HAL
open science

Variants d'histones H2BFWT et macroH2A1: de la structure à la fonction épigénétique

Matthieu Boulard

To cite this version:

Matthieu Boulard. Variants d'histones H2BFWT et macroH2A1: de la structure à la fonction épigénétique. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00175842v1

HAL Id: tel-00175842

https://theses.hal.science/tel-00175842v1

Submitted on 1 Oct 2007 (v1), last revised 19 Dec 2007 (v3)

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 Joseph Fourier-Grenoble 1
Chimie et Science du Vivant
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

THÈSE

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Joseph Fourier
Discipline Biologie

Présentée et soutenue publiquement par
Matthieu BOULARD
Le 26 octobre 2007

Variants d'histones H2BFWT et macroH2A1: de la structure à la fonction épigénétique

Jury

Dr. Emmanuel KAS	Rapporteur
Dr. Christian MUCHARDT	Rapporteur
Dr. Deborah BOURC'HIS	Examinateur
Pr. Philippe BOUVET	Examinateur
Dr. Stefan DIMITROV	Directeur de thèse
Pr. Michel ROBERT-NICOUD	Examinateur

Thèse préparée au sein du laboratoire
Biologie Molécualire et Cellulaire de la Différenciation
Unité INSERM U823
Institut Albert Bonniot
Université Joseph Fourier-Grenoble I

Table des matières

TABLE DES MATIERES **3**

INDEX DES FIGURES **7**

INDEX DES TABLES **7**

ELEMENTS DE SIGNALEMENT DE LA THESE **9**

A. TITRE 9

a. Titre en français *9*

b. Titre en anglais *9*

B. RESUME 9

a. Résumé en français *9*

b. Résumé en anglais ("Summary") *10*

C. MOTS CLES 11

a. Mots clés en français *11*

b. Mots clés en anglais ("Keywords") *11*

D. INFORMATIONS SUR LES LABORATOIRES DANS LESQUELLES LA THESE A ETE PREPAREE 12

a. Laboratoire de rattachement *12*

b. Autre laboratoire *12*

LISTE DES ABREVIATIONS PRINCIPALES **13**

AVANT-PROPOS **15**

I. CHAPITRE I: INTRODUCTION **17**

I.1. STRUCTURE ET ORGANISATION DE LA CHROMATINE 17

I.1.1. Le nucléosome *17*

I.1.1.1. Structure du nucléosome 17

I.1.1.2. Les histones 18

I.1.2. Structures d'ordres supérieurs de la chromatine *20*

I.1.3. Territoires chromatiniens *24*

I.1.3.1. L'euchromatine 25

I.1.3.2. L'hétérochromatine 26

a. Propriétés 26

b. Hétérochromatine constitutive 26

c. Hétérochromatine facultative 27

I.1.4. Assemblage et remodelage de la chromatine *27*

I.1.4.1. Assemblage de la chromatine 27

I.1.4.2. Assemblage dépendant de la réplication (RD) 28

I.1.4.3. Assemblage indépendant de la réplication (RI) 30

I.1.5. Complexes de remodelage ATP-dépendants *31*

I.1.5.1. Fonctions biologiques 34

I.1.5.2. Interactions avec les variants d'histones 35

I.2. REGULATIONS EPIGENETIQUES 39
I.2.1. Définition 39
I.2.2. L'empreinte génomique parentale 40
I.2.3. L'inactivation du chromosome X 41
I.2.3.1. Inactivation par l'empreinte 42
I.2.3.2. Inactivation aléatoire 44
I.2.3.3. Rôle de l'ARN Xist 45
I.2.3.4. Rôle des protéines polycombs 46
I.2.3.5. Méthylation de l'ADN et variants d'histones 48
I.3. SUPPORTS DE L'INFORMATION EPIGENETIQUE 50
I.3.1. La méthylation de l'ADN 50
I.3.2. Les variants d'histones 52
I.3.2.1. Généralités 52
I.3.2.2. Variants centromériques 53
I.3.2.3. H3.3 55
I.3.2.4. H2A.X 60
I.3.2.5. H2A.Z 62
I.3.2.6. MacroH2A 65
a. MacroH2A et le chromosome X inactif 67
b. MacroH2A et la méthylation de l'ADN 69
c. MacroH2A et la répression de la transcription 71
d. MacroH2A et le métabolisme de l'ADP-ribose 72
e. MacroH2A et l'arrêt du cycle cellulaire 75
I.3.2.7. H2ABbd et autres variants de la spermatogenèse 76
a. H2A.Bbd 76
b. TH2A 78
c. H2AL1 et H2AL2 78
I.3.2.8. TH2B 80
I.3.2.9. H2BFWT 81
I.3.2.10. Interactions entre variants 81
I.3.3. Modifications post-traductionnelles des histones 83
I.3.3.1. Généralités 83
I.3.3.2. Acétylation des histones 85
I.3.3.3. Méthylation des histones 87
I.3.3.4. ADP-ribosylation 90
I.3.3.5. Ubiquitination 90
I.3.3.6. Interactions entre modifications d'histones 91
I.3.4. Interactions entre différents niveaux d'informations épigénétiques 91
I.4. REMODELAGE DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA SPERMATOGENESE 95
I.4.1.1. Déroulement de la spermatogenèse 95
I.4.1.2. Remodelage de la chromatine 97
I.4.1.3. Rôle des variants d'histones dans la transmission de l'information épigénétique 99
I.5. OBJECTIFS 101
I.5.1. H2BFWT 102

I.5.2. MacroH2A1 ..... *103*

II. CHAPITRE II: RESULTATS **105**

II.1. STRUCTURE ET FONCTION DU NUCLEOSOME VARIANT H2BFWT 105

II.2. ÉTUDE IN VIVO DU VARIANT MACROH2A1 117

II.2.1. Matériels et méthodes : Création d'une lignée de souris knock out macroH2A1$^{-/-}$ *117*

