssen, S., T. Durussel, et al. (2000). "Chromatin opening of DNA satellites by targeted sequence-specific drugs." Mol Cell **6**(5): 999-1011.
- Jaquet, Y., M. Delattre, et al. (2002). "Functional dissection of the *Drosophila* modifier of variegation Su(var)3-7." Development **129**(17): 3975-82.
- Jason, L. J., S. C. Moore, et al. (2002). "Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds?" Bioessays **24**(2): 166-74.
- Jensen, P. B., B. S. Sorensen, et al. (1990). "Antagonistic effect of aclarubicin on the cytotoxicity of etoposide and 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide in human small cell lung cancer cell lines and on topoisomerase II-mediated DNA cleavage." Cancer Res **50**(11): 3311-6.

- Jensen, S., A. H. Andersen, et al. (1996). "Analysis of functional domain organization in DNA topoisomerase II from humans and *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **16**(7): 3866-77.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." *Science* **293**(5532): 1074-80.
- Johnson, C. N., N. L. Adkins, et al. (2005). "Chromatin remodeling complexes: ATP-dependent machines in action." *Biochem Cell Biol* **83**(4): 405-17.
- Jones, D. O., I. G. Cowell, et al. (2000). "Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression." *Bioessays* **22**(2): 124-37.
- Jump, D. B., T. R. Butt, et al. (1979). "Nuclear protein modification and chromatin substructure. 3. Relationship between poly(adenosine diphosphate) ribosylation and different functional forms of chromatin." *Biochemistry* **18**(6): 983-90.
- Kaller, M., U. Euteneuer, et al. (2006). "Differential effects of heterochromatin protein 1 isoforms on mitotic chromosome distribution and growth in *Dictyostelium discoideum*." *Eukaryot Cell* **5**(3): 530-43.
- Kallio, M. and J. Lahdetie (1996). "Fragmentation of centromeric DNA and prevention of homologous chromosome separation in male mouse meiosis in vivo by the topoisomerase II inhibitor etoposide." *Mutagenesis* **11**(5): 435-43.
- Kamakaka, R. T. and S. Biggins (2005). "Histone variants: deviants?" *Genes Dev* **19**(3): 295-310.
- Kas, E., E. Izaurralde, et al. (1989). "Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H1 by distamycin. The role of oligo(dA).oligo(dT) tracts." *J Mol Biol* **210**(3): 587-99.
- Kas, E. and U. K. Laemmli (1992). "In vivo topoisomerase II cleavage of the *Drosophila* histone and satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics." *Embo J* **11**(2): 705-16.
- Kasten, M., H. Szerlong, et al. (2004). "Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14." *Embo J* **23**(6): 1348-59.
- Katritch, V., C. Bustamante, et al. (2000). "Pulling chromatin fibers: computer simulations of direct physical micromanipulations." *J Mol Biol* **295**(1): 29-40.
- Kehle, J., D. Beuchle, et al. (1998). "dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression." *Science* **282**(5395): 1897-900.
- Kellner, U., M. Sehested, et al. (2002). "Culprit and victim -- DNA topoisomerase II." *Lancet Oncol* **3**(4): 235-43.
- Kellum, R. (2003). "HP1 complexes and heterochromatin assembly." *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 53-77.
- Khochbin, S. and H. Y. Kao (2001). "Histone deacetylase complexes: functional entities or molecular reservoirs." *FEBS Lett* **494**(3): 141-4.
- Kielkopf, C. L., E. E. Baird, et al. (1998). "Structural basis for G.C recognition in the DNA minor groove." *Nat Struct Biol* **5**(2): 104-9.
- Kielkopf, C. L., R. E. Bremer, et al. (2000). "Structural effects of DNA sequence on T.A recognition by hydroxypyrrrole/pyrrole pairs in the minor groove." *J Mol Biol* **295**(3): 557-67.
- Kielkopf, C. L., S. White, et al. (1998). "A structural basis for recognition of A.T and T.A base pairs in the minor groove of B-DNA." *Science* **282**(5386): 111-5.
- Kim, J., J. Daniel, et al. (2006). "Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation." *EMBO Rep*.
- Kim, S., L. Benoiton, et al. (1964). "Epsilon-Alkyllysine. Purification And Properties Of The Enzyme." *J Biol Chem* **239**: 3790-6.

- Kingma, P. S., A. H. Corbett, et al. (1995). "Abasic sites stimulate double-stranded DNA cleavage mediated by topoisomerase II. DNA lesions as endogenous topoisomerase II poisons." *J Biol Chem* **270**(37): 21441-4.
- Kingma, P. S., C. A. Greider, et al. (1997). "Spontaneous DNA lesions poison human topoisomerase II α and stimulate cleavage proximal to leukemic 11q23 chromosomal breakpoints." *Biochemistry* **36**(20): 5934-9.
- Kingma, P. S. and N. Osheroff (1997). "Apurinic sites are position-specific topoisomerase II poisons." *J Biol Chem* **272**(2): 1148-55.
- Kingma, P. S. and N. Osheroff (1997). "Spontaneous DNA damage stimulates topoisomerase II-mediated DNA cleavage." *J Biol Chem* **272**(11): 7488-93.
- Kobza, K., G. Camporeale, et al. (2005). "K4, K9 and K18 in human histone H3 are targets for biotinylation by biotinidase." *Febs J* **272**(16): 4249-59.
- Kohwi-Shigematsu, T. and Y. Kohwi (1985). "Poly(dG)-poly(dC) sequences, under torsional stress, induce an altered DNA conformation upon neighboring DNA sequences." *Cell* **43**(1): 199-206.
- Koop, R., L. Di Croce, et al. (2003). "Histone H1 enhances synergistic activation of the MMTV promoter in chromatin." *Embo J* **22**(3): 588-99.
- Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." *Science* **184**(139): 868-71.
- Kornberg, R. D. and J. O. Thomas (1974). "Chromatin structure; oligomers of the histones." *Science* **184**(139): 865-8.
- Kothapalli, N., G. Camporeale, et al. (2005). "Biological functions of biotinylated histones." *J Nutr Biochem* **16**(7): 446-8.
- Kouraklis, G. and S. Theocharis (2006). "Histone deacetylase inhibitors: a novel target of anticancer therapy (review)." *Oncol Rep* **15**(2): 489-94.
- Kourmouli, N., P. Jeppesen, et al. (2004). "Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals." *J Cell Sci* **117**(Pt 12): 2491-501.
- Kourmouli, N., Y. M. Sun, et al. (2005). "Epigenetic regulation of mammalian pericentric heterochromatin in vivo by HP1." *Biochem Biophys Res Commun* **337**(3): 901-7.
- Kouzarides, T. (2002). "Histone methylation in transcriptional control." *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 198-209.
- Krasikova, A., T. Kulikova, et al. (2004). "Centromeric protein bodies on avian lampbrush chromosomes contain a protein detectable with an antibody against DNA topoisomerase II." *Chromosoma* **113**(6): 316-23.
- Kreimeyer, A., K. Wielckens, et al. (1984). "DNA repair-associated ADP-ribosylation in vivo. Modification of histone H1 differs from that of the principal acceptor proteins." *J Biol Chem* **259**(2): 890-6.
- Kudo, K., H. Yoshida, et al. (1998). "Etoposide-related acute promyelocytic leukemia." *Leukemia* **12**(8): 1171-5.
- Kwon, H., A. N. Imbalzano, et al. (1994). "Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex." *Nature* **370**(6489): 477-81.
- Lachner, M. and T. Jenuwein (2002). "The many faces of histone lysine methylation." *Curr Opin Cell Biol* **14**(3): 286-98.
- Lachner, M., D. O'Carroll, et al. (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." *Nature* **410**(6824): 116-20.
- Lachner, M., R. J. O'Sullivan, et al. (2003). "An epigenetic road map for histone lysine methylation." *J Cell Sci* **116**(Pt 11): 2117-24.
- Ladurner, A. G., C. Inouye, et al. (2003). "Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries." *Mol Cell* **11**(2): 365-76.

- Laemmli, U. K., E. Kas, et al. (1992). "Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains." Curr Opin Genet Dev **2**(2): 275-85.
- Lam, A. L., C. D. Boivin, et al. (2006). "Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4186-91.
- Lam, A. L., D. E. Pazin, et al. (2005). "Control of gene expression and assembly of chromosomal subdomains by chromatin regulators with antagonistic functions." Chromosoma **114**(4): 242-51.
- Larsen, A. K., A. E. Escargueil, et al. (2003). "Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy." Pharmacol Ther **99**(2): 167-81.
- Laurent, B. C., M. A. Treitel, et al. (1991). "Functional interdependence of the yeast SNF2, SNF5, and SNF6 proteins in transcriptional activation." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2687-91.
- Lee, D. Y., J. J. Hayes, et al. (1993). "A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA." Cell **72**(1): 73-84.
- Lee, E., A. Nakatsuma, et al. (1999). "Involvement of histone phosphorylation in thymocyte apoptosis by protein phosphatase inhibitors." IUBMB Life **48**(1): 79-83.
- Lee, J. H., J. R. Cook, et al. (2005). "PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine." J Biol Chem **280**(5): 3656-64.
- Leone, G., M. T. Voso, et al. (2001). "Therapy related leukemias: susceptibility, prevention and treatment." Leuk Lymphoma **41**(3-4): 255-76.
- Lesne, A. (2006). "The chromatin regulatory code: Beyond a histone code." Eur Phys J E Soft Matter.
- Levinger, L. and A. Varshavsky (1982). "Protein D1 preferentially binds A + T-rich DNA in vitro and is a component of Drosophila melanogaster nucleosomes containing A + T-rich satellite DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(23): 7152-6.
- Levinger, L. and A. Varshavsky (1982). "Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the Drosophila genome." Cell **28**(2): 375-85.
- Levinger, L. F. (1985). "D1 protein of Drosophila melanogaster. Purification and AT-DNA binding properties." J Biol Chem **260**(26): 14311-8.
- Lin, H. Y., C. S. Chen, et al. (2006). "Targeting histone deacetylase in cancer therapy." Med Res Rev.
- Liu, B., Y. Liu, et al. (2005). "Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA." Trends Parasitol **21**(8): 363-9.
- Liu, Q. and J. C. Wang (1998). "Identification of active site residues in the "GyrA" half of yeast DNA topoisomerase II." J Biol Chem **273**(32): 20252-60.
- Lomberk, G., D. Bensi, et al. (2006). "Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code." Nat Cell Biol.
- Losada, A. and A. Villasante (1996). "Autosomal location of a new subtype of 1.688 satellite DNA of Drosophila melanogaster." Chromosome Res **4**(5): 372-83.
- Loyola, A. and G. Almouzni (2004). "Bromodomains in living cells participate in deciphering the histone code." Trends Cell Biol **14**(6): 279-81.
- Lu, B. Y., C. P. Bishop, et al. (1996). "Developmental timing and tissue specificity of heterochromatin-mediated silencing." Embo J **15**(6): 1323-32.
- Lu, B. Y., P. C. Emtage, et al. (2000). "Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in Drosophila." Genetics **155**(2): 699-708.
- Lu, B. Y., J. Ma, et al. (1998). "Developmental regulation of heterochromatin-mediated gene silencing in Drosophila." Development **125**(12): 2223-34.

- Luger, K., A. W. Mader, et al. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-60.
- Lukes, J., D. L. Guilbride, et al. (2002). "Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure." *Eukaryot Cell* **1**(4): 495-502.
- Ma, H., C. T. Baumann, et al. (2001). "Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter." *Curr Biol* **11**(24): 1981-5.
- Madigan, J. P., H. L. Chotkowski, et al. (2002). "DNA double-strand break-induced phosphorylation of Drosophila histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis." *Nucleic Acids Res* **30**(17): 3698-705.
- Maeshima, K. and U. K. Laemmli (2003). "A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly." *Dev Cell* **4**(4): 467-80.
- Malik, H. S. and S. Henikoff (2003). "Phylogenomics of the nucleosome." *Nat Struct Biol* **10**(11): 882-91.
- Marchion, D. C., E. Bicaku, et al. (2005). "In vivo synergy between topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors: predictive correlates." *Mol Cancer Ther* **4**(12): 1993-2000.
- Margueron, R., P. Trojer, et al. (2005). "The key to development: interpreting the histone code?" *Curr Opin Genet Dev* **15**(2): 163-76.
- Marino-Ramirez, L., M. G. Kann, et al. (2005). "Histone structure and nucleosome stability." *Expert Rev Proteomics* **2**(5): 719-29.
- Marmorstein, R. (2001). "Structure of histone acetyltransferases." *J Mol Biol* **311**(3): 433-44.
- Marmorstein, R. and S. Y. Roth (2001). "Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis." *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 155-61.
- Martincic, D. and K. R. Hande (2005). "Topoisomerase II inhibitors." *Cancer Chemother Biol Response Modif* **22**: 101-21.
- Masumoto, H., M. Nakano, et al. (2004). "The role of CENP-B and alpha-satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres." *Chromosome Res* **12**(6): 543-56.
- Mateescu, B., P. England, et al. (2004). "Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3." *EMBO Rep* **5**(5): 490-6.
- Maxwell, A. (1999). "DNA gyrase as a drug target." *Biochem Soc Trans* **27**(2): 48-53.
- Maxwell, A., L. Costenaro, et al. (2005). "Coupling ATP hydrolysis to DNA strand passage in type IIA DNA topoisomerases." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1460-4.
- McKittrick, E., P. R. Gafken, et al. (2004). "Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(6): 1525-30.
- Melander, C., R. Burnett, et al. (2004). "Regulation of gene expression with pyrrole-imidazole polyamides." *J Biotechnol* **112**(1-2): 195-220.
- Meluh, P. B., P. Yang, et al. (1998). "Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell* **94**(5): 607-13.
- Meneghini, M. D., M. Wu, et al. (2003). "Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin." *Cell* **112**(5): 725-36.
- Mermoud, J. E., C. Costanzi, et al. (1999). "Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation." *J Cell Biol* **147**(7): 1399-408.
- Metivier, R., G. Penot, et al. (2003). "Estrogen receptor-α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter." *Cell* **115**(6): 751-63.

- Metzger, E., M. Wissmann, et al. (2005). "LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription." *Nature* **437**(7057): 436-9.
- Miassod, R., S. V. Razin, et al. (1997). "Distribution of topoisomerase II-mediated cleavage sites and relation to structural and functional landmarks in 830 kb of *Drosophila* DNA." *Nucleic Acids Res* **25**(11): 2041-6.
- Millot, F., F. Brizard, et al. (2005). "Therapy-related acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement following treatment of Burkitt's leukemia." *Leuk Lymphoma* **46**(6): 925-7.
- Min, J., Y. Zhang, et al. (2003). "Structural basis for specific binding of Polycomb chromo-domain to histone H3 methylated at Lys 27." *Genes Dev* **17**(15): 1823-8.
- Minucci, S. and P. G. Pelicci (2006). "Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(1): 38-51.
- Monod, C., N. Aulner, et al. (2002). "Modification of position-effect variegation by competition for binding to *Drosophila* satellites." *EMBO Rep* **3**(8): 747-52.
- Montgomery, M. K. (2004). "RNA interference: historical overview and significance." *Methods Mol Biol* **265**: 3-21.
- Moore, S. C., L. Jason, et al. (2002). "The elusive structural role of ubiquitinated histones." *Biochem Cell Biol* **80**(3): 311-9.
- Morillon, A., N. Karabetsou, et al. (2005). "Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription." *Mol Cell* **18**(6): 723-34.
- Muller, J., S. Gaunt, et al. (1995). "Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies." *Development* **121**(9): 2847-52.
- Nakagawa, H., J. K. Lee, et al. (2002). "Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications." *Genes Dev* **16**(14): 1766-78.
- Narang, M. A., R. Dumas, et al. (2004). "Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase." *Hum Mol Genet* **13**(1): 15-23.
- Ng, D. W., M. B. Chandrasekharan, et al. (2006). "Ordered histone modifications are associated with transcriptional poising and activation of the phaseolin promoter." *Plant Cell* **18**(1): 119-32.
- Nicolas, E., C. Roumillac, et al. (2003). "Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter." *Mol Cell Biol* **23**(5): 1614-22.
- Nielsen, P. R., D. Nietlispach, et al. (2002). "Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9." *Nature* **416**(6876): 103-7.
- Nightingale, K. P., P. O'Neill L, et al. (2006). "Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code." *Curr Opin Genet Dev*.
- Noma, K., T. Sugiyama, et al. (2004). "RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing." *Nat Genet* **36**(11): 1174-80.
- Nowak, S. J. and V. G. Corces (2004). "Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation." *Trends Genet* **20**(4): 214-20.
- Ntambi, J. M., J. C. Marini, et al. (1984). "Presence of a bent helix in fragments of kinetoplast DNA minicircles from several trypanosomatid species." *Mol Biochem Parasitol* **12**(3): 273-86.

- Null, A. P., J. Hudson, et al. (2002). "Both alpha and beta isoforms of mammalian DNA topoisomerase II associate with chromosomes in mitosis." Cell Growth Differ **13**(7): 325-33.
- Ogryzko, V. V., T. Kotani, et al. (1998). "Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex." Cell **94**(1): 35-44.
- Olins, A. L. and D. E. Olins (1974). "Spheroid chromatin units (v bodies)." Science **183**(122): 330-2.
- Orlando, V. (2003). "Polycomb, epigenomes, and control of cell identity." Cell **112**(5): 599-606.
- Osley, M. A. (2004). "H2B ubiquitylation: the end is in sight." Biochim Biophys Acta **1677**(1-3): 74-8.
- Owen, D. J., P. Ornaghi, et al. (2000). "The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p." Embo J **19**(22): 6141-9.
- Paik, W. K. and S. Kim (1973). "Enzymatic demethylation of calf thymus histones." Biochem Biophys Res Commun **51**(3): 781-8.
- Pal-Bhadra, M., B. A. Leibovitch, et al. (2004). "Heterochromatic silencing and HP1 localization in Drosophila are dependent on the RNAi machinery." Science **303**(5658): 669-72.
- 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**(1): 263-7.
- Passarge, E. (1979). "Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago." Am J Hum Genet **31**(2): 106-15.
- 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**(11): 6064-72.
- Peterson, C. L. (1996). "Multiple SWItches to turn on chromatin?" Curr Opin Genet Dev **6**(2): 171-5.
- Peterson, C. L. (2002). "Chromatin remodeling enzymes: taming the machines. Third in review series on chromatin dynamics." EMBO Rep **3**(4): 319-22.
- Peterson, C. L. (2002). "Chromatin remodeling: nucleosomes bulging at the seams." Curr Biol **12**(7): R245-7.
- Peterson, C. L. and M. A. Laniel (2004). "Histones and histone modifications." Curr Biol **14**(14): R546-51.
- Piacentini, L., L. Fanti, et al. (2003). "Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in Drosophila euchromatin." J Cell Biol **161**(4): 707-14.
- Porter, A. C. and C. J. Farr (2004). "Topoisomerase II: untangling its contribution at the centromere." Chromosome Res **12**(6): 569-83.
- Preuss, U., G. Landsberg, et al. (2003). "Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase." Nucleic Acids Res **31**(3): 878-85.
- Qin, S. and M. R. Parthun (2002). "Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair." Mol Cell Biol **22**(23): 8353-65.
- Raisner, R. M., P. D. Hartley, et al. (2005). "Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin." Cell **123**(2): 233-48.
- Ramakrishnan, V. (1997). "Histone structure and the organization of the nucleosome." Annu Rev Biophys Biomol Struct **26**: 83-112.

- Ramirez-Carrozzi, V. R., A. A. Nazarian, et al. (2006). "Selective and antagonistic functions of SWI/SNF and Mi-2beta nucleosome remodeling complexes during an inflammatory response." Genes Dev **20**(3): 282-96.
- Rand, E. and H. Cedar (2003). "Regulation of imprinting: A multi-tiered process." J Cell Biochem **88**(2): 400-7.
- Rangasamy, D., L. Berven, et al. (2003). "Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development." Embo J **22**(7): 1599-607.
- Rangasamy, D., I. Greaves, et al. (2004). "RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation." Nat Struct Mol Biol **11**(7): 650-5.
- Rattner, J. B., M. J. Hendzel, et al. (1996). "Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure." J Cell Biol **134**(5): 1097-107.
- Rea, S., F. Eisenhaber, et al. (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." Nature **406**(6796): 593-9.
- Redon, C., D. R. Pilch, et al. (2003). "Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage." EMBO Rep **4**(7): 678-84.
- Reeves, R. (2001). "Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function." Gene **277**(1-2): 63-81.
- Reeves, R. and M. S. Nissen (1990). "The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure." J Biol Chem **265**(15): 8573-82.
- Reinhart, B. J. and D. P. Bartel (2002). "Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats." Science **297**(5588): 1831.
- Richards, E. J. and S. C. Elgin (2002). "Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects." Cell **108**(4): 489-500.
- Richmond, T. J., J. T. Finch, et al. (1984). "Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution." Nature **311**(5986): 532-7.
- Ridsdale, J. A., M. J. Hendzel, et al. (1990). "Histone acetylation alters the capacity of the H1 histones to condense transcriptionally active/competent chromatin." J Biol Chem **265**(9): 5150-6.
- Roca, J., R. Ishida, et al. (1994). "Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1781-5.
- Rodriguez Alfageme, C., G. T. Rudkin, et al. (1980). "Isolation, properties and cellular distribution of D1, a chromosomal protein of Drosophila." Chromosoma **78**(1): 1-31.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, et al. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." J Biol Chem **273**(10): 5858-68.
- Rorth, P., K. Szabo, et al. (1998). "Systematic gain-of-function genetics in Drosophila." Development **125**(6): 1049-57.
- Ross, W., T. Rowe, et al. (1984). "Role of topoisomerase II in mediating epipodophylotoxin-induced DNA cleavage." Cancer Res **44**(12 Pt 1): 5857-60.
- Rudert, F., S. Bronner, et al. (1995). "Transcripts from opposite strands of gamma satellite DNA are differentially expressed during mouse development." Mamm Genome **6**(2): 76-83.
- Ruiz-Garcia, A. B., R. Sendra, et al. (1998). "HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4." J Biol Chem **273**(20): 12599-605.
- Rybenkov, V. V., C. Ullsperger, et al. (1997). "Simplification of DNA topology below equilibrium values by type II topoisomerases." Science **277**(5326): 690-3.

- Rydberg, B., W. R. Holley, et al. (1998). "Chromatin conformation in living cells: support for a zig-zag model of the 30 nm chromatin fiber." *J Mol Biol* **284**(1): 71-84.
- Sabourin, M. and N. Osheroff (2000). "Sensitivity of human type II topoisomerases to DNA damage: stimulation of enzyme-mediated DNA cleavage by abasic, oxidized and alkylated lesions." *Nucleic Acids Res* **28**(9): 1947-54.
- Saccani, S. and G. Natoli (2002). "Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes." *Genes Dev* **16**(17): 2219-24.
- Sage, B. T., J. L. Jones, et al. (2005). "Sequence elements in cis influence heterochromatic silencing in trans." *Mol Cell Biol* **25**(1): 377-88.
- Sakaguchi, A. and A. Kikuchi (2004). "Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase." *J Cell Sci* **117**(Pt 7): 1047-54.
- Sander, M. and T. Hsieh (1983). "Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*." *J Biol Chem* **258**(13): 8421-8.
- Sander, M. and T. S. Hsieh (1985). "*Drosophila* topoisomerase II double-strand DNA cleavage: analysis of DNA sequence homology at the cleavage site." *Nucleic Acids Res* **13**(4): 1057-72.
- Santos-Rosa, H., R. Schneider, et al. (2002). "Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3." *Nature* **419**(6905): 407-11.
- Sarma, K. and D. Reinberg (2005). "Histone variants meet their match." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 139-49.
- Schafer, S. and M. Jung (2005). "Chromatin modifications as targets for new anticancer drugs." *Arch Pharm (Weinheim)* **338**(8): 347-57.
- Schalch, T., S. Duda, et al. (2005). "X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre." *Nature* **436**(7047): 138-41.
- Schotta, G., A. Ebert, et al. (2003). "SU(VAR)3-9 is a conserved key function in heterochromatic gene silencing." *Genetica* **117**(2-3): 149-58.
- Schotta, G., M. Lachner, et al. (2004). "A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin." *Genes Dev* **18**(11): 1251-62.
- Schulze, S. R., D. A. Sinclair, et al. (2005). "A genetic and molecular characterization of two proximal heterochromatic genes on chromosome 3 of *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **169**(4): 2165-77.
- Schwartz, B. E. and K. Ahmad (2005). "Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3." *Genes Dev* **19**(7): 804-14.
- Sengupta, T., M. Mukherjee, et al. (2005). "Characterization of the ATPase activity of topoisomerase II from *Leishmania donovani* and identification of residues conferring resistance to etoposide." *Biochem J* **390**(Pt 2): 419-26.
- Shaffer, C. D., G. E. Stephens, et al. (2002). "Heterochromatin protein 2 (HP2), a partner of HP1 in *Drosophila* heterochromatin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14332-7.
- Shapiro, T. A. and P. T. Englund (1990). "Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(3): 950-4.
- Shen, X. and M. A. Gorovsky (1996). "Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo." *Cell* **86**(3): 475-83.
- Sheridan, A. M., T. Force, et al. (2001). "PLIP, a novel splice variant of Tip60, interacts with group IV cytosolic phospholipase A(2), induces apoptosis, and potentiates prostaglandin production." *Mol Cell Biol* **21**(14): 4470-81.
- Shi, Y., F. Lan, et al. (2004). "Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1." *Cell* **119**(7): 941-53.