II.2.1.1. Stratégie 117

II.2.1.2. Construction du vecteur de recombinaison 117

II.2.1.3. Génération des souris déficientes macroH2A1$^{-/-}$ 118

II.2.1.4. Extraction des noyaux à partir de tissus 119

II.2.1.5. Western-blot 119

II.2.1.6. Analyses de la méthylation de l'ADN 120

a. Méthylation globale du génome (Southern-blot) 120

b. Méthylation du promoteur Xist 120

c. Méthylation d'une région soumise à l'empreinte 121

II.2.1.7. Northern-blot 121

II.2.1.8. Anatomopathologie 121

II.2.1.9. Expérience d'irradiation 122

II.2.2. Résultats *123*

II.2.2.1. *Knock out* de macroH2A1 123

II.2.2.2. Influence sur la méthylation de l'ADN 125

II.2.2.3. Transcription des rétrotransposons 129

II.2.2.4. Sensibilité des souris macroH2A1$^{-/-}$ aux radiations ionisantes 133

II.2.2.5. Étude anatomopathologique 134

III. CHAPITRE III : DISCUSSIONS **139**

III.1. STRUCTURE ET FONCTION DU NUCLEOSOME VARIANT H2BFWT 139

III.2. ÉTUDE IN VIVO DU VARIANT MACROH2A1 141

III.3. CONCLUSION GENERALE 149

IV. REFERENCES **153**

V. ANNEXE **177**

Index des figures

FIGURE 1 : STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DU NUCLEOSOME A 2,8 Å 18
FIGURE 2 : STRUCTURES DES HISTONES : L'*HISTONE FOLD* 19
FIGURE 3 : NIVEAUX D'ORGANISATION DE LA CHROMATINE 21
FIGURE 4 : MODELISATIONS DES DEUX TOPOLOGIES DE LA FIBRE DE 30 NM 23
FIGURE 5 : PROPRIETES DES REGIONS EUCHROMATIQUES ET HETEROCHROMATIQUES 25
FIGURE 6 : ACTIONS DES COMPLEXES DE REMODELAGE ATP-DEPENDANT 33
FIGURE 7 : FACTEURS DE REMODELAGE DE LA CHROMATINE ATP-DEPENDANT 36
FIGURE 8 : CINETIQUE DE L'INACTIVATION DU CHROMOSOME X CHEZ LA SOURIS 43
FIGURE 9 : EXPRESSION DE L'ARN XIST DANS LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES 45
FIGURE 10 : ALIGNEMENTS DE SEQUENCES DES VARIANTS DE L'HISTONE H3 53
FIGURE 11 : ALIGNEMENTS DE SEQUENCES DES VARIANTS DE L'HISTONE H2A 59
FIGURE 12 : H2A.Z PARTICIPE A LA STRUCTURE DES PROMOTEURS 63
FIGURE 13 : STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DU DOMAINE MACRO AF1521 65
FIGURE 14 : EPISSAGE ALTERNATIF DE L'ARNM CODANT POUR MACROH2A1.1 ET MACROH2A1.2 66
FIGURE 15 : BIOGENESE DE L'O-ACETYL-ADP-RIBOSE 73
FIGURE 16 : ALIGNEMENTS DE SEQUENCE DES VARIANTS DE L'HISTONE H2B PRESENTS CHEZ L'HOMME 80
FIGURE 17 : REPRESENTATION DES PRINCIPALES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES DES HISTONES 83
FIGURE 18 : COMPOSANTS DE LA CHROMATINE AU COURS DE LA SPERMATOGENESE 96
FIGURE 19 : POSITIONS DES HISTONES DU DIMERE (H2A ET H2B) DANS LE NUCLEOSOME 100
FIGURE 20 : STRATEGIE D'INVALIDATION GENIQUE DE MACROH2A1 116
FIGURE 21 : ABSENCE DE LA PROTEINE MACROH2A DANS LES KO, TRANSMISSION MENDELIENNE 124
FIGURE 22 : ANALYSE DE LA METHYLATION DE L'ADN GENOMIQUE 128
FIGURE 23 : TRANSCRIPTION DES RETROTRANSPOSONS 132
FIGURE 24 : SURVIE DES SOURIS EXPOSEES A UNE IRRADIATION γ TOTALE DE 6,5 GY 134
FIGURE 25 : EXAMEN HISTOPATHOLOGIQUE DU FOIE 136

Index des tables

TABLE 1 : CHAPERONNES D'HISTONES 31
TABLE 2 : CARACTERISTIQUES DU CHROMOSOME X INACTIF 42
TABLE 3 : OBSERVATIONS HISTOPATHOLOGIQUES 137

Éléments de signalement de la thèse

A. Titre

a. Titre en français

Variants d'histones H2BFWT et macroH2A1: de la structure à la fonction épigénétique

b. Titre en anglais

Histone variants H2BFWT and macroH2A1: from the structure to the epigentic function

B. Résumé

a. Résumé en français

Les eucaryotes expriment des variants d'histones non-alléliques en faible quantité en plus des histones conventionnels. De récentes données ont montré que ces variants d'histones sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la réparation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes ou encore le contrôle de la transcription. L'objectif de cette étude est d'améliorer la compréhension du rôle biologique des variants d'histones. Les travaux rapportés dans ce manuscrit abordent plus spécifiquement la fonction de deux variants: H2BFWT, qui joue un rôle dans la spermatogenèse chez l'homme; et macroH2A1 qui semble impliqué dans la répression transcriptionnelle.

Nous avons montré que malgré sa grande divergence avec H2B, l'incorporation de H2BFWT ne modifie pas la structure globale du nucléosome. Néanmoins, contrairement à l'histone somatique H2B, H2BFWT n'a pas la capacité de recruter les facteurs d'assemblage du chromosome et n'est pas requis pour la condensation du chromosome mitotique. Cette différence de comportement vis-à-vis de l'assemblage des chromosomes suggère que H2BFWT pourrait être impliqué dans l'architecture de structure d'ordre supérieur de la chromatine.

Dans le but d'élucider le rôle biologique de macroH2A1 *in vivo*, nous avons généré une lignée de souris invalidées pour macroH2A1.

Malgré l'abondance des investigations portant sur macroH2A1, sa fonction reste inconnue. MacroH2A1 a la particularité d'être trois fois plus grand que H2A, il comporte ainsi une extension C-terminale de fonction inconnue. Initialement macroH2A1 avait été décrit comme principalement localisé sur le chromosome X inactif. La signification biologique de cet enrichissement n'est pas comprise. *In vitro*, la présence de macroH2A1 interfère avec la transcription. De récentes études ont montré que certaines séquences d'ADN méthylées, incluant les gènes soumis à l'empreinte et les rétrotransposons sont enrichies en nucléosomes contenant macroH2A1. Il a également été démontré que c'est la méthylation de l'ADN, nécessaire pour la répression transcriptionnelle, qui permet le recrutement de macroH2A1 sur les rétrotransposons. Nous émettons l'hypothèse que la méthylation de l'ADN aboutirait à la répression des rétrotransposons via le recrutement de macroH2A1.

L'étude du phénotype des souris déficientes en macroH2A1 permet de conclure que contrairement au consensus actuel, macroH2A1 n'est pas nécessaire pour réprimer la transcription des séquences répétées incluant les rétrotransposons.