- Shiio, Y. and R. N. Eisenman (2003). "Histone sumoylation is associated with transcriptional repression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13225-30.
- Shiozaki, K. and M. Yanagida (1992). "Functional dissection of the phosphorylated termini of fission yeast DNA topoisomerase II." *J Cell Biol* **119**(5): 1023-36.
- Sivolob, A. V. and S. N. Khrapunov (1995). "Translational positioning of nucleosomes on DNA: the role of sequence-dependent isotropic DNA bending stiffness." *J Mol Biol* **247**(5): 918-31.
- Smith, E. R., J. M. Belote, et al. (1998). "Cloning of Drosophila GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members." *Nucleic Acids Res* **26**(12): 2948-54.
- Smith, M. A., L. Rubinstein, et al. (1994). "Therapy-related acute myeloid leukemia following treatment with epipodophyllotoxins: estimating the risks." *Med Pediatr Oncol* **23**(2): 86-98.
- Smith, M. M. (2002). "Centromeres and variant histones: what, where, when and why?" *Curr Opin Cell Biol* **14**(3): 279-85.
- Smith, S. and B. Stillman (1991). "Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro." *Embo J* **10**(4): 971-80.
- Soutoglou, E. and I. Talianidis (2002). "Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation." *Science* **295**(5561): 1901-4.
- Spence, J. M., R. Critcher, et al. (2002). "Co-localization of centromere activity, proteins and topoisomerase II within a subdomain of the major human X alpha-satellite array." *Embo J* **21**(19): 5269-80.
- Spence, J. M., R. E. Fournier, et al. (2005). "Topoisomerase II cleavage activity within the human D11Z1 and DXZ1 alpha-satellite arrays." *Chromosome Res* **13**(6): 637-48.
- Stanley, J. S., J. B. Griffin, et al. (2001). "Biotinylation of histones in human cells. Effects of cell proliferation." *Eur J Biochem* **268**(20): 5424-9.
- Steck, E. A., K. E. Kinnamon, et al. (1982). "Trypanosoma rhodesiense: evaluation of the antitrypanosomal action of 2,5-bis(4-guanylphenyl)furan dihydrochloride." *Exp Parasitol* **53**(1): 133-44.
- Stephens, G. E., E. E. Slawson, et al. (2005). "Interaction of heterochromatin protein 2 with HP1 defines a novel HP1-binding domain." *Biochemistry* **44**(40): 13394-403.
- Sterner, D. E. and S. L. Berger (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-59.
- Stewart, M. D., J. Li, et al. (2005). "Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment." *Mol Cell Biol* **25**(7): 2525-38.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." *Nature* **403**(6765): 41-5.
- Strick, R. and U. K. Laemmli (1995). "SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein." *Cell* **83**(7): 1137-48.
- Strick, T. R., V. Croquette, et al. (2000). "Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase." *Nature* **404**(6780): 901-4.
- Strissel, P. L., R. Espinosa, III, et al. (1996). "Scaffold attachment regions in centromere-associated DNA." *Chromosoma* **105**(2): 122-33.
- Struhl, G. and I. Greenwald (1999). "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila." *Nature* **398**(6727): 522-5.
- Strumberg, D., J. L. Nitiss, et al. (2002). "Importance of the fourth alpha-helix within the CAP homology domain of type II topoisomerase for DNA cleavage site recognition and quinolone action." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(9): 2735-46.

- Suka, N., K. Luo, et al. (2002). "Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin." Nat Genet **32**(3): 378-83.
- Sumner, A. T. (1995). "Inhibitors of topoisomerase II delay progress through mitosis and induce a doubling of the DNA content in CHO cells." Exp Cell Res **217**(2): 440-7.
- Sun, F. L., K. Haynes, et al. (2004). "cis-Acting determinants of heterochromatin formation on Drosophila melanogaster chromosome four." Mol Cell Biol **24**(18): 8210-20.
- Sun, Z. W. and C. D. Allis (2002). "Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast." Nature **418**(6893): 104-8.
- Susbielle, G., R. Blattes, et al. (2005). "Target practice: aiming at satellite repeats with DNA minor groove binders." Curr Med Chem Anticancer Agents **5**(4): 409-20.
- Swaminathan, J., E. M. Baxter, et al. (2005). "The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of Drosophila heterochromatin." Genes Dev **19**(1): 65-76.
- Taagepera, S., P. N. Rao, et al. (1993). "DNA topoisomerase II alpha is the major chromosome protein recognized by the mitotic phosphoprotein antibody MPM-2." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8407-11.
- Tagami, H., D. Ray-Gallet, et al. (2004). "Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis." Cell **116**(1): 51-61.
- Tamkun, J. W., R. Deuring, et al. (1992). "brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2." Cell **68**(3): 561-72.
- Thomas, J. O. (1999). "Histone H1: location and role." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 312-7.
- Thorne, A. W., P. Sautiere, et al. (1987). "The structure of ubiquitinated histone H2B." Embo J **6**(4): 1005-10.
- Tikoo, K., S. S. Lau, et al. (2001). "Histone H3 phosphorylation is coupled to poly-(ADP-ribosylation) during reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells." Mol Pharmacol **60**(2): 394-402.
- Tkachuk, D. C., S. Kohler, et al. (1992). "Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias." Cell **71**(4): 691-700.
- Toyoda, Y. and M. Yanagida (2006). "Coordinated Requirements of Human Topo II and Cohesin for Metaphase Centromere Alignment under Mad2-dependent Spindle Checkpoint Surveillance." Mol Biol Cell.
- Toyota, M. and J. P. Issa (2005). "Epigenetic changes in solid and hematopoietic tumors." Semin Oncol **32**(5): 521-30.
- Travers, A. A. and A. Klug (1987). "The bending of DNA in nucleosomes and its wider implications." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **317**(1187): 537-61.
- Travers, A. A. and J. M. Thompson (2004). "An introduction to the mechanics of DNA." Philos Transact A Math Phys Eng Sci **362**(1820): 1265-79.
- Trent, J. O., G. R. Clark, et al. (1996). "Targeting the minor groove of DNA: crystal structures of two complexes between furan derivatives of berenil and the DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG)₂." J Med Chem **39**(23): 4554-62.
- Trotta, E., E. D'Ambrosio, et al. (1995). "Evidence for DAPI intercalation in CG sites of DNA oligomer [d(CGACGTCG)]₂: a ¹H NMR study." Nucleic Acids Res **23**(8): 1333-40.
- Tsuboi, K., H. Komatsu, et al. (2003). "T-cell acute lymphoblastic leukemia as a secondary leukemia after a 3-year remission of acute myelocytic leukemia." Int J Hematol **77**(5): 518-21.

- Tsukada, Y., J. Fang, et al. (2006). "Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins." Nature **439**(7078): 811-6.
- Tsukiyama, T., P. B. Becker, et al. (1994). "ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor." Nature **367**(6463): 525-32.
- Tsukiyama, T., C. Daniel, et al. (1995). "ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor." Cell **83**(6): 1021-6.
- Tsukiyama, T. and C. Wu (1995). "Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor." Cell **83**(6): 1011-20.
- Turner, B. M. (1993). "Decoding the nucleosome." Cell **75**(1): 5-8.
- Turner, B. M. (2000). "Histone acetylation and an epigenetic code." Bioessays **22**(9): 836-45.
- Turner, B. M. (2002). "Cellular memory and the histone code." Cell **111**(3): 285-91.
- Turner, B. M., A. J. Birley, et al. (1992). "Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei." Cell **69**(2): 375-84.
- Uemura, T., H. Ohkura, et al. (1987). "DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*." Cell **50**(6): 917-25.
- Umanskaya, O. N., E. S. Ioudinkova, et al. (2005). "Inhibition of DNA topoisomerase II in living cells stimulates illegitimate recombination." Dokl Biochem Biophys **405**: 423-5.
- Utlei, R. T. and J. Cote (2003). "The MYST family of histone acetyltransferases." Curr Top Microbiol Immunol **274**: 203-36.
- Vakoc, C. R., S. A. Mandat, et al. (2005). "Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin." Mol Cell **19**(3): 381-91.
- Van Hooser, A., D. W. Goodrich, et al. (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. and D. E. Gottschling (2003). "The histone minority report: the variant shall not be silenced." Cell **112**(5): 591-3.
- Vandel, L. and D. Trouche (2001). "Physical association between the histone acetyl transferase CBP and a histone methyl transferase." EMBO Rep **2**(1): 21-6.
- Vaute, O., E. Nicolas, et al. (2002). "Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases." Nucleic Acids Res **30**(2): 475-81.
- Velez-Cruz, R., J. N. Riggins, et al. (2005). "Exocyclic DNA lesions stimulate DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha in vitro and in cultured cells." Biochemistry **44**(10): 3972-81.
- Verdel, A., S. Jia, et al. (2004). "RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex." Science **303**(5658): 672-6.
- Verdone, L., M. Caserta, et al. (2005). "Role of histone acetylation in the control of gene expression." Biochem Cell Biol **83**(3): 344-53.
- Verschure, P. J., I. van der Kraan, et al. (2005). "In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation." Mol Cell Biol **25**(11): 4552-64.
- Vicent, G. P., R. Koop, et al. (2002). "Complex role of histone H1 in transactivation of MMTV promoter chromatin by progesterone receptor." J Steroid Biochem Mol Biol **83**(1-5): 15-23.

- Vignali, M., A. H. Hassan, et al. (2000). "ATP-dependent chromatin-remodeling complexes." *Mol Cell Biol* **20**(6): 1899-910.
- Volpe, T. A., C. Kidner, et al. (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi." *Science* **297**(5588): 1833-7.
- Walker, J. V. and J. L. Nitiss (2002). "DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy." *Cancer Invest* **20**(4): 570-89.
- Wallrath, L. L. (1998). "Unfolding the mysteries of heterochromatin." *Curr Opin Genet Dev* **8**(2): 147-53.
- Wang, H., R. Cao, et al. (2001). "Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase." *Mol Cell* **8**(6): 1207-17.
- Wang, H., Z. Q. Huang, et al. (2001). "Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor." *Science* **293**(5531): 853-7.
- Wang, J. C. (1971). "Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega." *J Mol Biol* **55**(3): 523-33.
- Wang, J. C. (2002). "Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6): 430-40.
- Wang, L., C. Bailly, et al. (2000). "Specific molecular recognition of mixed nucleic acid sequences: an aromatic dication that binds in the DNA minor groove as a dimer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(1): 12-6.
- Wang, L., C. Carrasco, et al. (2001). "Evaluation of the influence of compound structure on stacked-dimer formation in the DNA minor groove." *Biochemistry* **40**(8): 2511-21.
- Wang, Y., J. Wysocka, et al. (2004). "Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination." *Science* **306**(5694): 279-83.
- Wang, Z. and P. T. Englund (2001). "RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA." *Embo J* **20**(17): 4674-83.
- Wang, Z., J. C. Morris, et al. (2000). "Inhibition of Trypanosoma brucei gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters." *J Biol Chem* **275**(51): 40174-9.
- Warburton, P. E. and W. C. Earnshaw (1997). "Untangling the role of DNA topoisomerase II in mitotic chromosome structure and function." *Bioessays* **19**(2): 97-9.
- Waterborg, J. H. (2002). "Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover?" *Biochem Cell Biol* **80**(3): 363-78.
- Wei, Y., C. A. Mizzen, et al. (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**(13): 7480-4.
- Wei, Y., L. Yu, et al. (1999). "Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation." *Cell* **97**(1): 99-109.
- Weiler, K. S. and B. T. Wakimoto (1995). "Heterochromatin and gene expression in Drosophila." *Annu Rev Genet* **29**: 577-605.
- Wells, N. J. and I. D. Hickson (1995). "Human topoisomerase II alpha is phosphorylated in a cell-cycle phase-dependent manner by a proline-directed kinase." *Eur J Biochem* **231**(2): 491-7.
- Wemmer, D. E. and P. B. Dervan (1997). "Targeting the minor groove of DNA." *Curr Opin Struct Biol* **7**(3): 355-61.
- Wigley, D. B., G. J. Davies, et al. (1991). "Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein." *Nature* **351**(6328): 624-9.
- Wilhelm, F. X., M. L. Wilhelm, et al. (1978). "Reconstitution of chromatin: assembly of the nucleosome." *Nucleic Acids Res* **5**(2): 505-21.

- Wilson, W. D., B. Nguyen, et al. (2005). "Dications that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity." Curr Med Chem Anticancer Agents **5**(4): 389-408.
- Wilson, W. D., F. A. Tanious, et al. (1989). "Interaction of unfused tricyclic aromatic cations with DNA: a new class of intercalators." Biochemistry **28**(5): 1984-92.
- Wilstermann, A. M. and N. Osheroff (2003). "Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes." Curr Top Med Chem **3**(3): 321-38.
- Wirbelauer, C., O. Bell, et al. (2005). "Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias." Genes Dev **19**(15): 1761-6.
- Woessner, R. D., M. R. Mattern, et al. (1991). "Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells." Cell Growth Differ **2**(4): 209-14.
- Wood, A., N. J. Krogan, et al. (2003). "Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter." Mol Cell **11**(1): 267-74.
- Woodcock, C. L., S. A. Grigoryev, et al. (1993). "A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 9021-5.
- Woynarowski, J. M., M. McHugh, et al. (1989). "Modulation of topoisomerase II catalytic activity by DNA minor groove binding agents distamycin, Hoechst 33258, and 4',6'-diamidine-2-phenylindole." Mol Pharmacol **35**(2): 177-82.
- Woynarowski, J. M., R. D. Sigmund, et al. (1989). "DNA minor groove binding agents interfere with topoisomerase II mediated lesions induced by epipodophyllotoxin derivative VM-26 and acridine derivative m-AMSA in nuclei from L1210 cells." Biochemistry **28**(9): 3850-5.
- Wurtz, N. R., J. M. Turner, et al. (2001). "Fmoc solid phase synthesis of polyamides containing pyrrole and imidazole amino acids." Org Lett **3**(8): 1201-3.
- Wyckoff, E., D. Natalie, et al. (1989). "Structure of the Drosophila DNA topoisomerase II gene. Nucleotide sequence and homology among topoisomerases II." J Mol Biol **205**(1): 1-13.
- Wynia, M. K., J. P. Ioannidis, et al. (1998). "Analysis of life-long strategies to prevent Pneumocystis carinii pneumonia in patients with variable HIV progression rates." Aids **12**(11): 1317-25.
- Wysocka, J., C. D. Allis, et al. (2006). "Histone arginine methylation and its dynamic regulation." Front Biosci **11**: 344-55.
- Xiao, B., C. Jing, et al. (2003). "Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9." Nature **421**(6923): 652-6.
- Xiao, H., T. K. Li, et al. (2003). "Acidic pH induces topoisomerase II-mediated DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5205-10.
- Xu, W., D. G. Edmondson, et al. (1998). "Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates." Mol Cell Biol **18**(10): 5659-69.
- Yamamoto, T. and M. Horikoshi (1997). "Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60." J Biol Chem **272**(49): 30595-8.
- Yang, X. J. (2004). "Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling." Bioessays **26**(10): 1076-87.
- Yang, X. J. (2005). "Multisite protein modification and intramolecular signaling." Oncogene **24**(10): 1653-62.

- You, Y. (2005). "Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anti-cancer agents." Curr Pharm Des **11**(13): 1695-717.
- Zamore, P. D. (2001). "RNA interference: listening to the sound of silence." Nat Struct Biol **8**(9): 746-50.
- Zeng, L. and M. M. Zhou (2002). "Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain." FEBS Lett **513**(1): 124-8.
- Zhang, X., H. Tamaru, et al. (2002). "Structure of the Neurospora SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase." Cell **111**(1): 117-27.
- Zhang, X., Z. Yang, et al. (2003). "Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases." Mol Cell **12**(1): 177-85.
- Zhang, Y. and D. Reinberg (2001). "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails." Genes Dev **15**(18): 2343-60.
- Zhao, K., C. M. Hart, et al. (1995). "Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32." Cell **81**(6): 879-89.
- Zhimulev, I. F. (1999). "Genetic organization of polytene chromosomes." Adv Genet **39**: 1-589.
- Zhimulev, I. F. and E. S. Belyaeva (2003). "Intercalary heterochromatin and genetic silencing." Bioessays **25**(11): 1040-51.
- Zlatanova, J., P. Caiafa, et al. (2000). "Linker histone binding and displacement: versatile mechanism for transcriptional regulation." Faseb J **14**(12): 1697-704.
- Zucchi, R. and R. Danesi (2003). "Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines." Curr Med Chem Anticancer Agents **3**(2): 151-71.

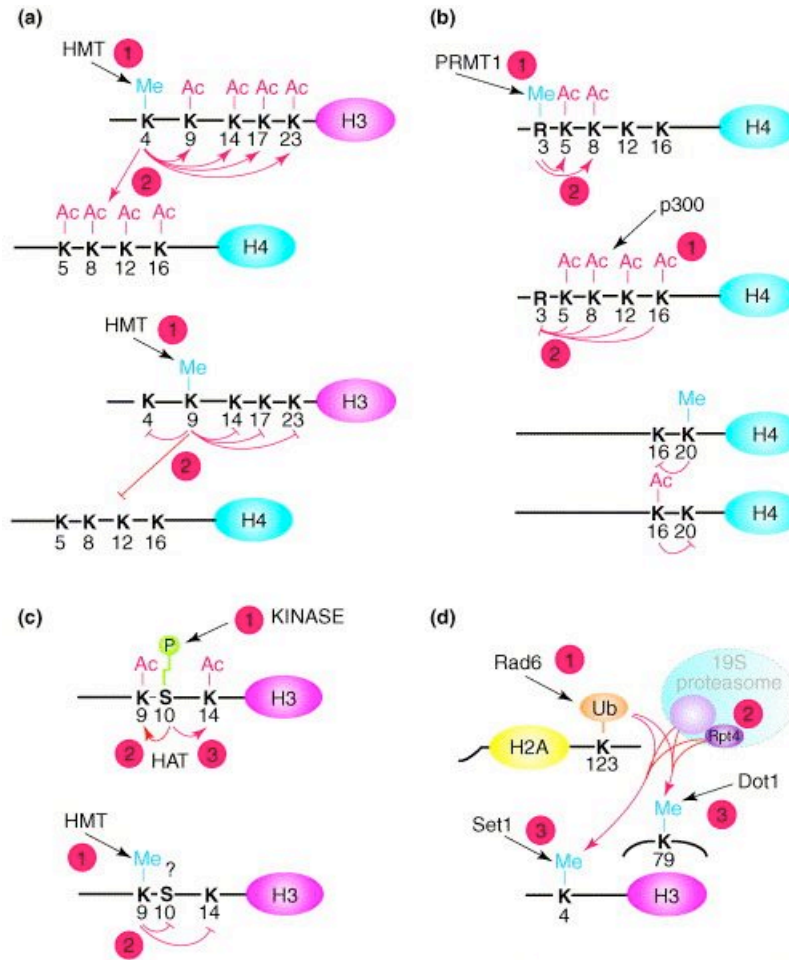
Annexe 1

The histone modifications' nomenclature according to the Epigenome Network of Excellence.

Modification	Acide Aminé Ciblé	Niveau	Abbréviation	Exemple
Acetyl-	K (lysine)	mono-	Ac	H3K9ac
Methyl-	R (arginine)	mono-	me1	H3R17me1
Methyl-	R	di-, symmetrical	me2s	H3R2me2s
Methyl-	R	di-, asymmetrical	me2a	H3R17me2a
Methyl-	K	mono-	me1	H3K4me1
Methyl-	K	di-	me2	H3K4me2
Methyl-	K	tri-	me3	H3K4me3
Phosphoryl-	S (serine) or T (threonine)	mono-	ph	H3S10ph
Ubiquityl-	K	mono-	ub	H2BK120ub
Sumoyl-	K	mono-	su	H4K5su (*)
ADP ribosyl-	E (glutamine)	mono-	ar1	H2BE2ar1
ADP ribosyl-	E	poly-	arn	H2BE2arn (*)

Cette nomenclature a été élaborée à la suite du meeting du réseau d'excellence sur l'Epigénome (EnoE : Epigenome Network of Excellence) qui s'est tenu à Brno (République Tchèque) en septembre 2004 et a été présenté pour la première fois dans un article de Michael Turner paru dans Nature Structural and Molecular Biology en 2005. Elle se lit de la gauche (histone) vers la droite (nature de la modification), l'identité du résidu est placé directement à la droite de celle de l'histone et est omise si elle n'est pas connue. (*) pas de confirmation formelle

Annexe 2 : Illustrations de l'interdépendance des modifications des histones

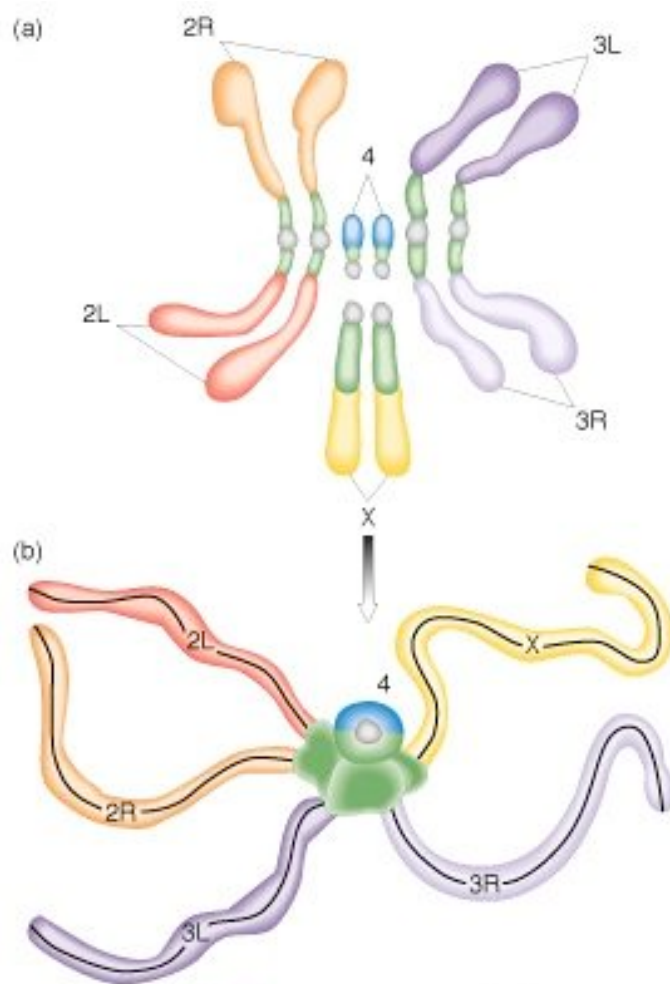


Ces exemples illustrent les principaux modes d'interdépendance entre modifications des histones. La méthylation d'H3K4 corrélée à l'activation de la transcription facilite l'acétylation globale des lysines sur les extrémités d'H3 et H4 alors que la méthylation d'H3K9 a l'effet inverse (a). Curieusement si la méthylation d'H4R3 stimule l'acétylation des lysines 5 et 8 d'H4, l'acétylation de ces mêmes résidus ainsi que des lysines 12 et 16 d'H4 inhibe fortement la méthylation d'H4R3 (b) ceci pourrait permettre une forme de rétrocontrôle. Alors que méthylation d'H4K20 et acétylation d'H4K16 sont antagonistes l'une de l'autre. Dans l'exemple (c), la phosphorylation d'H3S10 stimule l'acétylation d'H3K9 et d'H3K14 et inhibe également la méthylation d'H3K9 (non représenté). A l'inverse, la méthylation d'H3K9 inhiberait la phosphorylation d'H3S10 et l'acétylation d'H3K14. On sait de plus aujourd'hui que d'H3K14ac et H3S10ph empêche conjointement la reconnaissance d'H3K9me par le chromodomaine d'HP1 (voir figure12). Enfin chez la levure l'ubiquitination d'H2BK123 par le protéasome est nécessaire pour la méthylation d'H3K4 et H3K79

Image tirée de (Margueron 2005).