Les examens anatomopathologiques suggèrent que macroH2A1 pourrait être impliqué dans la régulation du métabolisme des acides gras.

b. Résumé en anglais ("Summary")

In addition to conventional histones, non-allelic variants are also expressed in low amount in eukaryotic cells. Recent data have revealed that histone variants assume roles in various processes within the cell including DNA repair, chromosome segregation and transcriptional control. The aim of my study was to highlight some biological functions harbored by histone variants. My investigations focused on two variants: the uncharacterized H2BFWT, which plays a role in human spermatogenesis and macroH2A1, which has an unclear function in transcriptional silencing.

We show that, despite its huge divergence with H2B, the presence of H2BFWT does not affect the overall structure of the nucleosome. Importantly, in contrast to somatic H2B, H2BFWT was unable to recruit chromosome condensation factors and to participate in the assembly of mitotic chromosomes. This difference towards chromosome assembly suggests that H2BFWT might be involved in chromatin architecture.

In order to bring new insights about macroH2A1 function *in vivo* we have disrupted macroH2A1 expression in mice by gene targeting.

Many studies have been addressed macroH2A1 function, however its biological role remains

unclear. MacroH2A1 is three times bigger than H2A and carries a C-terminal extension of unknown function. Initially macroH2A1 had been reported to be predominantly located on the inactive X chromosome in female. The biological significance of this enrichment is totally unknown. *In vitro*, the presence of macroH2A1 interferes with transcription. Recent studies show that methylated DNA sequences including imprinted genes and retrotransposons are enriched in macroH2A1. It has been reported that macroH2A recruitment on retrotransposons is mediated by DNA methylation, which is absolutely required for their silencing. We hypothesized that methylation of CpG dinucleotides in retrotransposons might achieve transcriptional repression through recruitment of macroH2A1.

The study of the mice phenotype shows that contrary to the current view, macroH2A1 is not able on its own, to repress transcription of repetitive sequences including transposon *in vivo*. Anatomopathological examinations reveal that macroH2A1 could be involved in fatty acid metabolism.

C. Mots clés

a. Mots clés en français

Variants d'histone, nucléosome, épigenetique, chromatine, remodelage, spermiogenèse, macroH2A, H2BFWT

b. Mots clés en anglais ("Keywords")

Histone variants, nucleosome, epigenetics, chromatin, remodeling, spermiogenesis, macroH2A, H2BFWT

D. Informations sur les laboratoires dans lesquelles la thèse a été préparée

a. Laboratoire de rattachement

Unité INSERM U823

Institut Albert Bonniot

Domaine de la Merci

38706 La Tronche cedex

France

b. Autre laboratoire

Laboratoire Joliot Curie

École Normale Supérieure

46 allée d'Italie

69364 Lyon cedex 07

FRANCE

Liste des abréviations principales

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AFM : Microscopie à force atomique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNpolII : ARN polymérase II
ATP : Adénosine-triphosphate
Asf1 : *Anti silencing function 1*
BER : Réparation par excision de base
BET : Bromure d'éthidium
BSA : Bovin serum albumin
DAPI : 4', 6-diamidino-2-phénylindole
CAF-1 : *Chromatin Assembly factor 1*
CenH3 : *Centromeric H3*
ChIP : immuno-précipitation de chromatine
dNTP : désoxyribonucléotides
DMR : Région différentiellement méthylée
DMSO : Diméthyl sulfoxide
DNMT : DNA methyltransferase
DSB : Cassure doubles brin de l'ADN
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Acide éthylène-diamide-tétra acétique
EGTA : Ethylene glycol tétra acétique
ES : souche embryonnaire
FACT : Facilitates chromatin transcription
FISH : *Fluorescence in situ hybridization*
FRAP : *Fluorescence Recovery After Photobleaching*
GFP : *Green fluorescent protein*
GST : Glutathione-S-transférase
Gy : Gray
HAT : Histones acétyltransférase
HDAC : Histones déacétylase
HMT : Histone methyltransferase
HP1 : *Heterochromatin protein 1*
IAP: Intracisternal A particles
kDa : kilo Dalton
KO : *Knock out* (mutant nul)
LINE : *Long interspersed nuclear element*
LTR : *Long terminal repeat*
M : Molaire
MBD : *Methyl CpG binding domain*
MEF : Fibroblastes embryonnaires
NAP1 : *Nucleosome Assembly Protein 1*
Neo : Néomycine
NaCl: Chlorure de calcuim
NFR: *Nucleosome free region*
NHR : Région non histone
NF-kB : *Nuclear factor kappa B*
ORF : cadre de lecture ouvert
pb : paire de bases
PBS : *Phosphate-buffered saline*
PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PcG: Protéines polycomb
PGC : Cellules germinales primordiales
PHD : *Plant homeobox domain*
PCR : *Polymerization chain reaction*
PFA : Para-formaldéhyde
PGK : phosphoglycerol kinase
PMSF : Phénylméthylsulfonylfluoride
rpm : rotation par minute
RT-PCR : Reverse transcriptase PCR
SAHF : Senescence associated heterochromatin foci
siRNA : *silencing interference ARN*
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SVF : Sérum de veau foetal
TCA : Acide tri-chloroacétique
TSA : trichostatine A
UV : Ultraviolet
WT: *Wild type* (sauvage)
Xa : chromosome X actif
Xi : chromosome X inactif
Xic : centre d'inactivation du X
Xist : *X-inactive-specific trascript*
Xm : chromosome X d'origine maternelle
Xp : chromosome X d'origine paternelle

Avant-propos

Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN est organisé sous forme de chromatine via son association avec les protéines histones. Les histones ont longtemps été considérés comme des protéines structurales dont la fonction se limiterait à la compaction du génome. Depuis la découverte d'enzymes capables de modifier de manière réversible les histones, l'idée d'un rôle dynamique des histones a émergé. De nombreuses études ont par la suite montré que les protéines associées à l'ADN dont les histones participent à la régulation à l'expression du code génétique. Ces mécanismes influençant le phénotype des cellules sans en affecter le génotype sont globalement référencés sous le terme d'épigénétique.

Malgré leur forte conservation phylogénétique et leur évolution lente, les histones comptent de nombreux variants non-alléliques exprimés en faible quantité. Initialement caractérisés dans le testicule où ils jouent un rôle important dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogenèse, certains d'entre eux ont par la suite été identifiés dans tous les tissus.

Récemment l'importance des variants d'histones à été mis en évidence dans de nombreuses fonctions cellulaires incluant la transcription, la ségrégation des chromosomes, ou encore la réparation de l'ADN. L'incorporation de variants d'histones au nucléosome en modifie les propriétés fonctionnelles. L'étude de l'influence des variants d'histones sur les propriétés de la chromatine est déterminante pour la compréhension des mécanismes épigénétiques.

Les travaux présentés dans ce manuscrit tentent d'apporter des éléments nouveaux concernant la fonction biologique des variants d'histones. Cette étude porte sur deux variants d'histones appelés H2BFWT et macroH2A1.

L'analyse des modifications structurales du nucléosome variant H2BFWT par des approches de biochimie, fournit de nouvelles données sur les conséquences de l'incorporation de H2BFWT sur les propriétés du nucléosome. Le comportement de ces nucléosomes variants vis-à-vis de la condensation des chromosomes mitotiques apporte des indications quant à son rôle biologique dans l'établissement de structure d'ordre supérieur de la chromatine dans le sperme.

La fonction biologique du variant macroH2A1 a été abordée par le biais de la réalisation d'une lignée de souris invalidée. L'étude du phénotype de ces mutants nous amène à reconsidérer le rôle admis de macroH2A1 dans la répression transcriptionnelle.

Nous avons en effet montré que la présence de macroH2A1 n'est pas nécessaire pour la répression des rétrotransposons.

Des résultats préliminaires d'anatomopathologie suggèrent que macroH2A1 serait impliqué dans la régulation du métabolisme des acides gras.

I. Chapitre I: Introduction

I.1. Structure et organisation de la chromatine

I.1.1. Le nucléosome

I.1.1.1. Structure du nucléosome

Le nucléosome consiste en un assemblage nucléoprotéique formant l'unité de base de la chromatine (Kornberg, 1974; Oudet *et coll.*, 1975); composé par un octamère d'histones comprenant deux copies de H2A, H2B, H3 et H4 autour duquel s'enroule 1,75 tour d'ADN (146 paire de bases) (Richmond *et coll.*, 1984). Le nucléosome a une forme grossièrement cylindrique d'environ 11 nm de diamètre et 5,5 nm de hauteur.

Sa structure à haute résolution du nucléosome a été résolue par cristallographie aux rayons X (figure 1) (Burlingame *et coll.*, 1985; Luger *et coll.*, 1997; Richmond and Davey, 2003). Les interactions entre l'ADN et les histones sont de type hydrogène, environ la moitié de ces interactions font intervenir des lysines et arginines positivement chargées et le squelette sucre/phosphate de l'ADN négativement chargé (Luger *et coll.*, 1997; Richmond and Davey, 2003).
Il y a 14 points de contact entre les histones et l'ADN (figure 1) (Luger *et coll.*, 1997), ce qui fait du nucléosome l'un des complexes ADN-protéines les plus stables en condition physiologique. Cette stabilité répond à la fonction de compaction de l'ADN, cependant le nucléosome ne se résume pas une structure statique. C'est au contraire une entité dynamique, capable d'être altérée dans sa composition, sa structure, ainsi que sa position sur l'ADN. Ces propriétés sont régulées par de nombreux complexes protéiques.

Le nucléosome est un obstacle pour de nombreux processus biologiques impliquant la liaison de protéines à l'ADN. Ainsi, le masquage d'un promoteur par le nucléosome inhibe la liaison des facteurs de transcription induisant une inhibition de la transcription (Izban and Luse, 1991; Lorch *et coll.*, 1987).

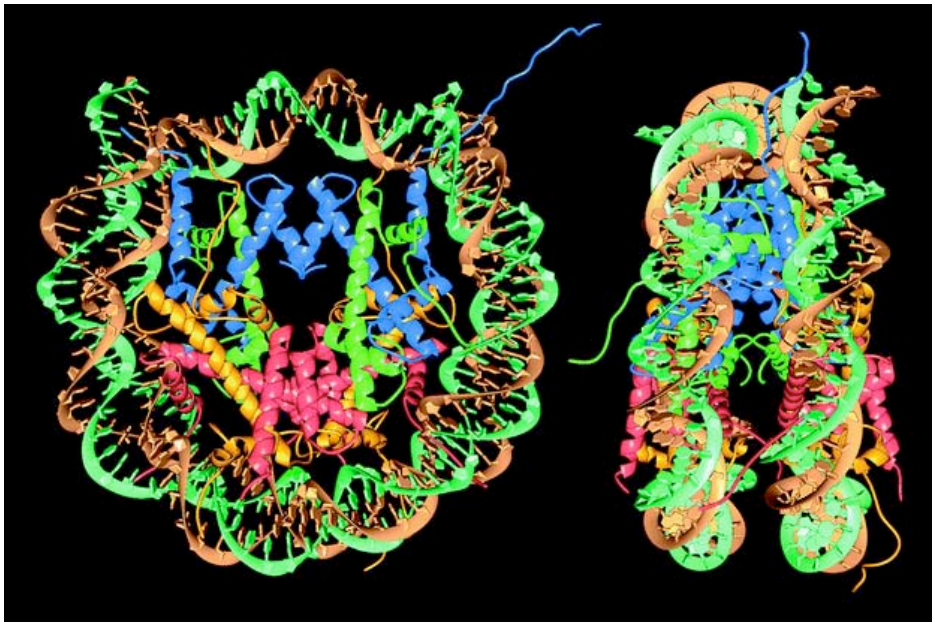


Figure 1 : Structure cristallographique du nucléosome à 2,8 Å

146 paires de bases d'ADN (en vert et marron) s'enroulent autour de deux copies de chacune des quatre histones (H3, bleu; H4, vert; H2A, jaune; H2B, rouge) formant l'octamère d'histones. Les parties N-terminales des histones sont rejetées vers l'extérieur de la particule, elles interagissent avec le sillon mineur de l'ADN. Le nucléosome de gauche est représenté "vu de dessus" et celui de droite est observé depuis le côté, perpendiculairement à celui de gauche.
(Luger *et coll.*, 1997)

I.1.1.2. Les histones

Les histones sont de petites protéines basiques d'environ 13 kDa (100 à 130 acides aminés). Il existe 5 formes d'histones canoniques :

- H2A (14 kDA), H2B (14 kDa), H3 (15 kDA) et H4 (11 kDA) nommées histones de cœur
- H1 (21 kDA) nommée histone de liaison

Les histones de cœur possèdent une structure commune appelée "*histone fold*" (figure 2) (Malik and Henikoff, 2003). Tous les eucaryotes possèdent des histones leur permettant d'organiser leur ADN. Les histones sont parmi les protéines les plus conservées au cours de l'évolution. Des études phylogénétiques montrent que des protéines possédant l'*histone fold*, ancêtres des histones appelées histones archéennes, sont apparues après la divergence entre les archaebactéries et les bactéries et avant la séparation des lignages archaebactérie / eucaryotes (Sandman *et coll.*, 1998) (Malik and Henikoff, 2003).