Pour la nomenclature des acides aminés des histones et de leurs modifications, se reporter à l'annexe 1

Annexe 3 : représentation schématique des chromosomes mitotiques et polytènes chez la drosophile



En métaphase, les trois paires d'autosomes (notées 2,3 et 4) sont orientées par rapport aux centromères (en gris) entre un bras droit (R) et un bras gauche (L). Le centromère des chromosomes sexuels (ici deux X) et des chromosomes 4 sont situés à leur extrémité.

Dans les chromosomes polytènes, l'hétérochromatine sous-répliquée (en vert) coalesce pour former le chromocentre.

Target Practice: Aiming at Satellite Repeats with DNA Minor Groove Binders

Guillaume Susbielle, Roxane Blattes, Vanessa Brevet, Caroline Monod and Emmanuel Käs*

Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, UMR 5099 CNRS/UPS, IFR 109, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 4, France

Abstract: Much progress has been made in recent years in developing small molecules that target the minor groove of DNA. Striking advances have led to the design of synthetic molecules that recognize specific DNA sequences with affinities comparable to those of eukaryotic transcription factors. This makes it feasible to modulate or inhibit DNA/protein interactions *in vivo*, a major step towards the development of general strategies of anti-gene therapy. Examples from anti-parasitic drugs also suggest that synthetic molecules can affect a variety of cellular functions crucial to cell viability by more generally targeting vast portions of genomes based on their biased base composition. This provides a rationale for developing approaches based on selective interactions with broad genomic targets such as satellite repeats that are associated with structural or architectural components of chromatin essential for cellular proliferation. Using examples drawn from the *Drosophila melanogaster* model system, we review here the use of synthetic polyamides or diamidines that bind the DNA minor groove and can be used as highly selective agents capable of interfering with specific protein/DNA interactions that occur in A+T-rich repeated sequences that constitute a significant portion of eukaryotic genomes. The satellite localization of cellular proteins that bind the minor groove of DNA *via* domains such as the AT hook motif is highly sensitive to these molecules. A major consequence of the competition between these proteins and their synthetic mimics is an alteration of the nuclear localization and function of proteins such as topoisomerase II, a major target of anti-cancer drugs.

Key Words: DNA minor groove, polyamides, diamidine antiparasitic drugs, AT hook motif, satellite DNA, heterochromatin, silencing, topoisomerase II.

DRUG/DNA VS PROTEIN/DNA INTERACTIONS

Two meetings on the theme of "Drugs acting on nucleic acids" were held in 1991 and 1994 as part of the Jacques Monod Conferences organized by the CNRS (the French National Center for Scientific Research). Drawing scientists from a variety of backgrounds, these meetings highlighted exciting new advances, but also a broad chasm that existed between the development and characterization of molecules capable of interacting with nucleic acids with variable affinities or specificities and their possible biological applications. As one conference speaker -a biologist- rather dismissively put it during the last of these two meetings (which have not been held again since), proteins -not drugs- act on nucleic acids *in vivo*.

Ten years later, it is clear that the gap between chemistry and biology has been greatly reduced, if not eliminated. The development of highly specific small molecules that bind DNA has led to the demonstration that they could interfere with protein/DNA interactions *in vitro* and *in vivo* [1]. Some of these molecules mimic naturally occurring DNA-binding motifs and thus act as powerful competitors capable of selectively disrupting the association of their target sequences with the proteins that recognize them. We will focus here on a review of the possible uses of two classes of small synthetic molecules that act on nucleic acids: the mixed pyrrole/

imidazole polyamides initially developed by P.B. Dervan and collaborators (reviewed in [2-4]) and antiparasitic diamidines developed by D. W. Boykin and W. D. Wilson (see W. D. Wilson *et al.* in this issue). As the synthesis and applications of some of these molecules and their derivatives are extensively reviewed in this issue, we will address instead novel strategies based on their use as general tools directed against bulk regions of eukaryotic genomes which, while non-coding, serve as major interaction sites for structural/architectural components of chromatin important for cell growth and proliferation.

Such a strategy has been used in the course of evolution time and time again. One example relevant to our discussion is that of distamycin [5, 6]. This crescent-shaped oligopeptide preferentially binds the minor groove of dA•dT sequences and is produced by *Streptomyces distallicus*, whose own genome is highly G+C-rich [7, 8]. This toxic antibiotic potentially interferes with a broad range of protein/DNA interaction involving A+T-rich sequences [9, 10]. One can speculate that the general preference of distamycin for dA•dT sequences has been selected as part of a strategy for competing with other microorganisms whose genome might be A+T-rich, while largely protecting G+C-rich *S. distallicus* from self-destruction by its own potentially lethal product.

A corollary of using such a strategy is illustrated by the biological activity of diamidines and their derivatives (see W. D. Wilson *et al.*, this issue). These molecules are highly active against several pathogenic parasites [11-15] whose

*Address correspondence to this author at the LBME UMR 5099, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 4, France; Tel: +33 (0)5 61 33 59 59; E-mail: kas@ibcg.biotoul.fr

common characteristic is an extraordinarily A+T-rich genome or portion thereof [16, 17]. As in the case of distamycin, diamidines are also expected to interfere in a potent way with the general metabolism of genomes whose base composition is highly skewed in favor of interactions with the drugs. In this case, the selective toxicity of these synthetic minor groove binders is determined by the biased DNA base composition of their targets, an observation that can be used as a paradigm for targeting specific subsets of genomes based not on DNA sequence *per se*, but on overall base composition.

TARGETING A+T-RICH SEQUENCES: EARLY EXPERIMENTS WITH DISTAMYCIN

One of the early uses of distamycin in biological investigations was for the purpose of “statistical sequencing,” a method developed by A. A. Travers and collaborators [18]. Statistical sequencing takes advantage of the fact that distamycin binds consecutive dA•dT base pairs highly selectively and protects these sequences from digestion by DNase I. This results in footprinted regions that are indicative of highly A+T-rich sequences in a given DNA fragment. Similarly, G+C-rich stretches can be detected as regions protected from DNase I digestion by chromomycin A3, which selectively binds dG•dC base pairs. Thus, protection from nuclease digestion in the presence of these drugs readily identifies regions of biased base composition. As DNase I is itself a minor groove binder [19, 20], a corollary of the statistical sequencing method is that a ligand such as distamycin should be able to affect proteins that bind A+T-rich sequences *via* minor groove interactions. This was indeed shown to be the case for the interaction of sequences such as satellite repeats or Scaffold-Associated Regions (SAR or MAR sequences that are believed to form the base of chromatin loops in eukaryotic cells, reviewed in [21]) with proteins such as histone H1 and topoisomerase II, which preferentially bind these AT-rich sequences [22-24]. Later experiments demonstrated secondary effects of AT-binding by distamycin, which was also shown to interfere with the formation of complexes involving the major groove, including homeodomain/DNA complexes, presumably as a result of drug-induced changes in the conformation of DNA [25, 26]. More generally, numerous studies identified distamycin as a potent regulator of DNA/topoisomerase II interactions at the level of both DNA binding and cleavage, suggesting that the activity of this important enzyme, a major target of anticancer drugs, could be regulated by minor groove ligands [27-34].

CELLULAR DISTAMYCIN “ANALOGUES:” IDENTIFYING AT-SPECIFIC PROTEINS

Given the ability of distamycin to selectively perturb protein/DNA interactions involving AT-rich sequences, an intriguing possibility is that there might exist cellular analogues of distamycin capable of binding to AT-rich genomic regions [31]. While initially highly speculative, this hypothesis was first validated following the characterization of the AT hook DNA-binding domain (reviewed in [35, 36]), whose planar crescent structure resembles that of distamycin. The AT hook motif was first discovered in the mammalian HMGA proteins (formerly known as HMG-I/Y proteins)

[37], which contain three copies of this domain and constitute the archetype for the multi-AT hook (MATH) proteins found in all living organisms but absent in viruses [38]. HMGA was indeed found to share with distamycin the ability to compete with histone H1 for binding to AT-rich DNA such as SAR/MAR sequences [39]. HMGA proteins are highly expressed in proliferating cells but not in differentiated quiescent cells (see [36] for review). However, they are re-expressed in tumor cells and their aberrant expression has been correlated with various tumors. As such, they constitute a potential target for anticancer therapy (reviewed in [40, 41]).

HMGA proteins have been shown to possess a striking range of biological functions, including the assembly of enhancosomes required for the transcriptional activation of certain genes or of specific complexes involved in transcriptional repression (see [35, 36] for review) and even in the integration of the HIV-1 retrovirus [42, 43]. Aside from these diverse activities, the predominant localization of HMGA proteins in AT-rich alpha satellite repeats, at the origin of their identification [44], has eluded a functional characterization. A similar situation is encountered in *Drosophila melanogaster*, where a structural homologue of HMGA, the D1 protein [45, 46], is exclusively associated with the major AT-rich satellites found in this organism, in particular the alpha-like 1.688 g/cm³ 359-bp satellite III (SAT III) repeat and the simple (AATAT)_n satellite I (SAT I) repeats (see Fig. (1)) [47, 48]. D1, which contains 10 AT hook motifs [49], thus appears to be the *Drosophila* orthologue of HMGA and the characterization of its biological function(s) was recently made possible using a combination of chemical, genetic, molecular and cell biology approaches [48, 50], which will be discussed below.

IMPROVING ON DISTAMYCIN: SYNTHETIC POLYAMIDES THAT TARGET SATELLITE REPEATS

The specificity of distamycin for dA•dT sequences and its general preference for AT-rich satellites is compromised by its ability to bind dG•dC-containing sequences non specifically at higher concentrations [5]. This relative promiscuity probably explains its lack of suitability as a therapeutic agent against viruses or cancer cells due to its high toxicity. Building on the DNA recognition rules developed by P.B. Dervan and collaborators (reviewed in this issue and in [24]), U. K. Laemmli and collaborators reported on the remarkable activities of synthetic oligopyrrole and mixed pyrrole/imidazole polyamides designed to target satellite repeats of *Drosophila melanogaster* [51, 52]. Their landmark experiments yielded two key findings: such polyamides can be ingested by developing organisms as complex as a fruit fly; once ingested, they will induce loss- or gain-of-function phenotypes consistent with their DNA-binding specificity (see [53] for review). Most importantly, they demonstrate that it is possible to alter overall patterns of gene expression by targeting non-coding satellite repeats highly enriched in pericentric heterochromatin, an intriguing alternative to direct anti-gene therapies.

The P31 pyrrole/imidazole polyamide [51] was designed to bind the (AAGAG)_n and (AAGAGAG)_n repeats of the *Drosophila* satellite V (SAT V, see Fig. (1)). In the appro-

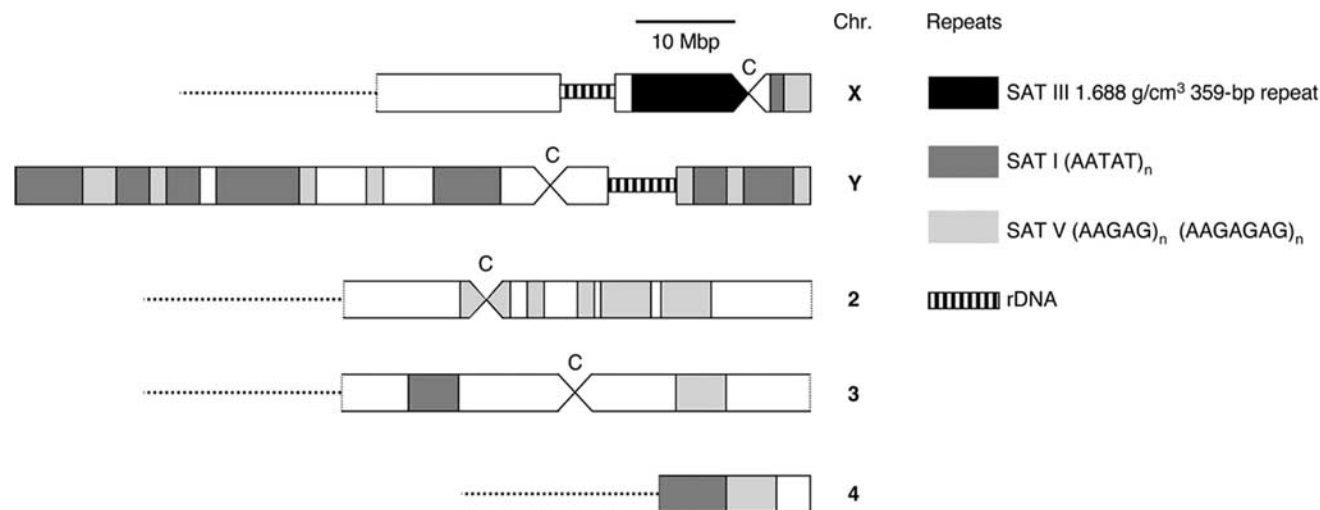


Fig. (1). *Drosophila melanogaster* heterochromatin and major satellite repeats. The schematized pericentric heterochromatin regions of the *Drosophila* chromosomes show the localization of the major satellite repeats discussed in this review. SAT III, I and V sequences are represented by black, dark gray and light gray boxes, respectively, rDNA repeats located on the X and Y chromosomes by hatched boxes. White boxes indicate sequences distinct from satellite repeats. These maps are adapted from *in situ* hybridization data [47]. Note that the Y chromosome is composed almost exclusively of heterochromatin and is shown here in its entirety.

appropriate genetic background, feeding P31 to flies resulted in well-defined homeotic transformations that mimic the effects of mutations of the gene encoding GAGA factor (GAF) [52]. The effect of P31 was proposed to be mediated by a redistribution of GAF from its binding sites in euchromatin, where this protein acts as a positive transcription activator, to SAT V. The loss-of-function phenotypes induced by P31 are thus consistent with a reduced availability of GAF for gene expression due to the massive recruitment of GAF to SAT V repeats spanning millions of base pairs. In this case, it was proposed that drug-induced “opening” of SAT V heterochromatin unmasks AAGAG sites recognized by GAF [51].

The P9 polyamide is an oligopyrrole structurally related to distamycin that highly specifically targets the *Drosophila* SAT I and SAT III repeats (Fig. (1)) [51]. P9 was shown to exert a profound effect on position-effect variegation (PEV) [52]. PEV arises when a euchromatic gene is juxtaposed to heterochromatin as a result of a chromosomal rearrangement or gene insertion into a host genome. This phenomenon denotes the heterochromatin-mediated silencing of the gene, reflected by its stochastic inactivation and mosaic expression which, once established, is stably propagated to daughter cells (see [54, 55] for review). A classical example of PEV in *Drosophila* is the *white-mottled* inversion, which places the *white* gene, responsible for the red eye color of wild-type flies, close to rDNA repeats in X-chromosome pericentric heterochromatin (Figs. (1) and (3)), within approximately 3.5 Mbp of the SAT III repeat array [56]. This localization leads to a partial silencing of the gene, resulting in its variegated “mottled” expression, a phenotype that was suppressed by feeding P9 to developing *white-mottled* larvae [52]. P9-induced suppression of PEV is reflected by the recovery of normal or near-normal expression of the *white-mottled* allele, a striking gain-of-function similar to that resulting from mutations in genes encoding proteins implicated in silencing, such as heterochromatin protein 1 (HP1) [55].

These remarkable results rest on the ability to design and synthesize DNA-binding molecules of the appropriate specificity and affinity (polyamides typically have apparent dissociation constants in the nanomolar range or below, comparable to those of eukaryotic transcription factors). The selectivity of polyamides is enhanced by the unexpected accessibility of the DNA minor groove in chromatin, even in its most compact forms – heterochromatin and mitotic chromosomes. This is illustrated in Fig. (2), which shows staining of interphase and prophase nuclei and mitotic chromosomes with Texas Red-labeled P31 (P31TR, red) and fluorescein-labeled P9 (P9F, green) (see also [57, 58]). In the case of mitotic chromosomes, the staining pattern observed is fully consistent with the localization of SAT I, SAT III and SAT V repeats derived from high-resolution *in situ* hybridization data [47]. Wide-field deconvolution microscopy followed by 3-D reconstruction (lower photographs) also reveals discrete SAT I, SAT III and SAT V territories, an approach which might be useful to map the localization of active or silenced genes relative to heterochromatin domains. Thus, in addition to their ability to affect gene expression via satellite-repeat binding, these molecules can also serve as powerful cytological staining tools, as also illustrated by the development of polyamides capable of selectively recognizing either insect or mammalian telomeric repeats [59].

MOLECULAR CONSEQUENCES OF POLYAMIDE BINDING TO SATELLITE REPEATS

As in the case of the loss-of-function phenotypes induced by P31 as a result of SAT V binding [51, 52], suppression of PEV mediated by P9 was proposed to act through SAT III “chromatin opening” and a subsequent reduction of silencing effects on the relatively nearby *white* gene. Similar effects had been previously observed following expression in *Drosophila* of MATH20, an artificial protein containing 20 tandem repeats of the AT hook motif derived from the

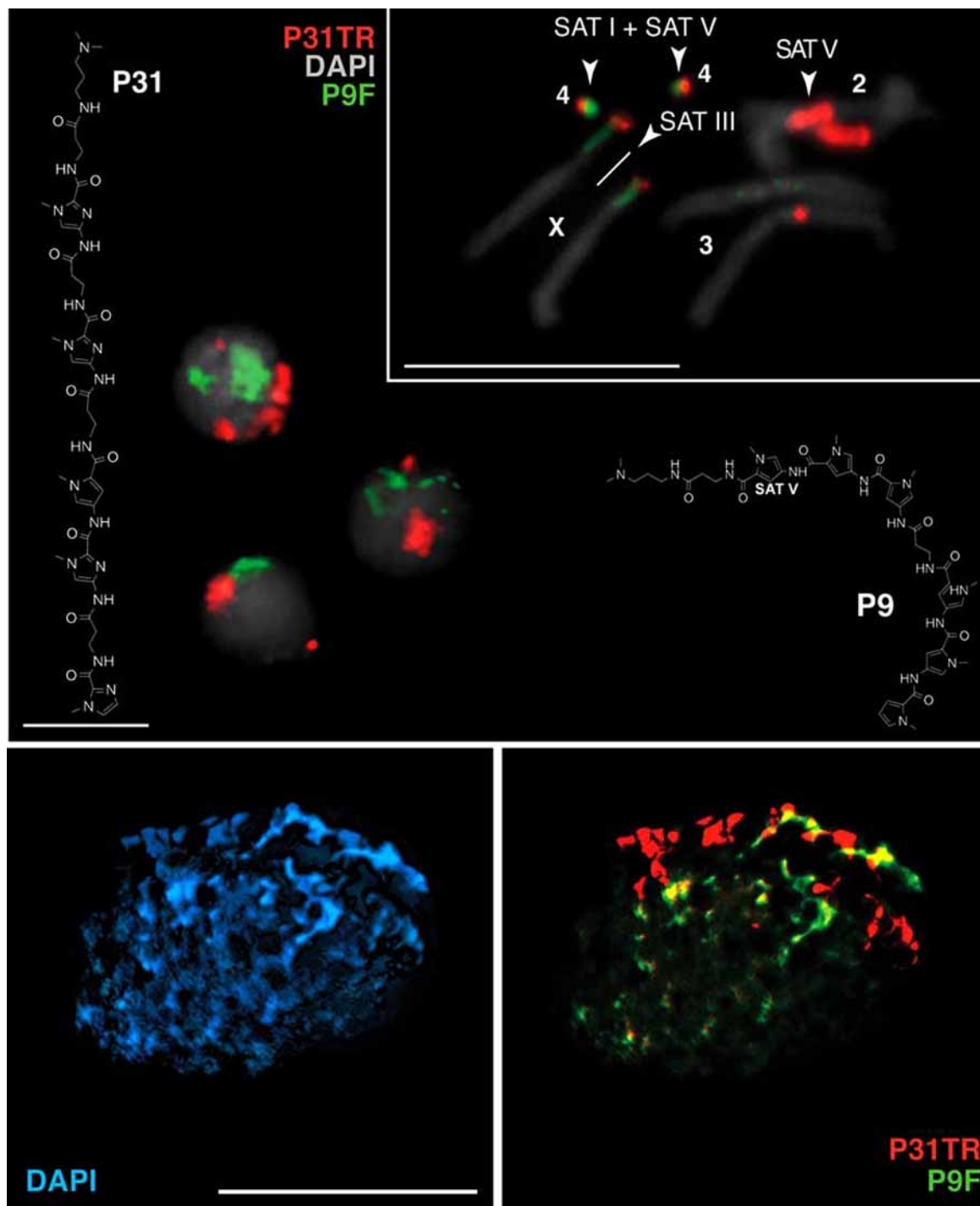


Fig. (2). Localization of SAT repeats in *Drosophila* nuclei and chromosomes. Panel A: dye-conjugated polyamides were used to localize SAT repeats in nuclei and chromosomes from fixed larval brains. The overall structure of P9 is (Py)₃-b-(Py)₃-b-Dp, that of P31 is Im-b-Im-Py-b-Im-b-Im-b-Dp, where Py denotes a pyrrole, Im an imidazole, b is b-alanine and Dp is dimethylaminopropylamide [51]. P31TR (2 nM), a Texas Red-conjugated P31 derivative (red), detects SAT V (AAGAG)_n or (AAGAGAG)_n repeats located predominantly on chromosome 2 and, to a lesser degree, on chromosomes 4 and 3 and at the very tip of the X. P9F (5 nM), a fluorescein-conjugated P9 oligopyrrole (green), detects the prominent SAT III-repeat array in the pericentric region of the X chromosome and (AATAT)_n SAT I repeats on chromosome 4, at the tip of the X and on both sides of the centromeric regions of chromosome 3. Samples were counterstained with DAPI (gray). Comparison of the staining pattern detected on chromosomes with the map shown in Fig. (1) demonstrates the remarkable specificity of these molecules, which can recognize their targets even in highly compact chromatin. Panel B shows the DAPI (blue) and merged P31TR (red) and P9F (green) signals in an early prophase nucleus examined by wide-field deconvolution microscopy and 3-D reconstruction. Discrete SAT I/III and SAT V territories are clearly visible and define largely non-overlapping heterochromatin domains. Scale bars: 5 μ m.

HMGA protein [60, 61]. A plausible explanation for these effects is that SAT III chromatin opening by MATH20 and P9 might be due to displacement of an endogenous protein specifically bound to SAT III repeats and which might be a target for direct competition by either molecule [50].

The HMGA-like D1 protein of *Drosophila* is predominantly associated with SAT III repeats *in vivo* [46, 48]. The hypothesis that its interaction with SAT III might be the major target of both MATH20 and P9 is supported by several observations. First, inactivation of the gene encoding D1 also results in suppression of *white-mottled* PEV, the first example of a DNA-binding protein possessing the appropriate specificity that affects heterochromatin-mediated silencing [48]. In addition, a similar effect is obtained following over-expression of D1DE, a protein that lacks the C-terminal acidic domain of wild-type D1 and acts as a dominant negative mutant form of the full-length protein. This suggests that the biological function of D1 rests on two separable activities: a DNA-binding function provided by its 10 AT hook motifs and a secondary function implicating its C-terminal domain, most likely required for protein/protein interactions. Finally, it was shown that D1 and MATH20 indeed compete for identical binding sites on SAT III repeats and that suppression of *white-mottled* PEV by MATH20 correlates with the displacement of D1 from SAT III sequences [50]. More recently, results of experiments carried out in our laboratory demonstrated that P9 similarly competes with D1 for binding to SAT III, further suggesting that the D1 protein is indeed the main target of P9 and that competition for binding to similar sites in DNA constitutes the main mechanism whereby this synthetic compound can profoundly affect gene expression.

This work, details of which will be published elsewhere, provides additional information on the mechanism of action of the P9 oligopyrrole. The D1 protein is essential for *Drosophila* development [50] and results summarized above suggest that its function is mediated by DNA binding and recruitment of other proteins important for heterochromatin assembly. Using P9 to displace D1 selectively in an *ex vivo* system of permeabilized *Drosophila* larval brains, we indeed found that competition by P9 for binding to SAT III repeats results in the loss of other heterochromatin-associated proteins, including HP1 and, more unexpectedly, topoisomerase II. While topoisomerase II has long been known to be associated with SAT III repeats [30, 62, 63], the significance of this localization has remained unclear. Our results suggest that the enzyme functions as both a structural and functional component of heterochromatin, classically defined as the portion of the genome which fails to decondense after mitosis. As topoisomerase II is required for chromosome condensation [64] (see also [65] and references therein), it is possible that its association with heterochromatin is required to maintain pericentric regions in a highly compacted state. A role for topoisomerase II in heterochromatin-mediated silencing is also supported by our observation that feeding *white-mottled* larvae VM26, a topoisomerase II poison, at sub-lethal doses which do not interfere with development, results in a strong suppression of PEV (to be published elsewhere).

These recent results are summarized in Fig. (3), which illustrates our current model for heterochromatin assembly in the pericentric region of the *Drosophila* X chromosome. We

propose that D1 initiates heterochromatin assembly by binding to SAT III repeats. The acidic C-terminal domain of D1, which resembles that found in HMGA proteins and is required for the biological activity of the *Drosophila* protein [48], most likely serves to recruit other proteins that are key players in determining the functional properties of heterochromatin and include the silencing HP1 protein [54, 55] and topoisomerase II. Competition by MATH20, D1DE or P9 results in the displacement of D1 and the subsequent loss of HP1 and topoisomerase II from SAT III repeats. Note that the nearby rDNA repeats, which span approximately 3.5 Mbp, are not affected by this competition and normally remain associated with HP1 and topoisomerase II. Most importantly, the 3' end of the *white-mottled* allele of the *white* gene is located about 20 kbp from the rDNA array [56], but its expression (schematized in the Figure as an OFF/ON state) correlates with the protein composition of SAT III repeats, but not with that of the rDNA array. It is unclear at present how the loss of HP1 and topoisomerase II from SAT III repeats can be transduced to the *white* gene over 3.5 Mbp away. One possible explanation, consistent with spatial models for heterochromatin assembly and propagation [66-68], is that the compartmentalization of the rDNA repeats in the nucleolus places the *white-mottled* allele in close proximity to the SAT III array, making it sensitive to the effects of competitors such as P9 or MATH20.

DRAWING FROM THE EXAMPLE OF ANTIPARASITIC DRUGS: THE BIGGER THE TARGET, THE BETTER

Satellite repeats, because of their highly biased base composition and the huge chromosomal distances they span, can serve as enormous sinks for small molecules of the appropriate specificity. While they are usually located in highly condensed constitutive heterochromatin, they are readily available for interaction with minor groove binders such as polyamides [57, 58], with pronounced effects on global patterns of gene expression [52]. As such, the concept of targeting satellite repeats to develop new therapeutic approaches to the treatment of human diseases is remarkably similar to the strategies evolved by the microorganisms that produce DNA-binding antibiotics that chiefly target base composition rather than specific sequences.

More to the point, the development of diamidines used as antiparasitic drugs rests on a similar overall strategy of targeting genomes that exhibit a highly skewed base composition. The genomes of *Pneumocystis carinii* or *Plasmodium falciparum* are extraordinarily AT-rich (approximately 70% and 80% A+T content, respectively) [69], while the kinetoplast circles of trypanosomes and *Leishmania* are also highly AT-rich [70]. In this type of biological warfare using small molecules that preferentially -but not exclusively- interact with the minor groove of AT-rich sequences, the potential size of the target is clearly an important consideration. As such, diamidines might similarly exert biological effects on those portions of the genomes of higher eukaryotes that are highly AT-rich, of which satellite repeats constitute one extreme example. Alternatively, they might also serve as useful cytological tools because of their fluorescence properties when bound to DNA (W. D. Wilson *et al.*, this issue, and see below).

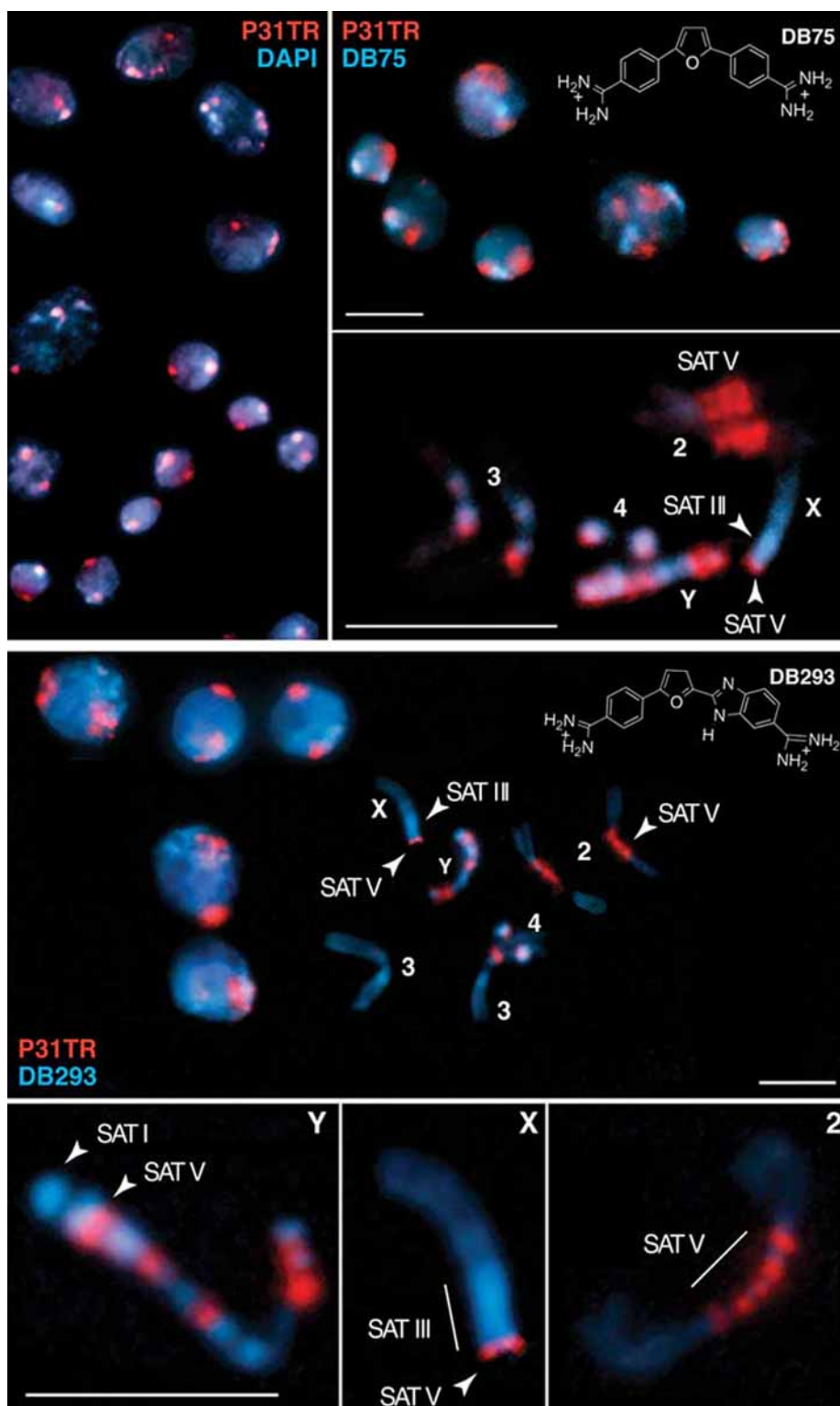


Fig. (4). Binding of diamidines to *Drosophila* nuclei and chromosomes. Fixed larval brains were stained with 2.5 μM DB75 or DB293 (blue) as shown in the photographs and counterstained with P31TR (red). A P31TR/DAPI stain is shown for comparison. Enlarged mitotic chromosomes shown in the inserts demonstrate that these diamidines preferentially recognize AT-rich satellite repeats, albeit at concentrations much higher than those used for detection by P9F (Fig. (2)). The SAT III repeats on the X chromosome and SAT V repeats on chromosome 2 and at the tip of the X are indicated. Note the strong staining of SAT III by the diamidines. Arrowheads indicate two of the several alternating blocks of SAT I and SAT V on the Y chromosome stained by DB293 and P31TR, respectively. Scale bars: 5 μm .

obvious in the enlarged chromosomes Y, X and 2 shown: the Y chromosome consists largely of alternating blocks of SAT I and SAT V (see Fig. (1)) and consequently shows an alternating red and blue staining pattern. Similarly, SAT III repeats are prominently stained on the X chromosome. Again, chromosome 2 is only weakly stained by DB293 and only shows its distinctive SAT V banded pattern revealed by P31TR staining.

As DB75 and DB293 preferentially stain SAT III repeats in *Drosophila* cells, we investigated these interactions in more detail. A major target of DB75 is trypanosome kinetoplast DNA (see W. D. Wilson *et al.*, this issue and [74]). These sequences exhibit strong intrinsic DNA curvature due to the presence of a “bending locus” of phased homopolymeric dA•dT tracts [75, 76], a characteristic shared by SAT III sequences. Fig. (5) shows a gel migration assay of a purified SAT III monomer compared to unrelated DNA

fragments of differing sizes and base composition. Note in particular the small difference in size between the SAT III and F2 fragments (359 and 326 bp, respectively). F2 (60% A+T, mostly in the form of alternating dA•dT base pairs) is not curved and migrates normally while the SAT III fragment (which contains large phased homopolymeric dA•dT tracts) is strongly retarded, with an apparent mobility of about 620 bp. Incubation with increasing concentrations of distamycin increases the mobility of the SAT III fragment but has no effect on the migration of F1 (150 bp, 45% A+T), while the migration of F2 becomes slightly retarded as a result of distamycin binding.

We performed a similar experiment with DB75 and DB293, comparing the migration of the SAT III monomer to that of linearized pUC18 vector DNA (2.7 kb). Similar to the effect of distamycin, binding of either drug to SAT III increased its mobility, although DB293 had a stronger effect.

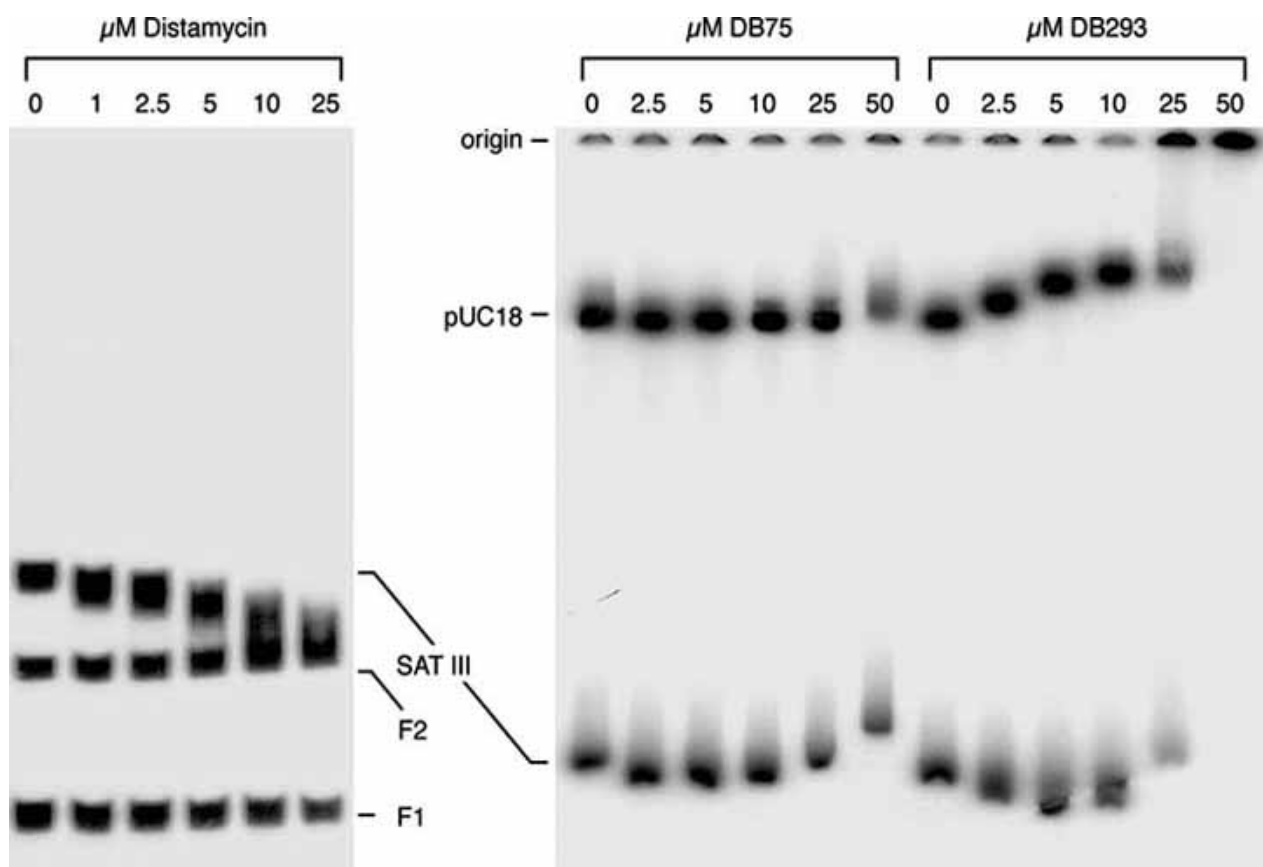


Fig. (5). Distamycin and diamidines induce conformational changes in SAT III DNA. Panel A: radiolabeled 359-bp SAT III monomer (> 65% A+T with large numbers of homopolymeric dA•dT tracts), F1 DNA (a 150-bp 45% A+T fragment) and F2 DNA (a 326-bp 60% A+T fragment containing mostly alternating dA•dT base pairs) were incubated with increasing concentrations of distamycin in the presence of a 250-fold excess of salmon sperm competitor DNA and electrophoresed on a 6% polyacrylamide gel at 4 °C. Similar to kinetoplast DNA, SAT III DNA is intrinsically curved and migrates abnormally slowly, a behavior reversed in dose-dependent fashion by distamycin. The F1 and F2 fragments are not affected or retarded by drug binding, respectively. Panel B shows a similar experiment performed with DB75 and DB293, using pUC18 plasmid vector DNA as a control. Both diamidines initially increase the mobility of the SAT III fragment, which is preferentially bound by DB75. A more pronounced effect is seen in the presence of DB293, which also binds the vector fragment but retards its migration in dose-dependent fashion. High drug concentrations result in the retardation of both SAT III and vector fragments, or their retention in the well (origin). Drug-induced conformational changes and reduction of DNA curvature might also play a role in the interaction between diamidines and kinetoplast DNA, the presumed targets of the drugs in trypanosomes and *Leishmania*.

In addition, as expected from its DNA-binding characteristics [71, 73], DB293 bound the pUC18 fragment, as inferred from its increasing retardation, an effect opposite to that on SAT III, except at high drug concentrations where both fragments became retarded or remained in the well. These results suggest that intrinsically curved SAT III and kinetoplast DNA sequences may be similarly subjected to conformational changes induced by diamidines, as has been shown to be the case for distamycin [77]. Results to be published elsewhere show that the P9 oligopyrrole exhibits similar effects on SAT III DNA.

IDENTIFYING PROTEIN TARGETS AFFECTED BY DIAMIDINE BINDING

Binding of DB75 to SAT III heterochromatin (Fig. (4)) suggests that, like P9, it may possibly interfere with protein/DNA interactions in the pericentric region of the *Drosophila* X chromosome. We recently tested this hypothesis by immunolocalizing topoisomerase II in nuclei of permeabilized larval brains that had been incubated with DB75. We chose to focus on this protein as it is crucial for the maintenance of kinetoplast DNA in trypanosomes [78] and might be affected by binding of DB75. Panel A of Fig. (6) shows the topoisomerase II pattern (red) in untreated *Drosophila* tissues counterstained with DAPI (blue). Most of the topoisomerase II signal is nucleoplasmic and is excluded from a prominent DAPI-bright spot that corresponds to chromosome 4 enriched in SAT I and SAT V repeats (see Fig. (1)). Panel B shows an identical sample counterstained with DB75 instead of DAPI after immunolocalization, yielding a similar pattern and exclusion of the protein signal from a DB75-bright spot. We found that incubation of the tissues with DB75 before fixation had a dramatic effect on the nuclear localization of topoisomerase II. Treatment with 2.5 μ M DB75 for 90 minutes resulted in a complete reversal of the protein staining pattern (panel C). In this case, topoisomerase II was found to redistribute to DB75-bright foci and was almost completely excluded from the nucleoplasm. Treatment with higher concentrations of the drug (10 μ M, panel D) resulted in the apparent expulsion of topoisomerase II from both the nucleoplasm and DB75-bright foci and its retention as a bright ring at the nuclear periphery.

While the molecular mechanisms that underlie these striking effects need to be explored further, it is clear from these experiments that furamidine binding to AT-rich regions of the *Drosophila* genome can directly influence the localization of topoisomerase II in nuclei. Such a massive redistribution is expected to have profound biological effects. It is intriguing to speculate that the consequences of diamidine binding to kinetoplast DNA or, in bulk, to AT-rich genomes of organisms such as *P. carinii* or *P. falciparum*, might similarly affect, *via* mass-action phenomena, the cellular distribution of topoisomerase II and might explain the antiparasitic activity of drugs such as DB75. One possibility is that the effects of diamidines might be readily tested by assaying the response of *white-mottled* flies to these drugs. Because diamidine binding to AT-rich satellites promotes a massive recruitment of topoisomerase II to these sites (Fig. (6)), such a relocation could affect expression of the variegating *white* gene. If it were possible to document such effects, *Drosophila* PEV might then constitute a useful and simple

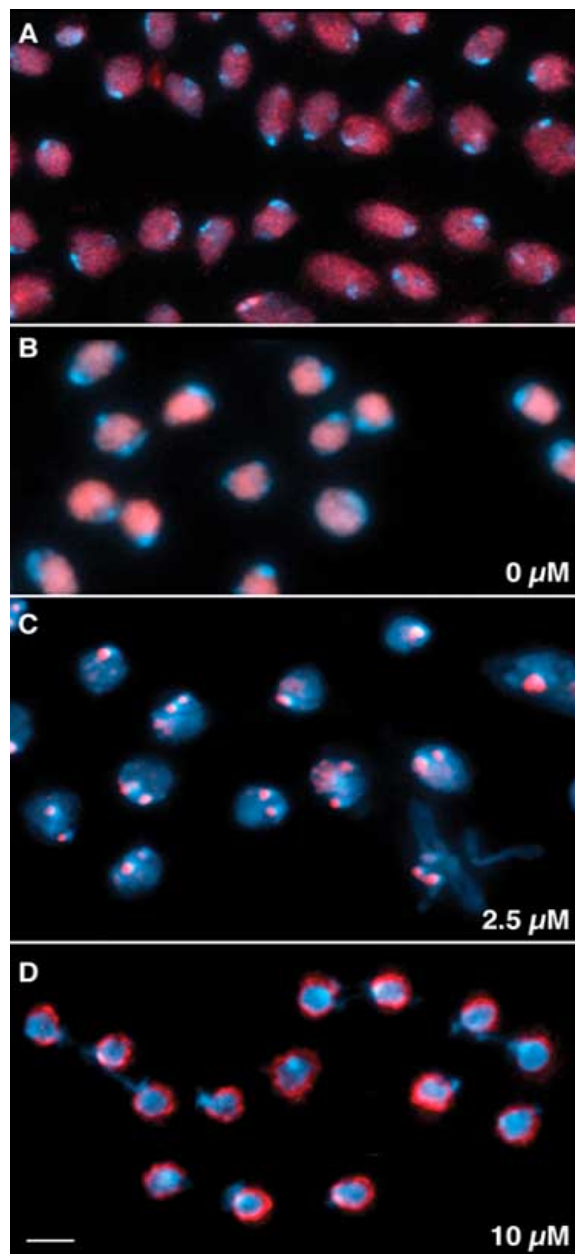


Fig. (6). Redistribution of topoisomerase II by DB75. Permeabilized *Drosophila* larval brains were incubated in the absence or presence of DB75, fixed and processed for topoisomerase II immunolocalization. Panel A shows control nuclei immunostained for topoisomerase II (red) and counterstained with DAPI (blue). Note the exclusion of the protein from DAPI-bright foci. Panel B shows similar control nuclei counterstained with DB75 (2 μ M) instead of DAPI, yielding a pattern similar to that seen in panel A. Incubation with increasing concentrations of DB75 before fixation results in a massive redistribution of topoisomerase II. Treatment with 2.5 μ M DB75 (panel C) completely reverses the localization of the protein from the nucleoplasm to the DB75-bright foci, detected here by the autofluorescence of the drug used in the incubation. Such a redistribution of the enzyme to drug-bound sequences may underlie the basic mechanism of the antiparasitic activity of DB75. Treatment with 10 μ M DB75 results in a dramatic expulsion of topoisomerase II from the nucleoplasm to the nuclear periphery (panel D). Scale bars: 5 μ m.

model system to assay the biological effects (and toxicity to the whole developing organism) of therapeutically important molecules that selectively target AT-rich sequences.