L'*histone fold*, composé de trois hélices α reliées entre elles par des boucles flexibles (figure 2) ; constitue un motif de dimérisation, permettant aux histones d'interagir entre elles (H2A-H2B et H3-H4), via des interactions de nature hydrophobe. Ces interactions entre H2A et H2B ainsi qu'entre H3 et H4 sont appelées "poignée de mains" ("*handshake*") (Arents *et coll.*, 1991).

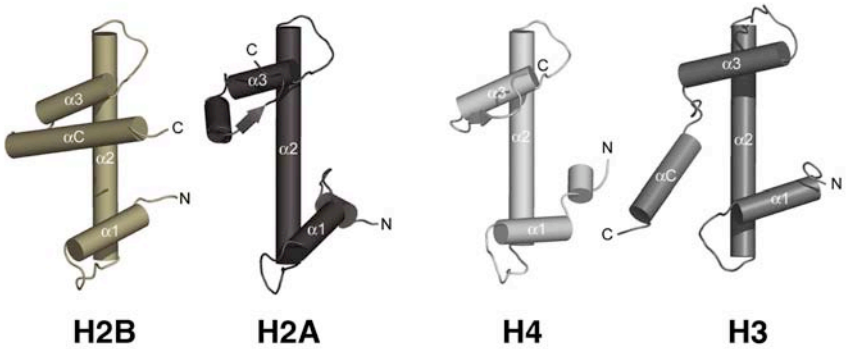


Figure 2 : Structures des histones : l'*histone fold*

Les histones de cœur (H2A, H2B, H3 et H4) adoptent tous la même structure secondaire appelée "*histone fold*", qui consiste en un enchaînement de trois hélices α représentées par les cylindres. L'*histone fold* est à la base de la dimérisation H2A-H2B et H3-H4.
Adapté de (Sondermann *et coll.*, 2003)

En l'absence d'ADN et à une force saline modérée (150 mM NaCl), H3 et H4 s'associent entre eux et forment un tétramère alors que H2A et H2B restent associés sous forme de dimère. À forte force saline (2M NaCl), l'octamère d'histones se forme spontanément *in vitro* (Eickbush and Moudrianakis, 1978).

De part et d'autre de *l'histone fold*, chaque histone possède des extrémités N-terminales et C-terminales dont la structure n'est pas connue, qui se localisent à l'extérieur du nucléosome.
Les parties amino-terminales des histones ne participent pas significativement à la structure du nucléosome, elles semblent plutôt engagées dans des interactions impliquant d'autres protéines ou d'autres nucléosomes. Les queues des histones H2B et H4 en particulier sont importantes pour la formation de structure d'ordre supérieure de la chromatine. Ainsi,

l'intégrité de la queue de H4 est nécessaire à la formation de la fibre de 30 nm (Dorigo *et coll.*, 2003); la partie animo-terminale de H2B, quant à elle, est requise pour l'assemblage du chromosome mitotique (de la Barre *et coll.*, 2001; de la Barre *et coll.*, 2000).

Les queues des histones sont accessibles, et peuvent être modifiées chimiquement par des enzymes. Ces modifications post-transcriptionnelles jouent un rôle dans la structure de la chromatine, ou peuvent servir de motifs de reconnaissance à la liaison de facteurs régulateurs.

L'histone de liaison H1, représente l'autre famille d'histone. H1 n'a pas la même structure que les histones de coeur; celle-ci adopte une structure tripartite, constituée d'un domaine central globulaire flanqué des parties N- et C-terminales. Le domaine globulaire est conservé entre les variants, tandis que les régions terminales divergent par leur taille et leur séquence (Wolffe *et coll.*, 1997). Le domaine globulaire de H1 interagit avec les particules cœur des nucléosomes au niveau des brins d'ADN entrant et sortant. Il serait positionné asymétriquement, par rapport au centre de symétrie du nucléosome (Zhou *et coll.*, 1998).

I.1.2. Structures d'ordres supérieurs de la chromatine

La chromatine est organisée en plusieurs niveaux de structures d'ordres supérieurs (figure 3). Des interactions spécifiques entre nucléosomes aboutissent à la formation de la fibre de 30 nm (la structure secondaire), et à l'organisation en structures tertiaires intervenant dans l'assemblage du chromosome mitotique (figure 3). La géométrie et la forme de ces structures ne sont pas résolues au-delà de la fibre de 30 nm (Woodcock, 2006).

La digestion de la chromatine par la nucléase micrococcale produit des fragments d'ADN dont les tailles correspondent à des multiples de 200 pb environ (Tsanev and Tsaneva, 1986). Ces fragments correspondent aux portions d'ADN protégés par les contacts avec les histones du nucléosome, qui constitue le premier niveau d'organisation de la chromatine (Olins and Olins, 1974).

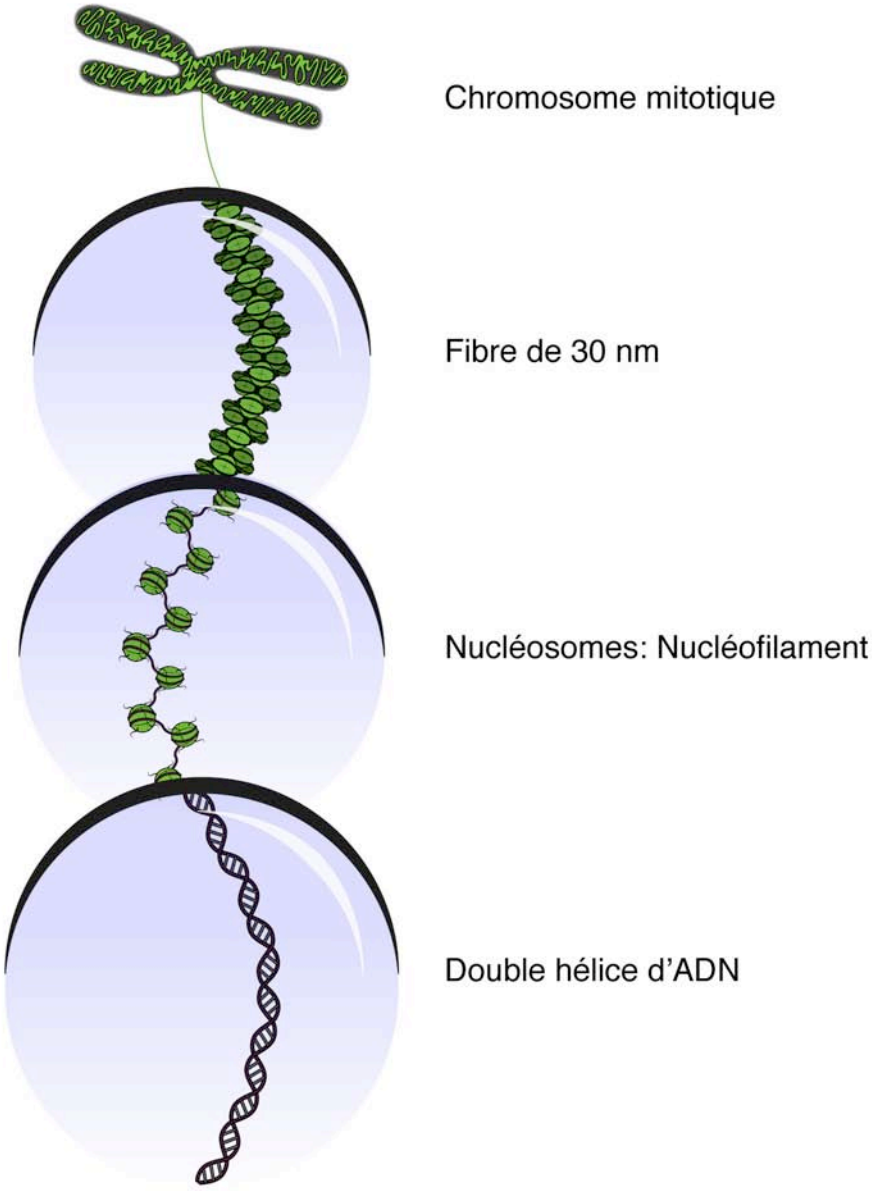


Figure 3 : Niveaux d'organisation de la chromatine

L'ADN s'enroule autour de l'octamère d'histone pour former le nucléosome qui constitue le premier niveau d'organisation de la chromatine. Le nucléofilament, représentant un enchaînement de nucléosomes de 11 nm de diamètre, se structure avec l'histone de liaison H1 pour former la fibre de 30 nm. Les niveaux d'organisation intermédiaires entre la fibre de 30 nm et le chromosome mitotique ne sont pas connus.

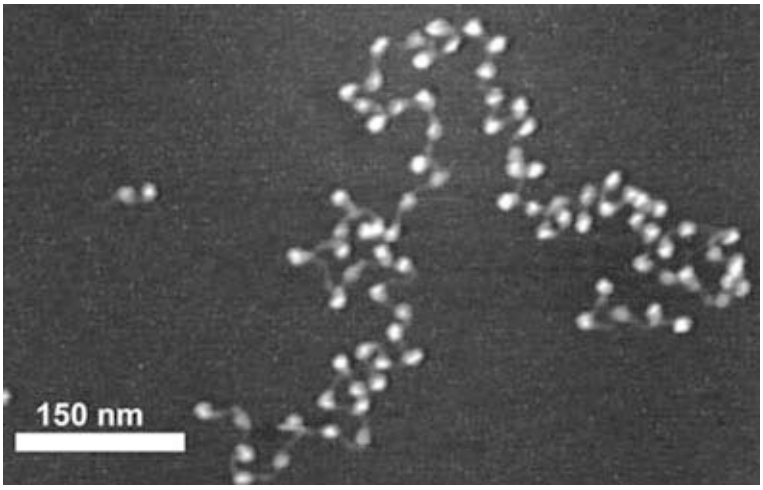


Figure 4 : Image du nucléofilament réalisée par cryo-AFM

Fibre de chromatine isolée d'érythrocytes de poulet, visualisée par cryo-microscopie à force atomique (cryo-AFM) sur une surface de mica (Shao, 1999).

La succession des nucléosomes le long de l'ADN, appelée nucléofilament, peut être observée par microscopie électronique ou par microscopie à force atomique (figure 4) (Thoma *et coll.*, 1979).

En présence de l'histone de liaison de liaison H1, dans des conditions ioniques physiologiques, le nucléofilament s'organise *in vitro* en une fibre de 30 nm de diamètre (Thoma *et coll.*, 1979).

Actuellement deux modèles s'affrontent pour tenter de définir structure de la fibre de 30 nm (figure 5) :

- Le modèle "solénoïde" dans lequel le nucléofilament se courbe de façon hélicoïdale formant une hélice d'un pas de six nucléosomes (Finch and Klug, 1976). Le solénoïde ainsi créé expliquerait les observations de la fibre de 30 nm réalisées par microscopie électronique.
- Dans le modèle dit "zig zag" l'ADN de liaison est rigide et s'entrecroise à l'intérieur de la fibre, de telle façon que deux nucléosomes adjacents sur le nucléofilament se retrouvent à des positions diamétralement opposées le long de la fibre de 30 nm (Bednar *et coll.*, 1998). Ce modèle permettrait d'expliquer le repliement de type "accordéon" observé à faible salinité (Bednar *et coll.*, 1998).

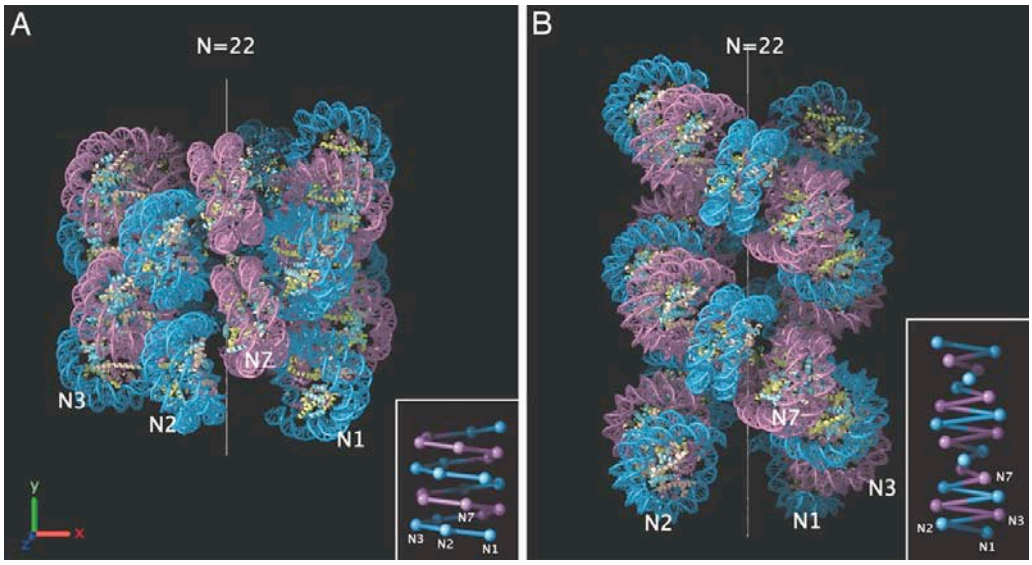


Figure 4 : Modélisations des deux topologies de la fibre de 30 nm

A. Représentation de l'organisation en solénoïde dans lequel l'enroulement en solénoïde s'effectue vers la gauche. L'alternance de bleu et violet schématise le pas de l'hélice. Cette fibre contenant 22 nucléosomes aurait un diamètre de 33 nm
B. modèle de structure en zig-zag dans lequel sont représentées des paires de nucléosomes bleu et violet. Cette hélice contenant 22 nucléosomes aurait un diamètre de 28,4 nm.
D'après (Robinson *et coll.*, 2006)