To test the feasibility of using such a system, we fed developing *white-mottled* larvae yeast paste containing 1mM DB351, a diamidine closely related to DB75. This choice was determined by the seemingly poor uptake of DB75 by larvae and a lack of observable effects in initial feeding experiments. Fig. (7) shows representative photographs of a collection of 30 control hatched *white-mottled* adult flies (top row) and of 30 flies recovered from DB351-fed *white-mottled* larvae (bottom row). Mutant *white*⁻ and wild-type flies are shown at the far left for comparison. *white-mottled*

PEV results in a range of eye-color phenotypes in individual flies, from a pale orange color with a few red spots to darker but mottled colors, of which three representative examples are shown. While this heterogeneity reappears in each succeeding generation, most *white-mottled* flies usually have the lighter eye-color phenotype (20 out of 30 flies in the example shown). In contrast, adult flies hatched from DB351-fed larvae had markedly redder eyes, the vast majority (24/30) with an eye color virtually indistinguishable from that of wild-type flies. Obviously, we cannot determine the actual intracellular drug concentrations that produce such effects but, as in the case of polyamides, it is remarkable that such crude drug feeding experiments yield measurable

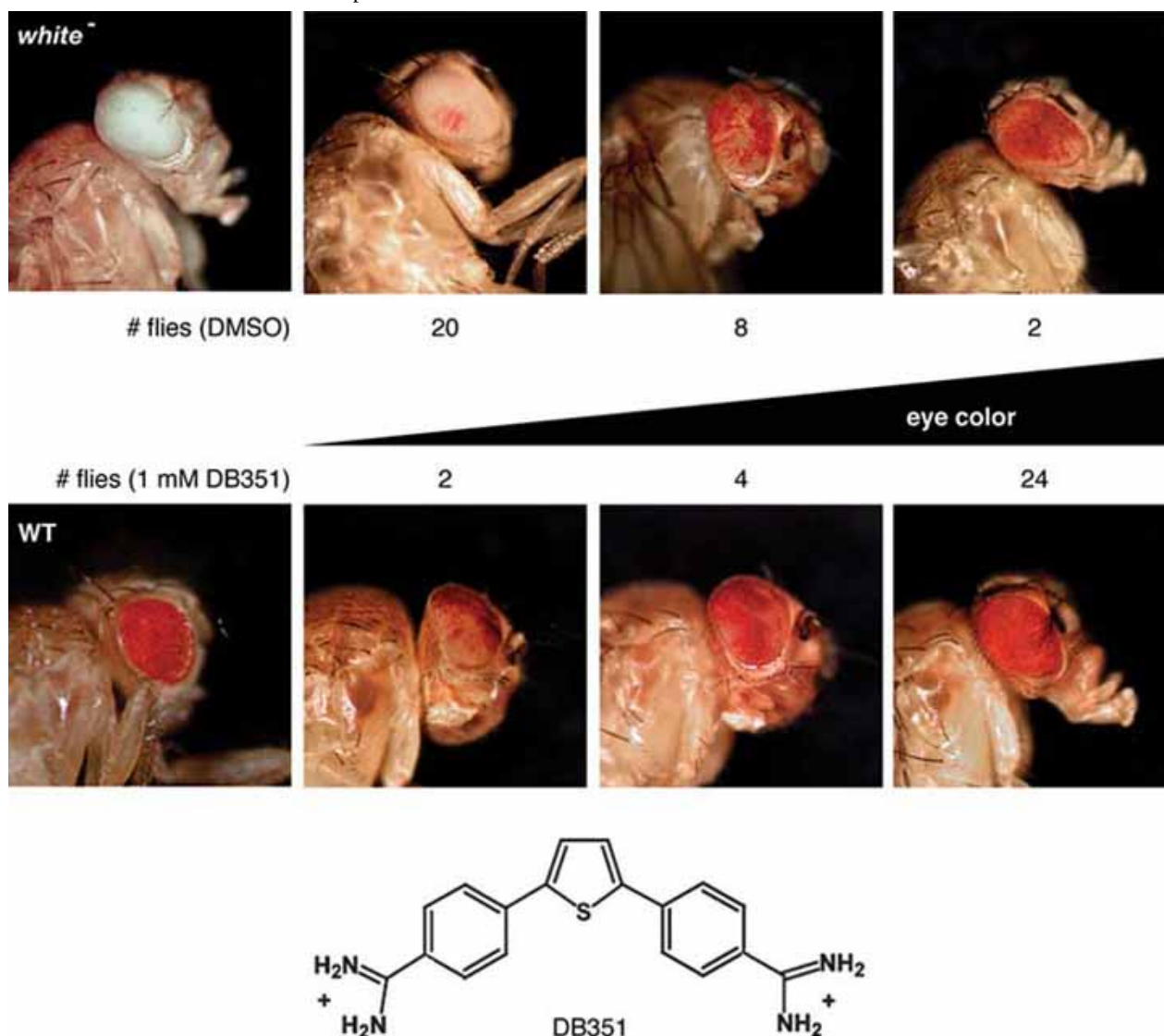


Fig. (7). Suppression of heterochromatin-mediated silencing by a diamidine. *white-mottled* larvae were fed yeast paste containing 1 mM DB351, closely related to DB75, and 1% DMSO. From the results presented in Fig. (6), drug feeding may affect topoisomerase II localization and, more generally, heterochromatin structure, during development. 30 adults that hatched from drug-fed larvae were scored for eye color and compared to 30 *white-mottled* adults that had been fed yeast paste supplemented with 1% DMSO alone. Photographs are shown for control and drug-fed larvae and illustrate the variegating phenotypes which can range from lightly colored to a darker eye color. The distribution of flies in each broad phenotypic category is indicated. DB351 induces a strong suppression of *white-mottled* PEV (80% of recovered adults with near-wild type eye color). Wild-type flies (WT) or flies mutated for the *white* gene (*white*⁻) are shown for comparison in the left-most photographs.

effects at all, and not just dead larvae (drug-induced lethality was less than 10% at 1 mM DB351).

Thus, using a system as complex as that of a developing fly, it is possible to use the DB351 diamidine at concentrations that do not give rise to significant toxicity and lethality and observe a striking gain-of-function effect correlated with the relocalization of topoisomerase II to AT-rich sequences induced by DB75, a closely related molecule. These results further support a functional role for topoisomerase II in heterochromatin assembly and in heterochromatin-mediated silencing. They also suggest a possible mechanism for the anti-parasitic activity of diamidines, providing an intriguing link between AT-binding to curved DNA and topoisomerase II localization. Diamidine binding to trypanosome or Leishmania kinetoplast DNA results in the drug-induced destruction of the kinetoplast circles. The ensuing loss of mitochondrial function, RNA editing and rRNA expression encoded by the kinetoplast maxi- and mini-circles leads to cell death. It has been suggested (W. D. Wilson *et al.*, this issue) that topoisomerase II-catalyzed reactions on kinetoplast DNA may be involved in the mechanism of action of these drugs. The massive relocalization of topoisomerase II to AT-rich diamidine-bound regions observed in the *Drosophila* system (Fig. (6)) lends support to such a hypothesis. It seems reasonable to suppose that diamidine-induced topoisomerase II redistribution might be accompanied by a significant increase in enzymatic activity at or near drug-bound sites, a hypothesis we are currently testing.

WHAT CAN WE LEARN FROM FLIES

While the biology of fruit flies is not a common topic for review in this journal, we believe that the *Drosophila* system described here can be successfully used to characterize some of the biological effects of small molecules that act on nucleic acids. In addition to polyamides and diamidines discussed here, these molecules also include the triplex-forming oligonucleotides (TFOs) whose use was pioneered by Claude Hélène and Heinz Moser ([79-82] and references therein). As a case in point, the poly-purine AAGAG/AAGAGAG repeat units of the *Drosophila* satellite V (Fig. (1)) are potentially a prime target for TFOs, a possibility currently under study in collaboration with C. Hélène's former laboratory. Most importantly, as already discussed, albeit tentatively, during the Jacques Monod conferences of 1991 and 1994, the conjugation of such sequence-specific molecules with DNA-damaging/DNA-cleaving agents [79] or topoisomerase poisons opens the way for anti-gene therapeutic approaches and much progress has been made in this area in recent years [83, 84]. A related example is that of the attachment of an Fe(II)EDTA cleaving moiety to oligopyrrole dimers, yielding molecules that are active and highly specific for DNA affinity cleavage [51].

Results reviewed above, some of which are not yet published, illustrate how synthetic polyamides and diamidines can be used as biological tools to probe the structure and function of non-coding sequences such as satellite repeats. Classical genetic or biological approaches do not lend themselves to a detailed analysis of the role of these highly repeated sequences. The "chemical" approaches discussed here demonstrate that these small molecules not only can

serve as highly specific inhibitors of DNA/protein interactions *in vivo* but can also potentially affect the localization of a nuclear protein such as topoisomerase II. The resulting biological effects (Fig. (7)) demonstrate the feasibility of using *Drosophila* satellite repeat-mediated phenomena as simple model systems to assay drug activity and toxicity. In addition, fluorescent polyamides used for the direct detection of their target satellite sequences are powerful cytological tools. Similarly, the fluorescence properties of diamidines potentially allow for the simultaneous assay of drug binding and biological effects. Taken together, these approaches can be successfully used to alter the protein composition and, presumably, the structure and function of heterochromatin in a highly selective way, with marked effects on transcriptional silencing pathways.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the CNRS and by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC grant No. 3319 to E. Käs). G. Susbielle and R. Blattes are supported by doctoral fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer and the French Ministry of Research, respectively. V. Brevet was the recipient of an ARC post-doctoral fellowship. We thank the Centre de Biologie du Développement (CBD, UMR 5547) for *Drosophila* culture facilities and the IFRG (IFR 109) confocal microscopy platform and Brice Ronsin for help with wide-field microscopy and deconvolution. We are grateful to U.K. Laemmli for generous gifts of polyamides synthe-sized in his laboratory. Christian Bailly (Institut de Recherche Pierre Fabre) encouraged us to initiate an exciting collaboration between our laboratory and David Boykin and David Wilson, whom we warmly thank for providing us with an extensive panel of diamidines and for stimulating discussions.

REFERENCES

- [1] Gniazdowski, M.; Denny, W.A.; Nelson, S.M.; Czyz, M. *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *10*, 909.
- [2] Dervan, P.B.; Edelson, B.S. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2003**, *13*, 284.
- [3] Wemmer, D.E.; Dervan, P.B. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1997**, *7*, 355.
- [4] Melander, C.; Burnett, R.; Gottesfeld, J.M. *J. Biotechnol.*, **2004**, *112*, 195.
- [5] Zimmer, C. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, **1975**, *15*, 285.
- [6] Baraldi, P.G.; Nunez Mdel, C.; Espinosa, A.; Romagnoli, R. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 231.
- [7] Hopwood, D.A. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **1988**, *235*, 121.
- [8] Bentley, S.D.; Parkhill, J. *Annu. Rev. Genet.*, **2004**, *38*, 771.
- [9] Wahnert, U.; Zimmer, O.; Luck, G.; Pitra, O. *Nucleic Acids Res.*, **1975**, *02*, 391.
- [10] Simon, H.; Wittig, B.; Zimmer, C. *FEBS Lett.*, **1994**, *353*, 79.
- [11] Boykin, D.W.; Kumar, A.; Hall, J.E.; Bender, B.C.; Tidwell, R.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 3017.
- [12] Barrett, M.P.; Burchmore, R.J.; Stich, A.; Lazzari, J.O.; Frasc, A.C.; Cazzulo, J.J.; Krishna, S. *Lancet*, **2003**, *362*, 1469.
- [13] Bouteille, B.; Oukem, O.; Bissler, S.; Dumas, M. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **2003**, *17*, 171.
- [14] Tidwell, R.R.; Boykin, D.W. In *DNA and RNA binders: from small molecules to drugs*; Demeunynck, M.; Bailly, C.; Wilson, W.D., Eds.; Wiley-VCH, **2003**; *2*, Chapter 16, pp. 414-460.
- [15] Fairlamb, A.H. *Trends Parasitol.*, **2003**, *19*, 488.
- [16] Marini, J.C.; Levene, S.D.; Crothers, D.M.; Englund, P.T. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **1983**, *47*, 279.

- [17] Marini, J.C.; Effron, P.N.; Goodman, T.C.; Singleton, C.K.; Wells, R.D.; Wartell, R.M.; Englund, P.T. *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 8974.
- [18] Drew, H.R.; Travers, A.A. *J. Mol. Biol.*, **1985**, 186, 773.
- [19] Drew, H.R. *J. Mol. Biol.*, **1984**, 176, 535.
- [20] Suck, D.; Oefner, C. *Nature*, **1986**, 321, 620.
- [21] Hart, C.M.; Laemmli, U.K. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1998**, 8, 519.
- [22] Käs, E.; Izaurralde, E.; Laemmli, U.K. *J. Mol. Biol.*, **1989**, 210, 587.
- [23] Izaurralde, E.; Käs, E.; Laemmli, U.K. *J. Mol. Biol.*, **1989**, 210, 573.
- [24] Adachi, Y.; Käs, E.; Laemmli, U.K. *EMBO J.*, **1989**, 8, 3997.
- [25] Broggin, M.; Ponti, M.; Ottolenghi, S.; D'Incalci, M.; Mongelli, N.; Mantovani, R. *Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 1051.
- [26] Dorn, A.; Affolter, M.; Muller, M.; Gehring, W.J.; Leupin, W. *EMBO J.*, **1992**, 11, 279.
- [27] Woynarowski, J.M.; McHugh, M.; Sigmund, R.D.; Beerman, T.A. *Mol. Pharmacol.*, **1989**, 35, 177.
- [28] Woynarowski, J.M.; Sigmund, R.D.; Beerman, T.A. *Biochemistry*, **1989**, 28, 3850.
- [29] Fesen, M.; Pommier, Y. *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 11354.
- [30] Käs, E.; Laemmli, U.K. *EMBO J.*, **1992**, 11, 705.
- [31] Käs, E.; Poljak, L.; Adachi, Y.; Laemmli, U.K. *EMBO J.*, **1993**, 12, 115.
- [32] Negri, R.; Costanzo, G.; Buttinelli, M.; Venditti, S.; Di Mauro, E. *Biophys Chem.*, **1994**, 50, 169.
- [33] Bell, A.; Kittler, L.; Lober, G.; Zimmer, C. *J. Mol. Recognit.*, **1997**, 10, 245.
- [34] Bartulewicz, D.; Bielawski, K.; Bielawska, A. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **2002**, 335, 422.
- [35] Reeves, R. *Environ. Health Perspect.*, **2000**, 108 Suppl. 5, 803.
- [36] Reeves, R. *Gene*, **2001**, 277, 63.
- [37] Reeves, R.; Nissen, M.S. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 8573.
- [38] Aravind, L.; Landsman, D. *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 4413.
- [39] Zhao, K.; Käs, E.; Gonzalez, E.; Laemmli, U.K. *EMBO J.*, **1993**, 12, 3237.
- [40] Reeves, R.; Beckerbauer, L.M. *Prog. Cell Cycle Res.*, **2003**, 5, 279.
- [41] Evans, A.; Lennard, T.W.; Davies, B.R. *J. Surg. Oncol.*, **2004**, 88, 86.
- [42] Farnet, C.M.; Bushman, F.D. *Cell*, **1997**, 88, 483.
- [43] Hindmarsh, P.; Leis, J. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **1999**, 63, 836.
- [44] Strauss, F.; Varshavsky, A. *Cell*, **1984**, 37, 889.
- [45] Levinger, L.; Varshavsky, A. *Cell*, **1982**, 28, 375.
- [46] Levinger, L.; Varshavsky, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79, 7152.
- [47] Lohe, A.R.; Hilliker, A.J.; Roberts, P.A. *Genetics*, **1993**, 134, 1149.
- [48] Aulner, N.; Monod, C.; Mandicourt, G.; Jullien, D.; Cuvier, O.; Sall, A.; Janssen, S.; Laemmli, U.K.; Käs, E. *Mol. Cell. Biol.*, **2002**, 22, 1218.
- [49] Ashley, C.T.; Pendleton, C.G.; Jennings, W.W.; Saxena, A.; Glover, C.V. *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 8394.
- [50] Monod, C.; Aulner, N.; Cuvier, O.; Käs, E. *EMBO Rep.*, **2002**, 3, 747.
- [51] Janssen, S.; Durussel, T.; Laemmli, U.K. *Mol. Cell*, **2000**, 6, 999.
- [52] Janssen, S.; Cuvier, O.; Muller, M.; Laemmli, U.K. *Mol. Cell*, **2000**, 6, 1013.
- [53] Henikoff, S.; Vermaak, D. *Cell*, **2000**, 103, 695.
- [54] Eissenberg, J.C.; Elgin, S.C. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2000**, 10, 204.
- [55] Elgin, S.C.; Grewal, S.I. *Curr. Biol.*, **2003**, 13, 895.
- [56] Tartof, K.D.; Hobbs, C.; Jones, M. *Cell*, **1984**, 37, 869.
- [57] Suto, R.K.; Edayathumangalam, R.S.; White, C.L.; Melander, C.; Gottesfeld, J.M.; Dervan, P.B.; Luger, K. *J. Mol. Biol.*, **2003**, 326, 371.
- [58] Gottesfeld, J.M.; Melander, C.; Suto, R.K.; Raviol, H.; Luger, K.; Dervan, P.B. *J. Mol. Biol.*, **2001**, 309, 615.
- [59] Maeshima, K.; Janssen, S.; Laemmli, U.K. *EMBO J.*, **2001**, 20, 3218.
- [60] Strick, R.; Laemmli, U.K. *Cell*, **1995**, 83, 1137.
- [61] Girard, F.; Bello, B.; Laemmli, U.K.; Gehring, W.J. *EMBO J.*, **1998**, 17, 2079.
- [62] Swedlow, J.R.; Sedat, J.W.; Agard, D.A. *Cell*, **1993**, 73, 97.
- [63] Marshall, W.F.; Straight, A.; Marko, J.F.; Swedlow, J.; Dernburg, A.; Belmont, A.; Murray, A.W.; Agard, D.A.; Sedat, J.W. *Curr. Biol.*, **1997**, 7, 930.
- [64] Adachi, Y.; Luke, M.; Laemmli, U.K. *Cell*, **1991**, 64, 137.
- [65] Maeshima, K.; Laemmli, U.K. *Dev. Cell*, **2003**, 4, 467.
- [66] Csink, A.K.; Henikoff, S. *Nature*, **1996**, 381, 529.
- [67] Dernburg, A.F.; Broman, K.W.; Fung, J.C.; Marshall, W.F.; Philips, J.; Agard, D.A.; Sedat, J.W. *Cell*, **1996**, 85, 745.
- [68] Talbert, P.B.; Henikoff, S. *Genetics*, **2000**, 154, 259.
- [69] Ginsburg, H.; Nissani, E.; Krugliak, M.; Williamson, D.H. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1993**, 58, 7.
- [70] Shlomai, J. *Curr. Mol. Med.*, **2004**, 4, 623.
- [71] Wang, L.; Bailly, C.; Kumar, A.; Ding, D.; Bajic, M.; Boykin, D.W.; Wilson, W.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 12.
- [72] Bailly, C.; Tardy, C.; Wang, L.; Armitage, B.; Hopkins, K.; Kumar, A.; Schuster, G.B.; Boykin, D.W.; Wilson, W.D. *Biochemistry*, **2001**, 40, 9770.
- [73] Wang, L.; Carrasco, C.; Kumar, A.; Stephens, C.E.; Bailly, C.; Boykin, D.W.; Wilson, W.D. *Biochemistry*, **2001**, 40, 2511.
- [74] De Souza, E.M.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; Wilson, W.D.; Hu, Q.; Boykin, D.W.; Batista, M.M.; Araujo-Jorge, T.C.; Soeiro, M.N. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, 68, 593.
- [75] Ntambi, J.M.; Marini, J.C.; Bangs, J.D.; Hajduk, S.L.; Jimenez, H.E.; Kitchin, P.A.; Klein, V.A.; Ryan, K.A.; Englund, P.T. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **1984**, 12, 273.
- [76] Wu, H.M.; Crothers, D.M. *Nature*, **1984**, 308, 509.
- [77] Radic, M.Z.; Lundgren, K.; Hamkalo, B.A. *Cell*, **1987**, 50, 1101.
- [78] Wang, Z.; Englund, P.T. *EMBO J.*, **2001**, 20, 4674.
- [79] Moser, H.E.; Dervan, P.B. *Science*, **1987**, 238, 645.
- [80] Le Doan, T.; Perrouault, L.; Praseuth, D.; Habboub, N.; Decout, J.L.; Thuong, N.T.; Lhomme, J.; Hélène, C. *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 7749.
- [81] Strobel, S.A.; Dervan, P.B. *Nature*, **1991**, 350, 172.
- [82] Strobel, S.A.; Dervan, P.B. *Science*, **1990**, 249, 73.
- [83] Seidman, M.M.; Glazer, P.M. *J. Clin. Invest.*, **2003**, 112, 487.
- [84] Nagatsugi, F.; Sasaki, S. *Biol. Pharm. Bull.*, **2004**, 27, 463.

Displacement of D1, HP1 and topoisomerase II from satellite heterochromatin by a specific polyamide

Roxane Blattes^{1,5}, Caroline Monod^{1,5},
Guillaume Susbielle¹, Olivier Cuvier^{2,7}, Jian-
hong Wu³, Tao-shi Hsieh³, Ulrich K
Laemmli⁴ and Emmanuel Käs^{1,*}

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, UMR 5099 CNRS-
Université Paul Sabatier, Toulouse Cedex, France, ²Institut de Génétique
Humaine, CNRS UPR 1142, Montpellier Cedex, France, ³Department of
Biochemistry, Nanaline H Duke Building, Duke University Medical
Center, Durham, NC, USA and ⁴Département de Biologie Moléculaire,
Université de Genève, Sciences II, Geneva, Switzerland

The functions of DNA satellites of centric heterochromatin are difficult to assess with classical molecular biology tools. Using a chemical approach, we demonstrate that synthetic polyamides that specifically target AT-rich satellite repeats of *Drosophila melanogaster* can be used to study the function of these sequences. The P9 polyamide, which binds the X-chromosome 1.688 g/cm³ satellite III (SAT III), displaces the D1 protein. This displacement in turn results in a selective loss of HP1 and topoisomerase II from SAT III, while these proteins remain bound to the adjacent rDNA repeats and to other regions not targeted by P9. Conversely, targeting of (AAGAG)_n satellite V repeats by the P31 polyamide results in the displacement of HP1 from these sequences, indicating that HP1 interactions with chromatin are sensitive to DNA-binding ligands. P9 fed to larvae suppresses the position-effect variegation phenotype of *white-mottled* adult flies. We propose that this effect is due to displacement of the heterochromatin proteins D1, HP1 and topoisomerase II from SAT III, hence resulting in stochastic chromatin opening and desilencing of the nearby *white* gene.

The EMBO Journal (2006) 0, 000–000

doi:10.1038/sj.emboj.7601125

Subject Categories: chromatin & transcription

Keywords: D1; heterochromatin; HP1; topoisomerase II;
1.688 g/cm³ satellite

Introduction

Polyamides are short polymers composed of aromatic pyrrole and imidazole amino acids that recognize specific DNA sequences with remarkable affinities (Dervan and Edelson, 2003). The use of polyamides provides an alternative approach to the study of DNA satellites (Janssen *et al*, 2000b),

which, unlike regulatory sequences of genes, are difficult to study with classical molecular biology approaches.

It was previously demonstrated that satellite-specific polyamides fed to developing *Drosophila melanogaster* can induce either gain or loss-of-function phenotypes in adult flies. One of these polyamides, P31, binds with great specificity the (AAGAG)_n repeats of the *Drosophila* satellite V (SAT V) (Janssen *et al*, 2000b). P31 was found to induce well-defined homeotic transformations in a *brown-dominant* genetic background that are akin to mutations of the gene encoding GAGA factor (GAF) (Janssen *et al*, 2000a). The effect of P31 was proposed to be mediated by a redistribution of GAF from its euchromatin-binding sites, where this protein acts as a positive transcription activator to SAT V. The homeotic phenotype is then explained by a reduced availability of GAF for gene expression. In contrast, a gain-of-function phenotype was induced by the P9 polyamide. P9 specifically targets the AT-rich satellites SAT I (AATAT)_n and, presumably, SAT III (density 1.688 g/cm³), which is composed of 359-base pairs (bp) repeats. It was observed that feeding P9 to *white-mottled* (*w^{m4}*) larvae suppressed the position-effect variegation (PEV) phenotype in adult flies. The *w^{m4}* fly strain contains a chromosomal inversion that places the *white* gene near the centric heterochromatin of the X chromosome, which harbors the rDNA repeats and the enormous 11-Mbp SAT III array (Lohe *et al*, 1993). PEV is thought to arise through heterochromatin-mediated silencing of the juxtaposed *white* gene (for a review, see Huisinga *et al*, 2006). It was proposed that suppression of PEV by P9 (increased expression of the *white* gene) acts through chromatin opening of SAT III and a subsequent reduction of silencing effects on the nearby *white* gene. This paper aims to dissect the biological effect of P9 by examining the biochemical composition of SAT III using a combination of *in vivo* and *in vitro* experiments.

D1 is an essential protein ubiquitously expressed throughout *Drosophila* development (Aulner *et al*, 2002) containing 10 copies of the AT hook motif, a DNA-binding domain that interacts with the minor groove of AT-rich DNA (Reeves and Nissen, 1990). D1 is associated with SAT I and SAT III repeats. Related to D1 is the artificial MATH20 protein that contains 20 AT hook motifs and, as D1, is expected to bind SAT I and SAT III. Overexpression of D1 enhances *w^{m4}* PEV (Aulner *et al*, 2002), while overexpression of MATH20 suppresses it (Girard *et al*, 1998). To explain these opposing effects, it was suggested that D1 increases, while MATH20 reduces, silencing effects mediated by SAT III (Monod *et al*, 2002). In contrast, overexpression of a D1 transgene carrying a deletion of its C-terminal domain (D1ΔE) suppresses *w^{m4}* PEV, an effect similar to that of MATH20. Because D1ΔE behaves as a dominant negative mutation of D1, we proposed that the C-terminal domain of D1 might serve to recruit proteins required for heterochromatin assembly to SAT I and SAT III.

*Corresponding author. LBME, UMR5099, IBCG, 118 route de Narbonne,
31062 Toulouse Cedex 9, France. Tel.: +33 561 335959;
Fax: +33 561 335886; E-mail: kas@ibcg.biotoul.fr

⁵These authors contributed equally to this work

Received: 21 October 2005; accepted: 11 April 2006

Heterochromatin protein 1 (HP1) is a well-characterized structural and functional component of heterochromatin. Binding of HP1 to heterochromatin occurs through the specific recognition of histone H3 methylated at the lysine 9 position by the chromo domain of HP1. Mutations in the gene encoding HP1 or in the genes that encode the histone deacetylase and methyl transferase activities required for the creation of an HP1-binding site suppress *w^{m4}* PEV (for a review, see Huisinga *et al*, 2006). The interplay between these proteins provides a rationale for the assembly and propagation of heterochromatin, which might involve other proteins as well.

Topoisomerase II (topo II) might conceivably be implicated in *w^{m4}* PEV as it is prominently associated with centric heterochromatin and SAT III repeats, as demonstrated by *in vivo* cleavage (Käs and Laemmli, 1992) and localization studies (Swedlow *et al*, 1993). Topo II is a DNA topological handler that relaxes positively and negatively supercoiled DNA and mediates DNA strand passage during catenation/decatenation reactions. Previous studies established that topo II is required for the segregation and assembly of mitotic chromosomes (Adachi *et al*, 1991). Hence, this enzyme may perhaps play roles in heterochromatin and chromosome structure, in addition to its enzymatic function.

One possibility is that D1 might help to recruit HP1 and topo II to AT-rich satellites and we explore here the mechanism whereby P9 exerts suppression of the *w^{m4}* phenotype. Using an immunofluorescence approach, we show that P9 mediates the displacement of D1 from SAT I and SAT III *in vivo* and *in vitro*. Moreover, P9 also specifically displaces HP1 and topo II from SAT III, while these proteins remain bound to other genomic sites that are not targeted by P9. Conversely, targeting SAT V repeats with the P31 polyamide results in the selective displacement of HP1 from these sites, supporting the hypothesis that HP1 association with chromatin involves a direct DNA-binding component. We propose that the suppression of the *w^{m4}* phenotype by P9 is mediated by displacement of D1, HP1 and topo II from SAT III. To refine our analysis, we studied the effect of topo II inhibitors on *w^{m4}* flies and we show that feeding VM26, a topo II poison, to *w^{m4}* flies also results in suppression of *white-mottled* PEV, supporting a structural and/or functional role for this enzyme in heterochromatin-mediated silencing.

Results

Specificity of DNA-binding polyamides for different *Drosophila* satellites

Previous studies established that the satellite-specific polyamides, P9 and P31, fed to developing flies induce gain or loss-of-function phenotypes, respectively. The binding properties and the biological effects of these polyamides are recapitulated in Supplementary Table I and discussed below.

P31: This compound is known to bind with impressive specificity the (AAGAG)_n repeats of satellite V (SAT V) as determined by footprinting and fluorescence microscopy. P31TR, a derivative labeled with Texas red, was demonstrated to bind to the chromocenter of polytene chromosomes and to the 1.7-Mbp (AAGAG)_n repeats inserted in the *brown-dominant* allele of the *brown* gene (Janssen *et al*, 2000b). This analysis was extended here to high resolution using mitotic chromosomes obtained from larval neuroblasts (Figure 1A).

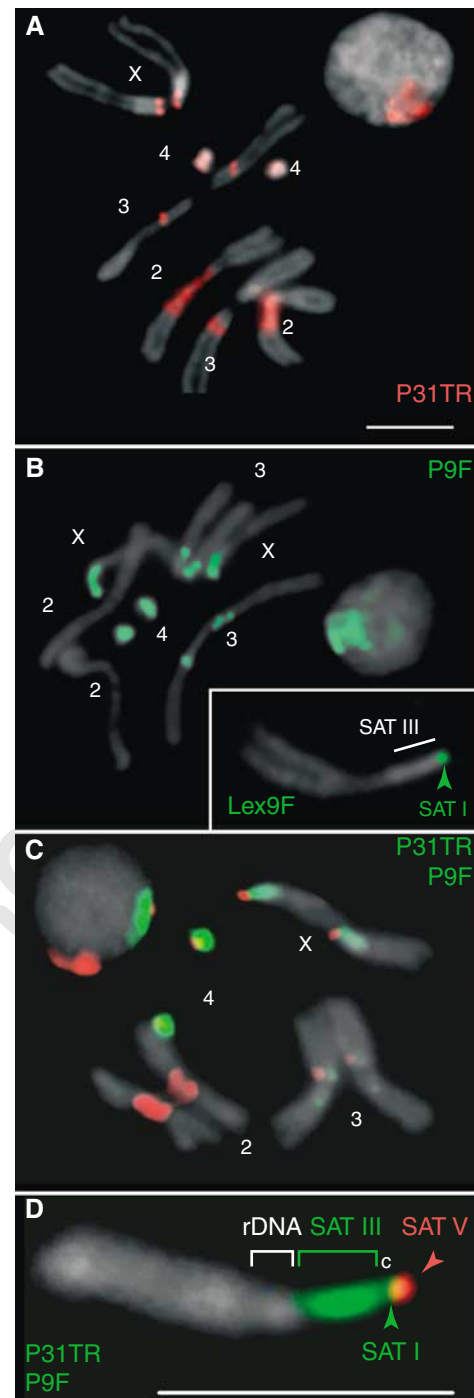


Figure 1 Localization of satellites in diploid cells using fluorescent polyamides. (A–D) Brains dissected from female third-instar larvae were fixed and stained using fluorescent polyamides and counterstained with DAPI (gray). The properties of the drugs are described in Supplementary Table I. P31TR (A) detects satellite V, P9F (B, D) satellites III and I, Lex9F (inset in B) satellite I. SAT I, III and V maps are diagrammed in Figure 4G below. A sample double-stained with P9F and P31TR is shown in (C). The localization of satellite and rDNA repeats is shown for a magnified X chromosome double-stained with P9F and P31TR (D; c: centromere). Scale bars: 5 μm.

This panel localizes SAT V repeats to pericentric regions on chromosomes 2, 3 and 4 and to the very tip of the X chromosome. Figure 1A also includes a nucleus, where the signal is well confined to the SAT V repeats congregated in the chromocenter.

P9: This oligopyrrole is specific for AT-rich satellites and, when fed to developing w^{m4} flies, suppresses the *white-mottled* PEV phenotype (Janssen *et al*, 2000a). The biological effect of P9 is most likely exerted through binding to the alpha-like satellite III (SAT III), the major satellite juxtaposed to the inverted *white* gene of w^{m4} flies. This notion was examined further here by microscopy of spread mitotic chromosomes stained with the fluorescein-labeled derivative P9F. Figure 1B shows that P9F strongly stains the large (11 Mbp) SAT III abutting the centromere of the X chromosome (see also the enlarged X chromosome in panel D). P9F also detects SAT I (AATAT)_n repeats throughout chromosome 4 and related repeats on either side of the centromere of chromosome 3, as well as a short array of SAT I repeats near SAT V (red) on the X chromosomes (Figure 1D). The order of satellites from the tip of the X chromosome to the rDNA locus is SAT V, SAT I and SAT III, as shown in panel D. These assignments are based on staining with Lex9F (inset Figure 1B) and co-staining with P31TR and P9F (Figure 1C). Lex9F (see Supplementary Table I) is a dimeric oligopyrrole that prefers interaction with long (>W9) AT-rich runs. Hence, Lex9F serves to distinguish between the (AATAT)_n repeats of SAT I and the shorter AT-runs of SAT III, which it does not bind (inset panel B). These results are in excellent agreement with previous satellite mapping data (Lohe *et al*, 1993) and are summarized in Figure 4G below.

The main aim of this report is to elucidate the molecular basis of the gain-of-function phenotype mediated by P9. We proposed that P9 reduces the heterochromatin state of SAT III, presumably as a result of protein displacement. This proposal is explored here, using an experimental approach where polyamides serve two functions: (a) fluorescent derivatives are used to localize the DNA satellites in fixed material (Figure 1) in combination with immunostaining studies and (b) to act as 'drugs' *in vivo* and *in vitro* so as to affect the biochemical composition of heterochromatin.

D1 binds SAT I and SAT III: P9-mediated displacement of D1 *in vitro*

The D1 protein is associated with SAT I and SAT III repeats and overexpression of D1 enhances PEV of w^{m4} flies. Figure 2A shows that the immunosignal of D1 (red) colocalizes with the pattern of P9F staining (green, panel B and merged in panel C). Hence, D1 binds SAT I and SAT III repeats in interphase and metaphase chromatin.

We explored whether the biological effect of P9 on PEV might arise by displacement of D1. This notion was first studied *in vitro* with gel retardation/competition experiments. Figure 3A shows that binding of purified D1 to a 359-bp SAT III monomer generates a ladder of retarded complexes reflecting increased binding of D1 (Figure 3A, lanes 1–4). In contrast to D1, addition of P9 (MW=962) resulted in faster migrating complexes (lanes 5–9), due to unbending of the curved SAT III fragment, although retardation was seen at the highest P9 concentration tested (500 nM, lane 10).

Figure 3B establishes that P9 dissociates D1/SAT III complexes *in vitro*. Examination of panel B shows that the D1/SAT III ladder diminishes in a concentration-dependent manner upon addition of P9 (compare lanes 5–7, 8–10 and 11–13 with lanes 2–4). This is accompanied by an increase in the mobility of the free DNA and protein-bound fragments in-

dicative of P9 binding. This displacement reaction was independent of the order in which P9 and D1 were added (data not shown). Taken together, these results demonstrate that P9 oligopyrrole binds SAT III repeats *in vitro* and displaces the D1 protein bound to these sequences.

DNAse I footprinting experiments demonstrate that the competition between P9 and D1 is the result of nearly identical DNA-binding properties. Figure 3C (lanes 2–5) shows that P9 primarily protects stretches of dA·dT base pairs (W7–W14) of the SAT III repeat from DNAse I digestion. These tracts are also the main interaction sites for D1 (Figure 3D and E). Although both ligands bind similar sequences, some minor differences can be noted, as is manifested by the greater affinity of P9 for longer dA·dT tracts. A similar experiment performed with the artificial MATH20 protein yielded a footprint similar to that of P9 or D1 (lanes 5–7 of panel E). These interaction results are graphically summarized in Figure 3F.

In vivo displacement by P9 of D1 from SAT I and III in embryos

We tested whether P9 displaces D1 from SAT III *in vivo* by exposing whole embryos at the cellular blastoderm stage to this compound. Panels D–F of Figure 2 show that P9 induces a dose-dependent decrease of the D1 immunosignal in the chromocenter of nuclei. In untreated embryos, D1 (red) was found to localize predominantly to two foci in each nucleus (panel D) that correspond to SAT I and SAT III as verified by P9F binding (not shown). Exposure of embryos to 10 μ M P9 (panel E), however, led to a loss of D1 from some but not all foci, typically resulting in the detection of only one D1-positive region in each nucleus. This displacement of D1 was essentially complete at the highest drug concentration tested (50 μ M, panel F). These results extend our *in vitro* competition experiments and demonstrate that P9 displaces D1 from AT-rich satellite repeats *in vivo*.

D1 displacement from chromosomes of eye disks *in vivo*

The displacement of D1 was studied in more detail on mitotic chromosomes from eye imaginal disks isolated from P9-fed larvae. As shown above for neuroblast chromosomes (Figure 2A), the immunosignal of D1 is also predominantly confined to SAT III and SAT I in eye disk chromosomes isolated from control larvae (no P9, Figure 2G). In contrast, panels H and I show that D1 is displaced if larvae were fed yeast paste containing 100 μ M P9. While displacement by P9 of D1 from SAT III was complete (panel H), we observed a stochastic loss of D1 from SAT I in about 20% of the examined mitotic spreads. Panel I shows such an example, where D1 was completely displaced from both SAT I and III repeats. This experiment shows that P9 displaces D1 from chromosomes isolated from eye disks, where the suppression of w^{m4} PEV is exerted.

The above experiments were carried out with large amounts of P9. As our polyamide supply is very limited, we used permeabilized larval brains in the following experiments, where lower concentrations can be used. Squashes of larval brains also have the advantage that they yield mitotic chromosome spreads of excellent quality (Figure 2A–C). As shown in panels J–M of Figure 2, the displacement of D1 in permeabilized brains occurs at a much lower P9 concentration. Notably, we observed that a P9 concentration of 250 nM

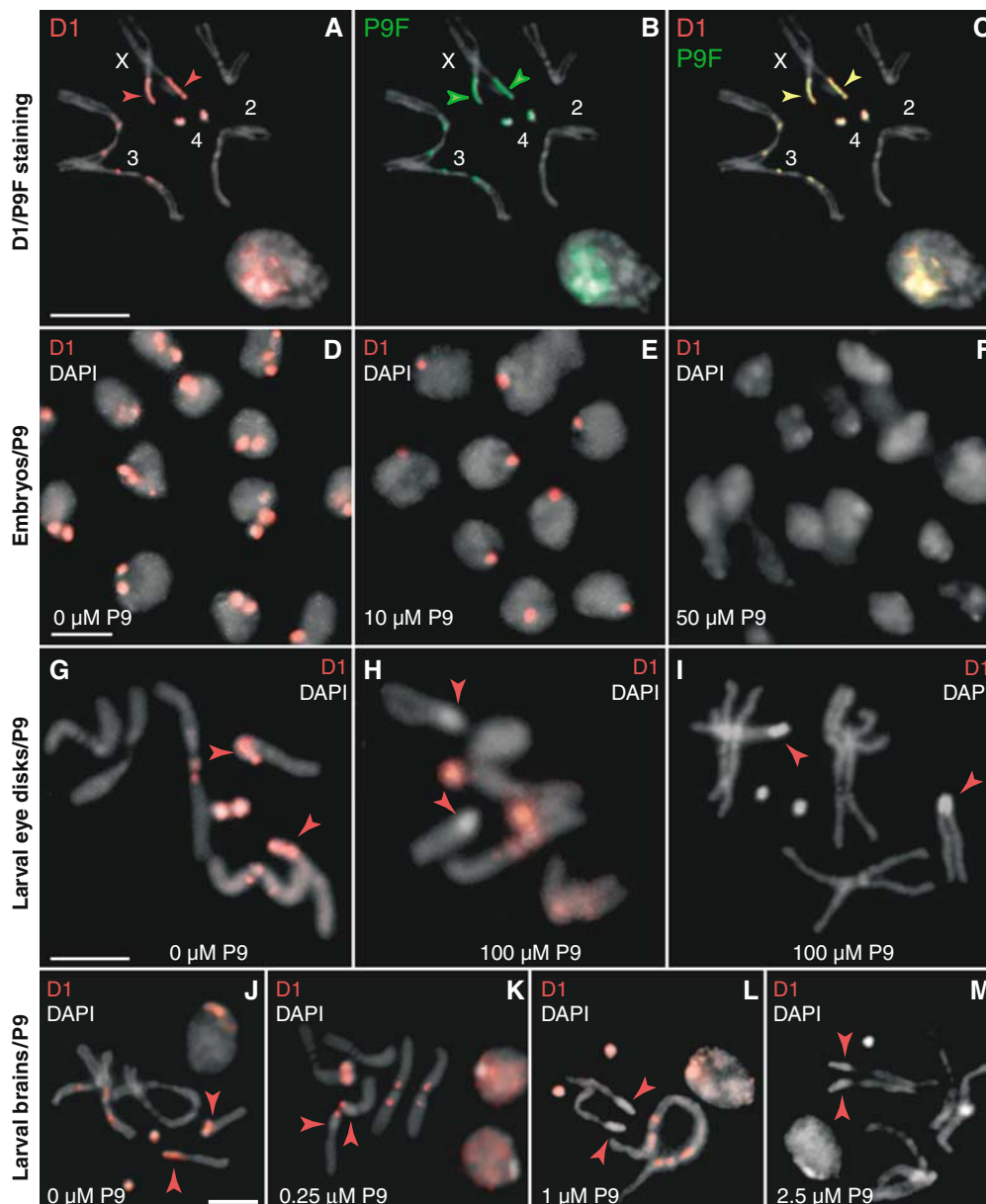


Figure 2 Uptake of oligopyrroles by whole embryos and larvae and displacement of D1. (A–C) Larval neuroblast nuclei and mitotic chromosomes stained with an antibody against D1 (red) and P9F (green) and counterstained with DAPI (gray). (D–F) Cellular blastoderm embryos were treated with 0, 10 or 50 μ M P9, immunostained for D1 (red) and mounted in DAPI (gray). Treatment with 10 μ M P9 results in a partial loss of the D1 signal, which is complete at 50 μ M P9. (G–I) Third-instar larvae were fed colchicine (100 μ g/ml) and P9 (0 or 100 μ M) to assess displacement of D1 (red signal) from SAT I and SAT III repeats on mitotic chromosomes from eye imaginal disks. Arrowheads indicate the position of SAT III repeats, as determined by P9F staining (not shown). (J–M) The D1 signal in permeabilized larval brains treated with 0, 0.25, 1 or 2.5 μ M P9, respectively. Merged DAPI (gray) and D1 (red) signals are shown. Arrowheads show the DAPI-bright SAT III array on the X chromosome. Scale bars: 5 μ m.

suffices to displace D1 from SAT III (panel K, red arrowheads), while higher concentrations (1–2.5 μ M) are required to evict D1 from SAT I (panels L and M).

P9 displaces HP1 from SAT III but not from rDNA repeats

The possible implication of HP1 in the suppression of *w^{m4}* PEV by P9 was also studied. Figure 4A shows that HP1 (red) is bound to the pericentric regions of mitotic chromosomes, with a predominant association with SAT III and SAT V repeats of chromosomes X and 2, respectively. In contrast, the HP1 immunosignal is undetectable on the SAT I repeats on chromosomes 4 and Y (not shown) and at the tip of the X

chromosome. It is important to note that Lex9F was used to counterstain these panels of Figure 4, as it serves to highlight SAT I (not SAT III) repeats that remain green since their HP1 immunosignal remains undetectable (panel A). This conclusion is also supported by an examination of the staining pattern of interphase nuclei. The inset of panel A shows the intense HP1 staining of SAT V and partial staining of the SAT III chromocenter (yellow), while HP1 is excluded from a region (green) that also harbors SAT I repeats.

Careful inspection of the HP1 immunosignal over the X chromosome at higher magnification (panel B) shows that its signal extends from the rDNA repeats to the adjacent SAT III

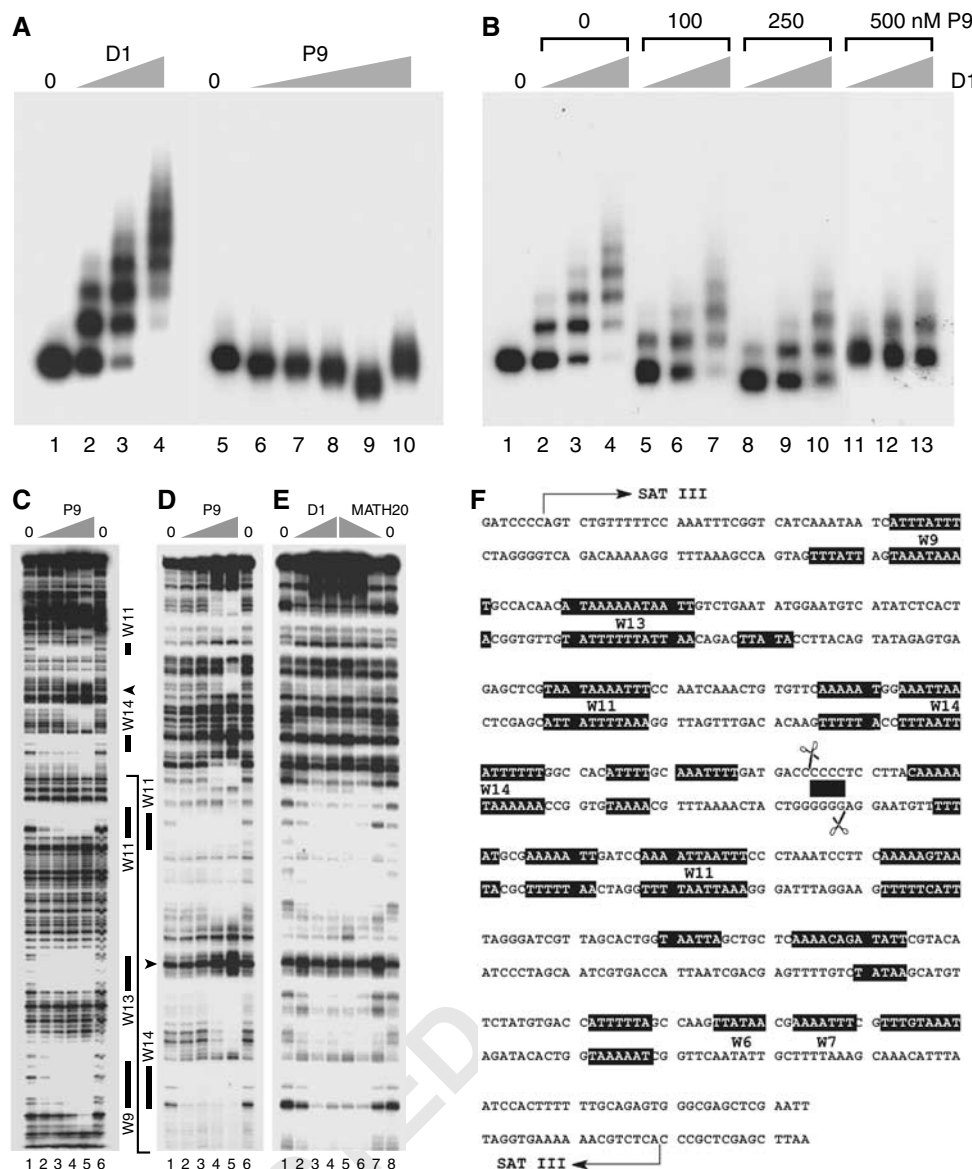


Figure 3 The P9 oligopyrrole competes with D1 for binding to SAT III repeats *in vitro*. **(A)** A SAT III monomer was incubated with 2, 5 or 10 ng D1 (2.7, 6.75 and 13.5 nM, lanes 2–4) or P9 (25, 50, 100, 250 or 500 nM, lanes 6–10). No-protein controls are shown in lanes 1 and 5. **(B)** SAT III was incubated with 1, 5 or 10 ng D1 (1.35, 6.75 or 13.5 nM) in the presence of 0, 100, 250 or 500 nM P9 as shown above the gel. Lane 1 contained no protein. The displacement of D1 by the drug is almost complete at 500 nM P9 (lanes 11–13). **(C)** SAT III monomer DNA 3'-end labeled on the lower strand was incubated with 0 (lanes 1 and 6) or 50, 100, 250, 500 nM P9 (lanes 2–5) and digested with DNase I. Solid bars denote regions protected from digestion at the lowest P9 concentrations used and correspond to the largest dA·dT tracts (W) of SAT III (W6/W7–W14, where the number denotes the number of dA·dT bp). Note that only W tracts that are clearly resolved on the gels shown are indicated. The arrowhead indicates a P9-induced hypersensitive site. Binding of the same concentrations of P9 to SAT III **(D)** was compared to that of D1 and MATH20 **(E)**. Lanes 2–4 of panel **(E)** correspond to 2, 5 and 10 ng D1 (2.7, 6.75 and 13.5 nM), while lanes 5–7 contained 2.5, 1.5 and 0.5 ng MATH20 (1.5, 0.9 and 0.3 nM). Lanes 1 and 8 are no-protein controls. The solid line starting at the bottom of **(D)** indicates the SAT III region shown on these gels relative to **(C)**. These results are summarized on the sequence of a SAT III monomer shown in **(F)**. Filled boxes indicate the regions protected by binding of D1, MATH20 and P9. Scissors indicate the sequence cleaved by topoisomerase II *in vivo* (Borgnetto *et al*, 1996), the filled box corresponds to the four consecutive dC·dG bp located within the staggered cut. This region spans the P9-induced DNase I-hypersensitive site and is not bound by D1 or MATH20.

array, where staining reproducibly appears in the form of a gradient that diminishes toward the centromere. In contrast to the binding of HP1 to the SAT III and rDNA repeats, the immunosignal of D1 shown for comparison is restricted to the centromere-proximal region of SAT III and only partially overlaps with HP1 (panel C).