Récemment la structure cristallographique d'un tétranucléosome a été résolue à une résolution de 9 Å (en l'absence de H1) (Schalch *et coll.*, 2005). Cette structure révèle que l'ADN de liaison s'entrecroise sans se courber, organisant le positionnement des nucléosomes selon le modèle "zig zag". La conformation en "zig zag" est également supportée par des études de liaisons covalentes induites (*crosslink*) réalisées en solution sur des fibres plus longues contenant 12 nucléosomes (Dorigo *et coll.*, 2004).

Toutefois, les résultats de nouvelles expériences de cryo-microscopie électronique réalisées à partir de longues fibres contenant jusqu'à 70 nucléosomes en présence de l'histone de liaison H1, sont en faveur du modèle solénoïde (Robinson *et coll.*, 2006). Ces mesures montrent que l'augmentation de la taille de l'ADN de liaison n'induit pas d'augmentation du diamètre de la fibre comme le suppose le modèle "zig zag" (Robinson *et coll.*, 2006).

Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par l'absence de l'histone de liaison dans les reconstitutions de chromatine réalisées par le laboratoire de Tim Richmond (Dorigo *et coll.*, 2004; Schalch *et coll.*, 2005). Cependant, ces deux modèles ne sont pas exclusifs : la chromatine pourrait adopter une structure compacte en présence des histones de liaison et relâchée en leur absence (Robinson and Rhodes, 2006).

I.1.3. Territoires chromatiniens

En interphase, la chromatine n'est pas homogène, au contraire elle est organisée en régions plus ou moins condensées. Ces territoires chromatiniens affectent l'expression des gènes ainsi que la stabilité des chromosomes. On considère que la chromatine se divise en deux compartiments distincts d'un point de vue structural, fonctionnel et cytologique: l'euchromatine, riche en gène et l'hétérochromatine contenant peu de gènes et beaucoup de séquences répétées (figure 6) (Grewal and Elgin, 2007).

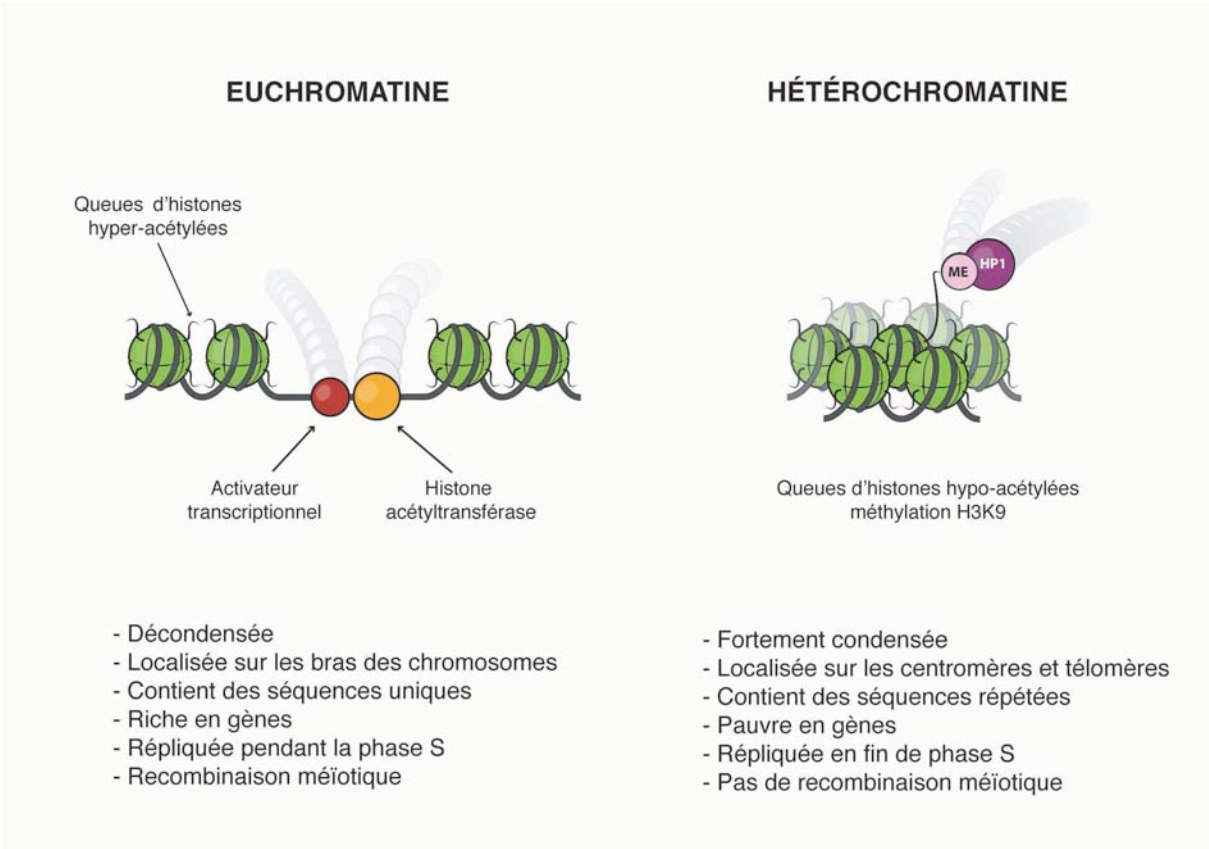


Figure 5 : Propriétés des régions euchromatiques et hétérochromatiques

L'euchromatine décondensée et riche en gène est permissive à la transcription. Par opposition à l'hétérochromatine, fortement condensée et pauvre en gène réfractaire à la transcription.
Adapté de (Grewal and Elgin, 2007)

I.1.3.1. L'euchromatine

L'euchromatine se trouve sous une forme relâchée en interphase, mais se compacte lors des divisions cellulaires. Cette compaction coïncide avec l'arrêt de la synthèse des ARNm pendant la mitose. La réplication de ces régions interviendrait tôt pendant la phase S, cependant de récentes expériences tendent à nuancer cette affirmation (Kim *et coll.*, 2003).
Certaines modifications d'histone sont observées avec une plus grande fréquence dans le compartiment euchromatinien, c'est le cas de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me) (Santos-Rosa *et coll.*, 2002), de la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me) (Bernstein *et coll.*, 2005) et de l'hyperacétylation des histones H3 et H4 (H3ac, H4ac) (figure 6) (Grunstein, 1997).