Panels D and E of Figure 4 show that P9 selectively displaces HP1 from SAT III repeats, but not from the rDNA array. This conclusion is best noted on the enlarged X

chromosomes shown in panel E. This micrograph shows the green Lex9F stain of SAT I at the chromosomal tip and the red immunosignal of HP1 over the rDNA repeats, while the SAT III region remains unstained (gray). Hence, following treatment with P9, HP1 is delocalized from the SAT III repeats, but remains associated with the rDNA array. Examination of panel D demonstrates that, in contrast, the protein remains prominently associated with SAT V repeats on chromosome 2. The nuclei shown in panel D also confirm

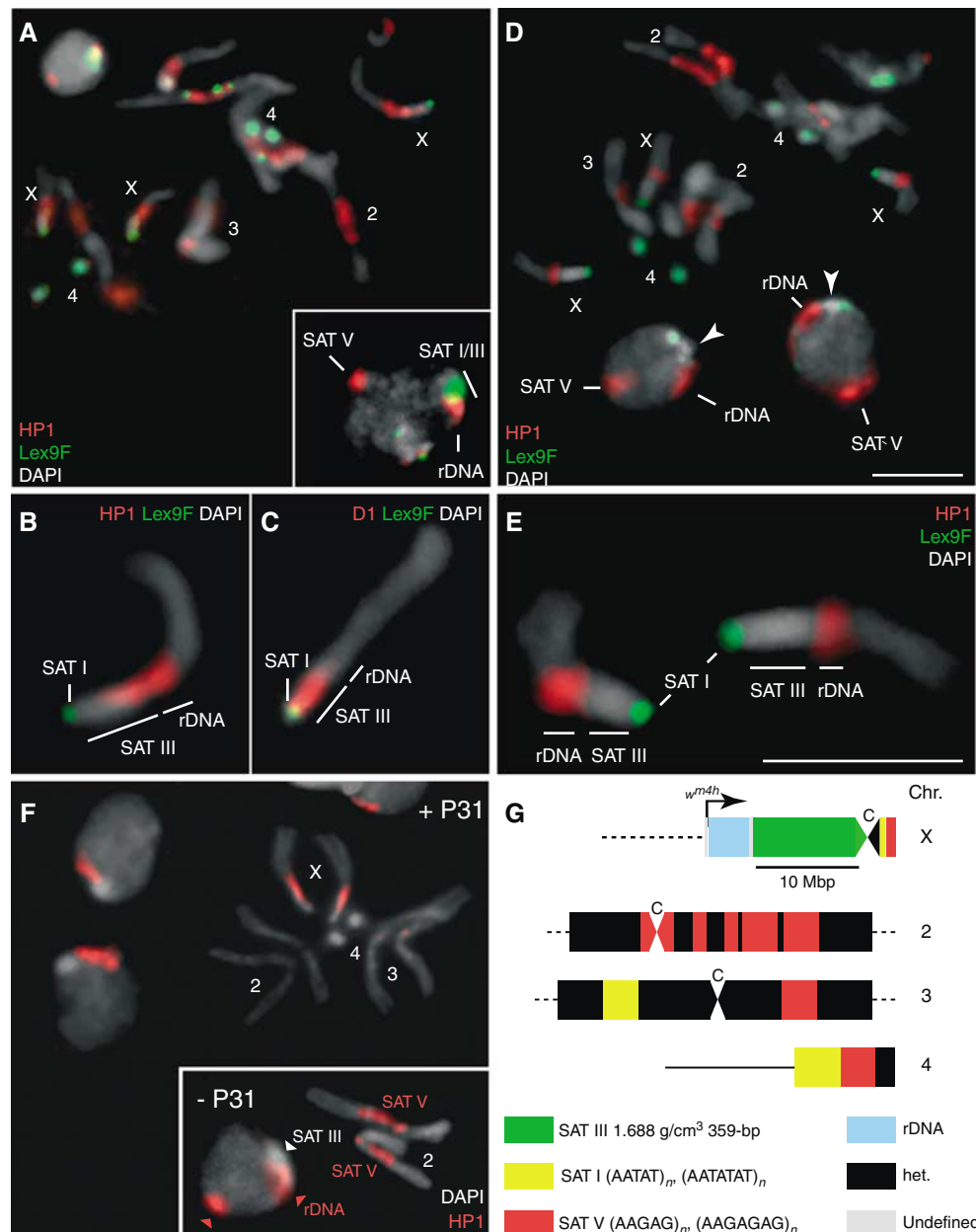


Figure 4 D1 Displacement results in a selective loss of HP1. (A) Localization of HP1 (red) in interphase nuclei and mitotic chromosomes of female diploid larval neuroblasts. Samples were counterstained with Lex9F (green) and DAPI (gray). The inset shows a similarly stained interphase nucleus. A region that stains strongly for HP1 alone corresponds to SAT V repeats on chromosome 2, as assessed by P31TR staining (not shown). rDNA repeats are indicated. (B, C) Magnified X chromosomes after staining for HP1 or D1 (red), respectively, and counterstaining with Lex9F (green) and DAPI (gray). (D–E) Localization of HP1 (red) after treatment with 2.5 μ M P9. Magnified X chromosomes are shown in (E). Samples were counterstained with Lex9F (green) and DAPI (gray). In (D), arrowheads indicate the HP1-depleted DAPI-bright region that corresponds to SAT III repeats in interphase nuclei after treatment with P9; SAT V repeats on chromosome 2 are also indicated. (F) The localization of HP1 following treatment with P31. The inset shows untreated chromosomes 2 and a nucleus with the SAT V-associated HP1 signal (arrowhead). A general representation of major satellite blocks is schematized in (G), which also shows the approximate location of the *white* gene on a *w^{m4}* X chromosome, within a type I insertion sequence characteristic of some rDNA repeats. ‘C’ denotes the centromere. Scale bars: 5 μ m.

this conclusion. In this case, the loss of HP1 from SAT III is reflected by the appearance of a green–gray–red pattern over the chromocenter, corresponding to the SAT I, SAT III and rDNA repeats, respectively, while the strong HP1 association site on SAT V repeats is unaffected.

We tested next the sensitivity of HP1 binding to chromatin to treatment with the P31 polyamide. As shown in the inset of Figure 4F, HP1 is prominently associated with SAT V repeats on chromosome 2. Incubation with P31 led to a selective

displacement of HP1 from the pericentric region of chromosome 2, without affecting the association of the protein with SAT III and rDNA repeats on the X chromosome. We conclude from these results that HP1 can be targeted by polyamides in a sequence-specific fashion that reflects the selectivity P9 and P31 for SAT III and SAT V, respectively. This suggests that the association of HP1 with satellites repeats may occur, at least in part, via sequence DNA recognition (Zhao *et al*, 2000; Perrini *et al*, 2004).

HP1 delocalization results in the invasion of rDNA repeats by D1

The displacement of HP1 from SAT III repeats might be due to direct competition with P9, predicting that D1 and HP1 may compete for binding to SAT III. Displacement of HP1 from heterochromatin should then result in additional D1 binding to sites normally occupied by HP1. We tested this possibility by feeding a histone deacetylase inhibitor to growing third-instar larvae. Treatments with trichostatin A (TSA) have been shown to result in the delocalization of HP1 from heterochromatin (Taddei *et al*, 2001). Figure 5A shows the HP1 and D1 localization patterns normally observed in larval neuroblast nuclei. HP1 (red) partially associates with SAT III repeats stained with P9F (green) as well as with SAT V repeats and is largely absent from the nucleoplasm. The localization of D1 is strictly correlated with P9F-positive foci, which correspond to SAT I and SAT III repeats. TSA feeding resulted in a loss of HP1 from heterochromatin and a relocalization of the protein to the nucleoplasm (Figure 5B). Significantly, this displacement was accompanied by an ex-

tension of the D1 signal: instead of colocalizing with P9F-positive foci, yielding a characteristic yellow signal (Figure 5A), the D1 antibody also stained an immediately adjacent region, yielding both red and yellow signals. The red-only domain occupied by D1 after TSA treatment corresponds to the rDNA repeats normally associated with HP1 (data not shown and see below).

SAT III protein composition affects the white gene across the rDNA repeats

The delocalization of D1 and HP1 from SAT III repeats by P9 correlates with suppression of w^{m4} PEV. However, as the inverted *white* gene lies near the centromere-distal end of the rDNA repeats (see Figure 4G), this effect must somehow be transduced across the 3.5-Mbp rDNA locus. How satellite protein composition can affect gene expression over such distances is an important question, which we addressed by performing fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments. Hybridization of rDNA and *white* probes to neuroblast nuclei and chromosomes resulted in well-defined signals. The

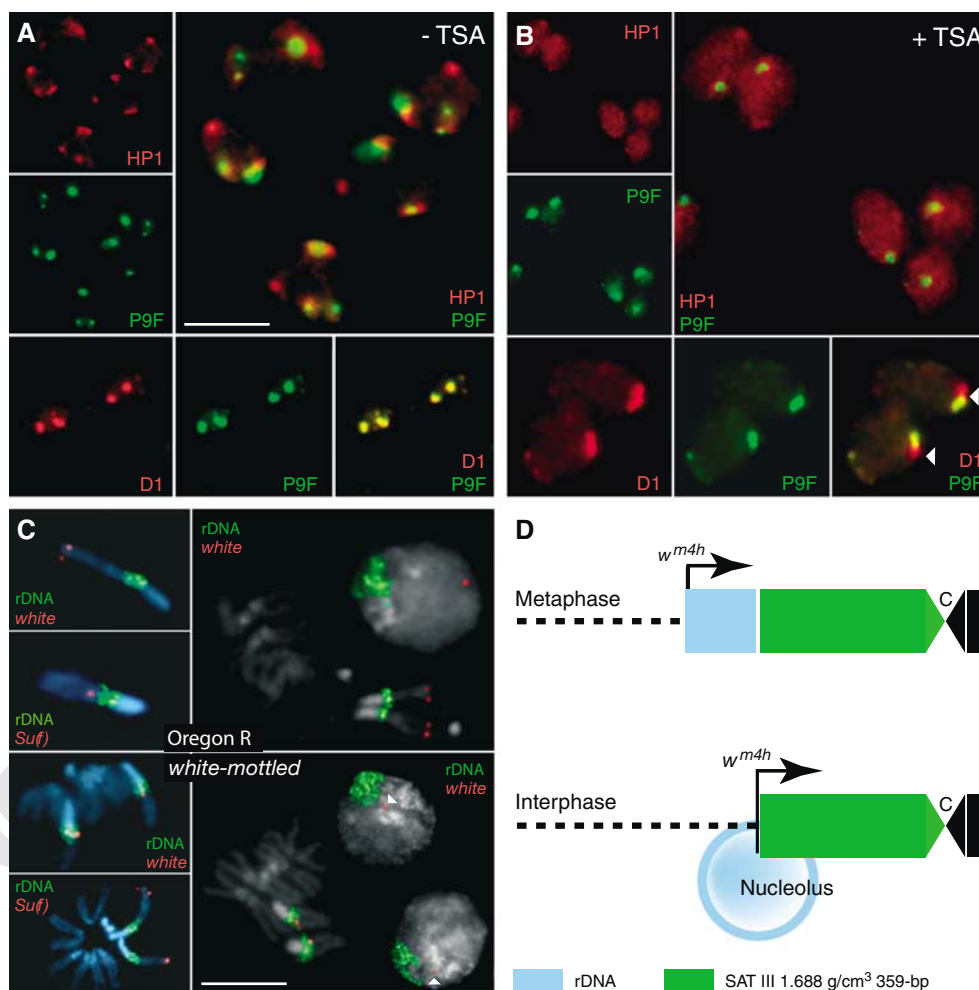


Figure 5 SAT III and rDNA repeats define alternative D1 and HP1 domains. Neuroblasts from control (A) or TSA-fed (B) third-instar larvae were immunostained for HP1 or D1 (red) and counterstained with P9F (green). Individual and merged signals are as indicated in the photographs. TSA feeding induces a delocalization of HP1 to the nucleoplasm and an extension of the D1 signal from SAT III to an adjacent P9F-negative region that corresponds to the rDNA repeats. (C) The results of FISH experiments performed with *white* and *Su(f)* probes (red) or a full-length rDNA probe (green). Photographs at the top and bottom show results obtained from wild-type Oregon R or w^{m4} neuroblasts, respectively. Arrowheads indicate the *white* signal detected in interphase nuclei. Scale bars: 5 μ m. (D) The juxtaposition of the rDNA-linked *white* gene to SAT III repeats as a result of looping out of rDNA sequences in the nucleolus.

Suppressor of forked gene (*Su(f)*), which maps to the heterochromatin region of the X chromosome and is distal to the rDNA repeats, was used as a control. The insets of Figure 4C show hybridization signals for rDNA (green) and *white* or *Su(f)* sequences (red) on X chromosomes from Oregon R (wild-type) or *white-mottled* larvae, clearly showing the inversion of the *Su(f)* and *white* genes on *w^{m4}* X chromosomes. In this case, the *white* gene could not be resolved from the rDNA repeats, consistent with its localization within type I insertion sequences located at the distal end of the rDNA locus (Schotta *et al*, 2003). In interphase nuclei, the *white* signal in wild-type cells was always localized at the opposite pole of the nucleus relative to rDNA repeats. Significantly, in contrast to the close linkage seen in mitotic chromosomes, the *white* signal was always well resolved from the rDNA repeats in *w^{m4}* interphase nuclei, localizing instead immediately adjacent to DAPI-bright foci that correspond to SAT III repeats. As diagrammed in Figure 5D, these results support a model whereby looping out of rDNA sequences within the nucleolus places the *white* gene very close to the SAT III repeats where the effects of P9 are exerted.

SAT III-specific displacement of topo II by P9

Topo II is one of the growing numbers of proteins found to be associated with centric heterochromatin. This association is particularly evident in immunofluorescence studies of prophase and mitotic chromosomes, where the topo II signal contains conspicuous centromeric foci in addition to axial, subchromosomal extensions (Maeshima and Laemmli, 2003). While topo II appears clearly enriched in centric heterochromatin of mitotic chromosomes, an important association with heterochromatin is also noted in interphase nuclei. This interaction was previously noted by the prominent cleavage of SAT III repeats by topo II *in vivo* (Käs and Laemmli, 1992). Is topo II associated with SAT III involved in PEV?

Figure 6A shows the localization of topo II in nuclei and mitotic chromosomes of larval neuroblasts immunostained for topo II (red) and counterstained with DAPI (gray) and P9F (green). Examination of interphase nuclei in panel A shows a granular topo II signal that appears excluded from a prominent DAPI-bright (gray) and P9F-bright (green) region thought to correspond to chromosome 4. On chromosome arms, the topo II signal shows a banded pattern that is reminiscent of observations made with mammalian chromosomes. Topo II is also enriched on SAT III and on the adjacent rDNA repeats (see the enlarged X chromosome in the insets of panel A). A comparison of the P9F and protein staining patterns confirms that SAT III repeats constitute the major chromosomal site (yellow merged color in Figure 6A), where satellite sequences and topo II strictly colocalize. Lack of staining of the fourth chromosome, as in the case of HP1, could be due to a reduced accessibility of the antigen in this compact chromosome.

Experiments discussed above establish that D1 and HP1 are displaced from SAT III by P9. This observation is extended to topo II next. Exposure of permeabilized brains to P9 in the range of 250 nM to 1 μ M resulted in the selective loss of topo II from SAT III repeats (Figure 6C and D and insets with enlarged X chromosomes), while it remained associated with rDNA repeats and the chromosome arms. Note that topo II is completely evicted at the highest concentration of P9 used

(2.5 μ M, Panel E). These results show that, similarly to HP1, topo II is selectively displaced from SAT III repeats by P9 (250 nM to 1 μ M), while it remains bound to the adjacent rDNA repeats. Such a displacement might be due to direct competition between P9 and topo II for binding to AT-rich satellite sequences, or might be a consequence of the loss of D1 that might serve to stabilize the interaction of topo II with SAT III repeats.

Suppression of PEV by a topo II inhibitor

The colocalization of topo II with two heterochromatin proteins, HP1 and D1, on SAT III repeats suggests that topo II might also be a structural/enzymatic component of heterochromatin. Such a notion is supported by our finding that feeding *w^{m4h}* larvae sublethal doses of VM26, a topo II poison, resulted in a dose-dependent suppression of PEV (Figure 7). Suppression was complete at the highest drug concentrations used, as judged from the recovery of adult flies with wild-type eye color. A similar observation was made by feeding VM26 to flies harboring a variegating mini-*white* construct (*TP(3;Y)BL2*) inserted on the Y chromosome (Lu *et al*, 1996). In contrast, m-AMSA, another topo II poison structurally unrelated to VM26, had no effect on *w^{m4}* PEV (Figure 6): m-AMSA does not induce topo II cleavage in SAT III repeats, although it promotes cleavage at other genomic sites (Borgnetto *et al*, 1996). We conclude from these results that topo II is implicated in *white-mottled* heterochromatin-mediated silencing and that this enzyme might more generally play a functional role in the assembly of heterochromatin, as suggested by the effect of VM26 in the *TP(3;Y)BL2* line.

Discussion

P9 is a simple polyamide of linked pyrrole amino acids with a subnanomolar binding preference for long dA·dT-runs (Supplementary Table I). It was previously shown that this compound, if fed to developing flies, suppresses the *w^{m4}* phenotype, an effect manifested by a more homogenous, redder appearance of the eyes. This 'red shift' is due to a generally higher expression of the rearranged *white* gene (Janssen *et al*, 2000a). This observation suggested that P9 could work through chromatin opening, yielding a reduced heterochromatic state of SAT III, the main highly repetitive DNA flanking the *white* gene on the inverted *w^{m4}* X chromosome. Results reported here establish that, both *in vivo* and *in vitro*, P9 displaces the D1 protein from SAT III. In addition, we show that this compound results in a selective loss of HP1 and topo II from SAT III, while these proteins remain bound to low-affinity targets for P9, such as the rDNA repeats.

The displacement of D1 by P9 is an expected result. Polyamides are deeply buried in the DNA minor groove through specific hydrogen bonding and Van der Waals interactions (Dervan and Edelson, 2003). Similarly, the AT-rich specificity of D1 is mediated through its AT hooks reaching into the DNA minor groove of dA·dT-runs (Slama-Schwok *et al*, 2000). Oligopyrroles such as P9 mimic the DNA minor groove contacts of AT hooks. Hence, the displacement of D1 by P9 is explained by a molecular competition reaction. The salient observation of this paper is the selective displacement of the heterochromatin proteins HP1 and topo II from P9-targeted DNA such as SAT III. This is an unexpected finding

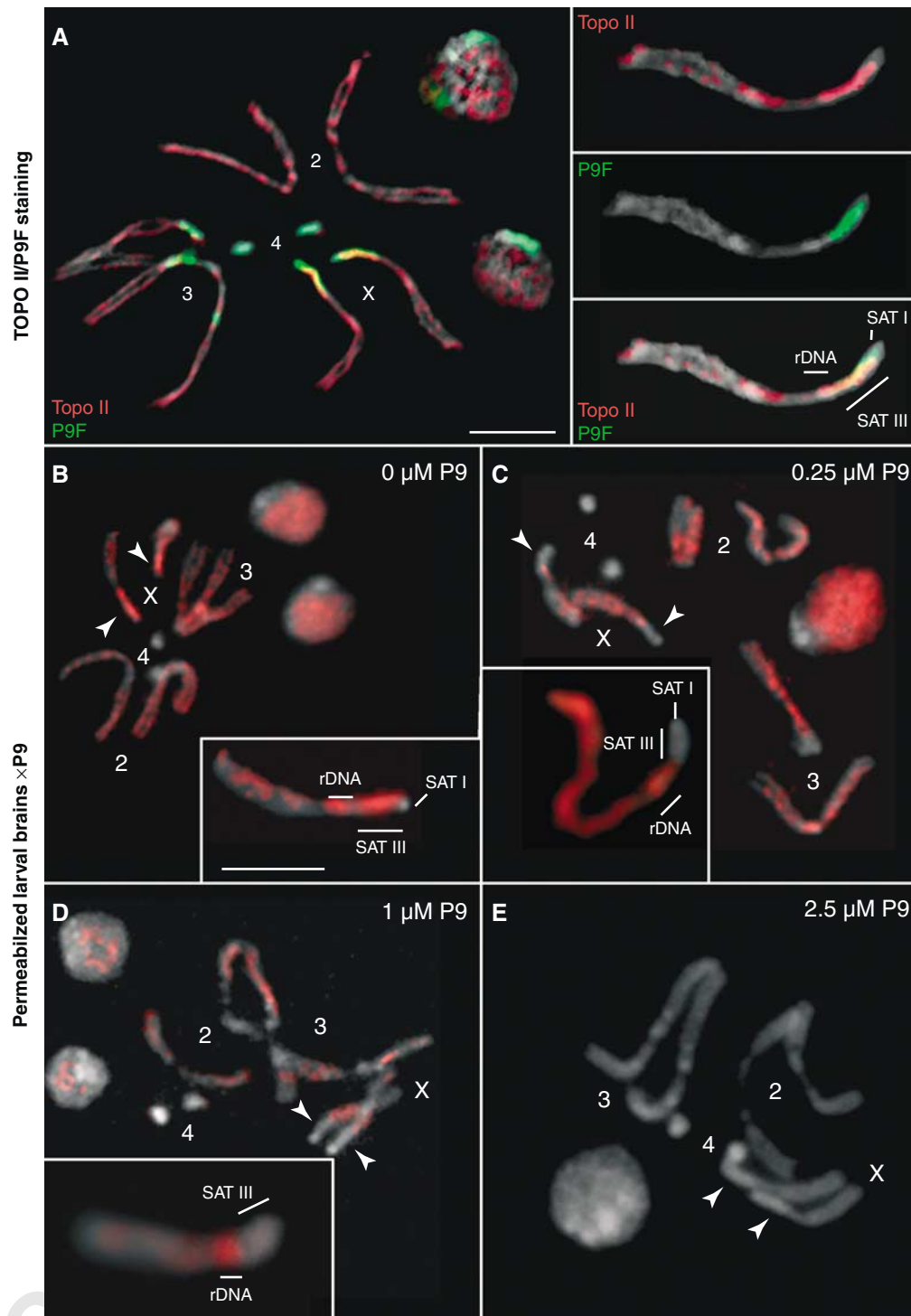


Figure 6 Localization of topoisomerase II and displacement from SAT III by P9. (A) Neuroblasts from female third-instar larvae were immunostained for topo II (red) and counterstained with P9F (green) and DAPI (gray). Individual chromosomes are numbered as shown. The localization of SAT I, SAT III and rDNA repeats is indicated in the inset showing a magnified X chromosome. SAT III repeats are associated with a particularly strong topo II signal, the adjacent region spanning the 3.5-Mbp rDNA repeats is also stained. Photographs to the right show the individual topo II, P9F and merged signals. In panels (B–E), third-instar female larval brains were permeabilized and treated with 0, 0.25, 1 and 2.5 μ M P9, respectively. Drug treatment leads to a delocalization and displacement of topo II that is selective for SAT III repeats at low to intermediate concentrations of the drug (250 nM to 1 μ M, C and D), while topo II remains associated with rDNA repeats (see magnified X chromosomes in insets). Topo II is completely displaced from nuclei and mitotic chromosomes at the highest drug concentration tested (2.5 μ M, E). Arrowheads indicate the position of SAT III repeats. Samples were counterstained with DAPI (gray). Scale bars = 5 μ m.

since HP1 is thought to bind chromatin largely through protein–protein contacts mediated by its chromo domain, which recognizes the methylated state of the K9 amino acid

of histone H3 (reviewed in Huisinga *et al*, 2006). It is possible that D1 might recruit the enzymatic activities required to create an HP1-binding site. Other sequence-selective satellite-

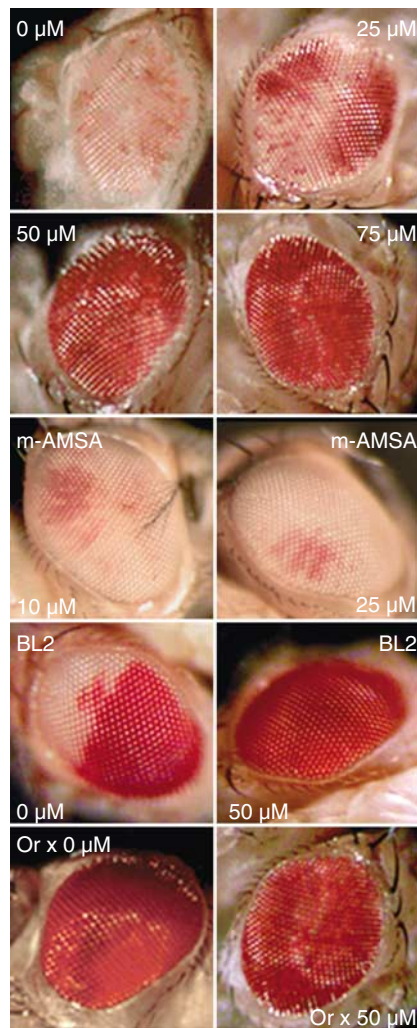


Figure 7 Treatment with VM26, a topoisomerase II poison, suppresses *white-mottled* PEV. Third-instar larvae from the *w^{m4h}*, *Tp(3;Y)BL2* ('BL2') and Oregon R ('Or') lines were fed VM26 or m-AMSA at the indicated concentrations. Representative eyes of 5-day-old adult flies are shown and correspond to those observed in > 80% of hatched flies ($n = 30$ for each drug concentration). Eyes from untreated or VM26-treated wild-type Oregon R flies are shown for comparison. Extracted eye pigments from two independent feeding experiments were measured for absorbance at 480 nm and yielded the following values: 0.18 ± 0.03 (*w^{m4h}*, 0 μ M VM26); 0.36 ± 0.05 (*w^{m4h}*, 25 μ M VM26); 0.79 ± 0.05 (*w^{m4h}*, 50 μ M VM26); 0.91 ± 0.03 (*w^{m4h}*, 75 μ M VM26); 0.22 ± 0.06 (*w^{m4h}*, 10 μ M m-AMSA); 0.21 ± 0.03 (*w^{m4h}*, 25 μ M m-AMSA); 0.43 ± 0.05 (BL2, 0 μ M VM26); 0.92 ± 0.04 (BL2, 50 μ M VM26); 0.92 ± 0.02 (Oregon, 0 μ M VM26); 0.89 ± 0.02 (Oregon, 50 μ M VM26).

binding proteins such as PROD (Platero *et al*, 1998) and SU(VAR)3-7 (Cl  ard and Spierer, 2001) might play a similar role. Taken together, our data suggest that D1 is directly or indirectly implicated in the association of HP1 and topo II with SAT III repeats and that the effects of P9 are exerted via the selective displacement of these proteins, resulting in a reduction of silencing of the nearby *white* gene in *w^{m4}* flies.

Our conclusions are based on the results of *in vitro* competition/binding assays and of *in vivo* P9 bathing and feeding experiments performed on embryos and larvae, respectively. Experimentally, we have followed the chromosome association of D1, HP1 and topo II as a function of P9 treatment by immunofluorescence and with the help of

fluorescent polyamide derivatives added during the staining procedure. The latter serve as optical highlighters of the targeted genomic regions (Figure 1). Binding experiments show that P9 competes with D1 for binding to similar sites in SAT III repeats that are also bound by the artificial MATH20 protein (Figure 3). This mimicry extends to the ability of P9, following entry in whole embryos or ingestion by larvae, to displace D1 from its SAT III-binding sites *in vivo* (Figure 2), one important consequence of which is the loss of HP1 from SAT III (Figure 4) which demonstrates a disassembly most likely caused by the displacement of D1 by P9.

However, our results also indicate the likely significance of HP1/DNA contacts: displacement of HP1 from SAT III or SAT V repeats is strictly determined by the sequences targeted by the P9 or P31 polyamide used, respectively (Figure 4). This is in line with the report that telomeric sequences are bound directly by HP1 (Perrini *et al*, 2004), an observation which may extend to a more general binding of HP1 to DNA in chromatin (Zhao *et al*, 2000). The displacement of HP1 from SAT III repeats by P9 might be due to direct competition, a consequence of which is that HP1 and D1 would also compete for binding to similar sites. Alternatively, HP2, a companion of HP1 containing two AT-hook motifs (Shaffer *et al*, 2002), might be a target for competition by P9 and D1. The opposite gradient-like distributions of HP1 and D1 on SAT III repeats (Figure 4B and C) support such a possibility, suggesting mutually exclusive interactions that might extend to the rDNA repeats. This hypothesis follows from our observation that TSA feeding results in a displacement of HP1 from heterochromatin and the subsequent invasion of the rDNA repeats by D1 (Figure 5). While not a target for P9 (see Figure 1 and the lack of staining of rDNA repeats by P9F), the rDNA repeats are generally AT-rich and may contain binding sites for D1 that are normally occupied by HP1. A destabilization of HP1/heterochromatin interactions by histone hyperacetylation (Taddei *et al*, 2001) would thus result in an increased accessibility to D1, which is indeed what we observe.

The displacement of topo II from SAT III repeats by P9 (Figure 6) might similarly be due to direct competition with P9 or, alternatively, reflect a secondary delocalization that follows displacement of D1 from that AT-rich sequences. A role for this enzyme in SAT III heterochromatin-mediated silencing, as supported by its localization and the striking suppression of PEV by VM26, a topo II poison, is consistent with the results of recent studies indicating that many modifiers of PEV are involved in several important aspects of chromosome structure and function (Le *et al*, 2004). We note that a link was previously established between chromatin compaction, topo II and the negative control of gene expression: topo II was shown to be implicated in Polycomb-mediated repression (Lupo *et al*, 2001). A similar interplay with HP1 might reflect X chromosome-specific silencing phenomena. Genetic screens did not previously identify topo II as a modifier of PEV and flies heterozygous for the Df(2L)TW158 deficiency, which deletes the gene encoding topo II, do not suppress *w^{m4}* PEV (Wustmann *et al*, 1989). However, topo II is a very abundant protein and a 50% reduction in protein levels might not have measurable effects on overall levels of enzymatic activity. Our observations and the failure of Df(2L)TW158 to modify *w^{m4}* PEV are therefore not necessarily contradictory.

Feeding VM26 to developing w^{m4} larvae suppresses PEV, an unexpected result which could be due to a general—but reversible—inhibition of topo II, or to the possible accumulation of topo II/DNA complexes in SAT III repeats that might interfere with dynamic interactions with proteins such as HP1. Synthetic diamidines that promote the relocalization of topo II to AT-rich satellites such as SAT III indeed also suppress PEV when fed to w^{m4} larvae (Susbielle *et al*, 2005). We do not rule out alternative mechanisms: trapped complexes might for instance interfere with the bidirectional transcription of SAT III repeats (Aravin *et al*, 2003), whose role in heterochromatin assembly, structure and function remains to be elucidated. The RNAi machinery has been linked to the variegated expression of mini-*white* reporters (Pal-Bhadra *et al*, 2004), but the mutants used were not tested against the w^{m4} inversion. Preliminary results (data not shown) indicate that *piwi* and *argonaute 1* mutants do not modify w^{m4} PEV, suggesting that there exist distinct pathways for the initiation of heterochromatin assembly (Danzer and Wallrath, 2004; Huisinga *et al*, 2006). In addition, SAT III-like sequences are interspersed throughout the *D. melanogaster* genome (Losada and Villasante, 1996) and the genomic origin of putative SAT III siRNAs has not been established. We are developing a combined DNA/RNA FISH method that can be applied to *Drosophila* larval tissues to address this important question in the future.

We favor a model whereby the suppression of w^{m4} PEV by VM26 is a direct result of interfering with topo II activity in SAT III repeats. The suppression of PEV in the BL2 line, in which *white* is inserted in the largely heterochromatic Y chromosome, further indicates that heterochromatin-mediated silencing in regions other than SAT III is also sensitive to topo II activity levels. Such a requirement for catalytically active topo II in heterochromatin assembly is generally supported by results showing active enzyme localized to centromeric regions and to human alpha-satellites that resemble SAT III sequences (Agostinho *et al*, 2004).

The strikingly different behavior of HP1 and topo II localized in the rDNA repeats adjacent to the SAT III array is discussed next. The known preference of topo II for association with AT-rich sequences (Maeshima and Laemmli, 2003) might explain its interaction with both SAT III and rDNA repeats. The lack of sensitivity of HP1 to displacement by P9 suggests that different mechanisms can direct HP1 to these closely juxtaposed chromatin domains. The D1-independent association of HP1 with rDNA correlates instead with the methylation of lysine 9 of histone H3 in this region (Ahmad and Henikoff, 2002). This suggests that packaging of the *Drosophila* rDNA repeats into heterochromatin may serve to regulate their expression. The colocalization of topo II and HP1 in this highly condensed region might reflect a coordinate interaction important for the control of rDNA transcription whose negative regulation involves the recruitment of histone deacetylase and methyl-transferase activities (Santoro *et al*, 2002). In contrast, resumption of proliferation and activation of ribosomal RNA transcription in *Drosophila* tissue culture cells is accompanied by the replication-independent replacement of histone H3 methylated on the lysine 9 position by the histone variant H3.3 in rDNA sequences (Ahmad and Henikoff, 2002). We speculate that the stable association of topo II with rDNA repeats might play

a role in regulating the topological constraints that are likely to accompany such a replacement process.

Our results demonstrate that interfering with D1, HP1 and topo II interactions with SAT III correlates with P9-induced w^{m4} gain-of-function. However, the inverted *white* gene has been mapped very close to—or even within—rDNA repeats (Schotta *et al*, 2003): suppression of w^{m4} PEV by P9 acting on SAT III must then somehow be exerted over the distance spanned by the rDNA locus, or approximately 3.5 Mbp. These observations are not consistent with a linear model of heterochromatin spreading and support instead a spatial model of heterochromatin-mediated silencing (Csink and Henikoff (1996); see also Huisinga *et al*, 2006 and references therein). Our FISH results (Figure 5C), which show that the rDNA-linked inverted *white* gene is indeed more closely associated with SAT III repeats in interphase chromatin, provide additional support for such a model, in which looping out of the rDNA into the nucleolus would place *white* in close proximity to SAT III (Figure 5D).

Finally, we note that the stochastic inactivation of the w^{m4} allele might be a direct reflection of developmentally regulated rDNA expression. The association of D1 and HP1 with SAT III and rDNA repeats is sensitive to histone acetylation levels (Figure 5B) and these proteins may compete for binding to similar sites. Our observations raise the intriguing possibility that a dynamic equilibrium of alternative interactions of D1 and HP1 with SAT III and rDNA repeats might serve to regulate the structure of the centromere-proximal region of the X chromosome and participate in the regulation of rDNA expression.

Materials and methods

Fluorescent drug staining and immunostaining

Brains were dissected from Oregon R third-instar larvae in 0.7% saline and incubated in 0.5% sodium citrate for 15 min. Dissected tissues were carefully transferred to a small drop of 0.5% citrate on a poly-lysine-coated microscope slide. Samples were fixed for 10 min in 2% PFA in PBS containing 0.1% Triton X-100 followed by 10 min in 2% PFA, 45% acetic acid. This fixation protocol yields qualitatively better results than the short acid fixation previously used for D1 localization (Aulner *et al*, 2002); avoidance of colchicine yields high-quality mitotic chromosomes. Labeling with rabbit polyclonal antibodies against D1 (1:100 dilution) was performed exactly as described (Monod *et al*, 2002). Samples were stained for 10 min with Lex9F (20 nM), P9F (5 nM) or P31TR (2 nM) in PBS containing 1 mM MgCl₂, washed twice in the same buffer, mounted in DAPI and visualized by epifluorescence microscopy. Staining with a polyclonal rabbit antibody against HP1 kindly provided by R Kellum (University of Kentucky) was performed using a 1:5000 dilution and permeabilized larval brains as described in Supplementary data for mock P9 treatments. The mouse C1A9 monoclonal HP1 antibody was also used, yielding identical results. Labeling with rabbit polyclonal antibodies against *Drosophila* topo II (1:1000 dilution) was performed as described above. Photographs were taken on a Leica DMRB microscope equipped with a CoolSnap HQ CCD camera and processed with Adobe Photoshop. *In vivo* and *ex vivo* drug treatments, FISH experiments and DNA binding/footprinting assays were performed as described in Supplementary data.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online.

Acknowledgements

We thank Rebecca Kellum (University of Kentucky) for her gift of antiserum against *Drosophila* HP1 and Lori Wallrath (University of

Iowa) and Sally Elgin (Washington University) for samples of the C1A9 antibody. We thank J Eissenberg, P Geyer, E Kuhn-Parnell, M Grigoriev and M Weber for comments on the manuscript. The Centre de Biologie du Développement provided *Drosophila* culture facilities and the Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes microscopy facilities. This work was supported by the Association

pour la Recherche sur le Cancer (grant no. 3319), by the ACI Cancéropôle 2004 program 'Genetic instability as a pejorative outcome in cancer' and by the National Institutes of Health (grant GM29006 to T-SH). R Blattes and G Susbielle are supported by doctoral fellowships from the French Ministry of Research and from the Ligue Nationale Contre le Cancer, respectively.

References

- Adachi Y, Luke M, Laemmli UK (1991) Chromosome assembly *in vitro*: topoisomerase II is required for condensation. *Cell* **64**: 137–148
- Agostinho M, Rino J, Braga J, Ferreira F, Steffensen S, Ferreira J (2004) Human topoisomerase II α : targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* **15**: 2388–2400
- Ahmad K, Henikoff S (2002) The histone variant H3*3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* **9**: 1191–1200
- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* **5**: 337–350
- Aulner N, Monod C, Mandicourt G, Jullien D, Cuvier O, Sall A, Janssen S, Laemmli UK, Käs E (2002) The AT-hook protein D1 is essential for *Drosophila melanogaster* development and is implicated in position-effect variegation. *Mol Cell Biol* **22**: 1218–1232
- Borgnetto ME, Zunino F, Tinelli S, Käs E, Capranico G (1996) Drug-specific sites of topoisomerase II DNA cleavage in *Drosophila* chromatin: heterogeneous localization and reversibility. *Cancer Res* **56**: 1855–1862
- Cléard F, Spierer P (2001) Position-effect variegation in *Drosophila*: the modifier Su(var)3–7 is a modular DNA-binding protein. *EMBO Rep* **2**: 1095–1100
- Csink AK, Henikoff S (1996) Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature* **381**: 529–531
- Danzer JR, Wallrath LL (2004) Mechanisms of HP1-mediated gene silencing in *Drosophila*. *Development* **131**: 3571–3580
- Dervan PB, Edelson BS (2003) Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 284–299
- Girard F, Bello B, Laemmli UK, Gehring WJ (1998) *In vivo* analysis of scaffold-associated regions in *Drosophila*: a synthetic high-affinity SAR binding protein suppresses position effect variegation. *EMBO J* **17**: 2079–2085
- Huisinga KL, Brower-Toland B, Elgin SC (2006) The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* **28**: 28
- Janssen S, Cuvier O, Muller M, Laemmli UK (2000a) Specific gain- and loss-of-function phenotypes induced by satellite-specific DNA-binding drugs fed to *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell* **6**: 1013–1024
- Janssen S, Durussel T, Laemmli UK (2000b) Chromatin opening of DNA satellites by targeted sequence-specific drugs. *Mol Cell* **6**: 999–1011
- Käs E, Laemmli UK (1992) *In vivo* topoisomerase II cleavage of the *Drosophila* histone and satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics. *EMBO J* **11**: 705–716
- Le HD, Donaldson KM, Cook KR, Karpen GH (2004) A high proportion of genes involved in position effect variegation also affect chromosome inheritance. *Chromosoma* **112**: 269–276
- Lohe AR, Hilliker AJ, Roberts PA (1993) Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**: 1149–1174
- Losada A, Villasante A (1996) Autosomal location of a new subtype of 1*688 satellite DNA of *Drosophila melanogaster*. *Chromosome Res* **4**: 372–383
- Lu BY, Bishop CP, Eissenberg JC (1996) Developmental timing and tissue specificity of heterochromatin-mediated silencing. *EMBO J* **15**: 1323–1332
- Lupo R, Breiling A, Bianchi ME, Orlando V (2001) *Drosophila* chromosome condensation proteins Topoisomerase II and Barren colocalize with Polycomb and maintain Fab-7 PRE silencing. *Mol Cell* **7**: 127–136
- Maeshima K, Laemmli UK (2003) A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell* **4**: 467–480
- Monod C, Aulner N, Cuvier O, Käs E (2002) Modification of position-effect variegation by competition for binding to *Drosophila* satellites. *EMBO Rep* **3**: 747–752
- Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Rao M, Bhadra U, Birchler JA, Elgin SC (2004) Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science* **303**: 669–672
- Perrini B, Piacentini L, Fanti L, Altieri F, Chichiarelli S, Berloco M, Turano C, Ferraro A, Pimpinelli S (2004) HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol Cell* **15**: 467–476
- Platero JS, Csink AK, Quintanilla A, Henikoff S (1998) Changes in chromosomal localization of heterochromatin-binding proteins during the cell cycle in *Drosophila*. *J Cell Biol* **140**: 1297–1306
- Reeves R, Nissen MS (1990) The A-T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. *J Biol Chem* **265**: 8573–8582
- Santoro R, Li J, Grummt I (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet* **32**: 393–396
- Schotta G, Ebert A, Dorn R, Reuter G (2003) Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* **14**: 67–75
- Shaffer CD, Stephens GE, Thompson BA, Funches L, Bernat JA, Craig CA, Elgin SC (2002) Heterochromatin protein 2 (HP2), a partner of HP1 in *Drosophila* heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 14332–14337
- Slama-Schwok A, Zakrzewska K, Leger G, Leroux Y, Takahashi M, Käs E, Debey P (2000) Structural changes induced by binding of the high-mobility group I protein to a mouse satellite DNA sequence. *Biophys J* **78**: 2543–2559
- Susbielle G, Blattes R, Brevet V, Monod C, Käs E (2005) Target practice: aiming at satellite repeats with DNA minor groove binders. *Curr Med Chem Anti-canc Agents* **5**: 409–420
- Swedlow JR, Sedat JW, Agard DA (1993) Multiple chromosomal populations of topoisomerase II detected *in vivo* by time-lapse, three-dimensional wide-field microscopy. *Cell* **73**: 97–108
- Taddei A, Maison C, Roche D, Almouzni G (2001) Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* **3**: 114–120
- Wustmann G, Szidonya J, Taubert H, Reuter G (1989) The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **217**: 520–527
- Zhao T, Heyduk T, Allis CD, Eissenberg JC (2000) Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA *in vitro*. *J Biol Chem* **275**: 28332–28338

RESUME

Les séquences satellites III (SATIII) présentes dans les régions péricentriques du chromosome X sont les seules séquences satellites alphas chez la drosophile, similaires à celles retrouvées autour du centromère chez les mammifères. Leurs caractéristiques structurales liées à leur composition nucléotidique A•T riche en font des cibles pour différentes classes de molécules artificielles. Nous proposons d'utiliser le modèle des SATIII de la drosophile pour améliorer notre compréhension du code des histones, de la fonction des régions péricentriques ainsi que pour l'évaluation du potentiel pharmacologique des diamidines. Nos travaux à l'aide de ligands du petit sillon nous ont permis de mettre en avant un rôle de la topoisomérase II, une cible thérapeutique majeure, dans l'assemblage de l'hétérochromatine et dans le mode d'action antiprolifératif des diamidines.

MOTS CLES

Hétérochromatine, séquences satellites alpha, ligands du sillon mineur, topoisomérase II, Variégation d'effet de position

ABSTRACT

The satellite III sequences (SATIII) composing the pericentric regions of the X chromosome are the only alphoid sequences found in *Drosophila melanogaster*. They are similar to those found near the centromeres of mammalian cells. Their structural characteristics, based on their biased, A•T rich, nucleotidic composition, make them good targets for different types of artificial and natural molecules. We propose to use the SAT III sequences as a model to study the histone code, the function of pericentric regions and as a tool to evaluate the pharmacological potential of diamidines. Our work with minor groove binding agents, allowed us to shed light on the functional role of topoisomerase II, a major target in anticancer and antiparasitic therapies, in the heterochromatin assembly process and in the antiproliferative mode of action of diamidines.

KEY WORDS

Heterochromatin, alpha satellite sequences, minor groove binders, Topoisomerase II, Position effect variegation

AUTEUR :

GUILLAUME SUSBIELLE

TITRE :

PERTURBATION DE LA DYNAMIQUE DE L'HÉTÉROCHROMATINE PAR DES LIGANDS SYNTHÉTIQUES DU PETIT SILLON DE L'ADN

DIRECTEUR DE THÈSE :

DOCTEUR EMMANUEL KÄS

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :

Salle de conférence de l'IEFG, Bâtiment IBCG, 118 route de Narbonne

RESUME :

Les séquences satellites III (SATIII) présentes dans les régions péricentriques du chromosome X sont les seules séquences satellites alphas chez la drosophile, similaires à celles retrouvées autour du centromère chez les mammifères. Leurs caractéristiques structurales liées à leur composition nucléotidique A•T riche en font des cibles pour différentes classes de molécules artificielles. Nous proposons d'utiliser le modèle des SATIII de la drosophile pour améliorer notre compréhension du code des histones, de la fonction des régions péricentriques ainsi que pour l'évaluation du potentiel pharmacologique des diamidines. Nos travaux à l'aide de ligands du petit sillon nous ont permis de mettre en évidence un rôle de la topoisomérase II, une cible thérapeutique majeure, dans l'assemblage de l'hétérochromatine et dans le mode d'action antiprolifératif des diamidines.

MOTS CLES :

Hétérochromatine, séquences satellites alpha, ligands du sillon mineur, topoisomérase II, Variégation d'effet de position

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET GÉNÉTIQUE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE EUCARYOTE
Bâtiment IBCG 118 route de Narbonne
31062 Toulouse cedex 09