I.1.3.2. L'hétérochromatine

a. Propriétés

L'hétérochromatine peut être défini d'après les observations cytologiques comme la portion de la chromatine restant complètement condensée pendant toute la durée du cycle cellulaire. Fonctionnellement, les régions hétérochromatiques sont réfractaires à la transcription, la recombinaison , et la réparation ; en outre elles se répliquent plus tardivement que le reste du génome. Toutefois, l'hétérochromatine n'est pas totalement inerte, elle nécessite même d'être transcrite à faible niveau pour se former (figure 6) (Grewal and Elgin, 2007). L'hétérochromatine participe également à la réplication, et la ségrégation des chromosomes (Nagaki *et coll.*, 2004).

L'hétérochromatine peut également être décrite du point de vue de sa structure et composition (figure 6). En 1993, Jeppesen et Turner ont montré dans des cellules humaines et murines que l'hétérochromatine, qu'elle soit constitutive ou facultative, se trouve dépourvue d'histones acétylés (Jeppesen and Turner, 1993). Par la suite, de nombreuses études ont caractérisé un fort niveau de méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 dans de nombreux organismes, de la levure *S. pombe* (mais absente de *S. cerevisiae*) aux mammifères et aux plantes (figure 6) (Litt *et coll.*, 2001; Nakayama *et coll.*, 2000; Taverna *et coll.*, 2002). Le mécanisme de formation de l'hétérochromatine est très conservé de la levure jusqu'à l'homme (Grewal and Elgin, 2007).

b. Hétérochromatine constitutive

L'hétérochromatine constitutive regroupe quant à elle une grande partie des séquences répétées du génome, elle se situe principalement au niveau des centromères et des régions péri-centromériques, des télomères et des organisateurs nucléolaires (figure 6) (Grewal and Elgin, 2007). L'hétérochromatine constitutive est généralement pauvre en gènes, riche en séquences hautement et moyennement répétées, telles que les séquences satellites (figure 6) (Grewal and Elgin, 2007).

Les séquences condensées sous forme d'hétérochromatine constitutive sont pour l'essentiel des séquences répétées, très peu de gène y sont représentés (Grewal and Elgin, 2007).

L'hétérochromatine est nécessaire à l'intégrité du génome. Elle joue en effet un rôle important dans la ségrégation des chromosomes et la protection des télomères contre leur dégradation (Bernard *et coll.*, 2001; Garcia-Cao *et coll.*, 2004).

L'hétérochromatine constitutive est un état stable et irréversible de la chromatine qui est transmis entre chaque division cellulaire. Elle peut également affecter l'expression de gènes. En effet, un gène situé près d'une région d'hétérochromatine constitutive voit son expression inactivée. Ce phénomène est décrit chez la Drosophile sous le nom de "variégation d'effet de position" (PEV) (Henikoff, 1990).

La structure de l'hétérochromatine, dictée à la fois par les modifications des histones et de l'ADN, est transmissible de manière stable à travers les mitoses, et constitue donc une forme de mémoire cellulaire (Grewal and Elgin, 2007).

c. Hétérochromatine facultative

L'hétérochromatine facultative correspond aux régions pouvant adopter de façon réversible les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'hétérochromatine constitutive en fonction de stades de développement particuliers ou dans des types cellulaires donnés.

Un exemple bien caractérisé de formation d'hétérochromatine facultative est l'inactivation du chromosome X aboutissant à une constitution différente de la chromatine des deux allèles (chapitre I.2.3.).

I.1.4. Assemblage et remodelage de la chromatine

I.1.4.1. Assemblage de la chromatine

Les processus cellulaires impliquant une réorganisation de la chromatine tels que la réplication, la transcription, ou la réparation de l'ADN nécessitent le remplacement des histones éjectées. L'expression des histones canoniques est régulée par rapport au cycle cellulaire, leur déposition est strictement couplée à la réplication de l'ADN.

L'incorporation des variants d'histones échappe à cette dépendance de la réplication, ceux ci peuvent être déposés à tout moment du cycle cellulaire.

L'assemblage correct des histones sur l'ADN nécessite l'assistance de facteurs appelés "chaperonnes d'histones" (Henikoff and Ahmad, 2005).

Il existe deux voies distinctes d'assemblage de la chromatine: l'une dépendante de la réplication de l'ADN (RD), et l'autre indépendante de la synthèse d'ADN (RI) utilisée notamment lors de la réparation ou de la transcription (Henikoff and Ahmad, 2005). Chacune de ces voies d'assemblage nécessite l'intervention de chaperonnes incorporant des variants d'histones spécifiques.

L'élucidation des mécanismes de l'assemblage de la chromatine est cruciale pour la compréhension du caractère héritable de certaines modifications de la chromatine. L'autre enjeu important de la compréhension de l'assemblage RI réside en l'identification des facteurs responsables de l'incorporation des variants d'histone sur leurs séquences cibles.

I.1.4.2. Assemblage dépendant de la réplication (RD)

Le dépôt des nucléosomes se fait rapidement après la synthèse d'ADN. Les expériences de microscopie électronique réalisées après liaison covalente induite au psoralène montrent que les nucléosomes se reforment environ 250 pb en aval de la fourche de réplication (Sogo *et coll.*, 1986). L'assemblage de la chromatine au niveau de la fourche de réplication requiert des facteurs d'assemblage et des chaperonnes d'histones.

Les histones H3-H4 forment un complexe stable avec des facteurs d'assemblages qui facilitent et régule la déposition sur l'ADN. Parmi ces facteurs, CAF-1 *(Chromatin Assembly factor 1*) composé des trois sous unités p150/p60/RbAp48 assiste la déposition du tétramère (Verreault *et coll.*, 1996). CAF-1 cible les histones sur la fourche de réplication en interagissant directement avec PCNA via p150 (Shibahara and Stillman, 1999). CAF-1 est assistée par Asf1 (*Anti-silencing function 1*).

Dans les cellules humaines en prolifération, Asf1 est la chaperonne majoritaire contrôlant l'incorporation des histones nouvellement synthétisées en phase S (Groth *et coll.*, 2005). Asf1 joue une fonction cellulaire essentielle puisque sont absence est létale chez *S. pombe*, la drosophile et le poulet (Sanematsu *et coll.*, 2006).Asf1 requière la présence de CAF-1 pour incorporer les histones (Munakata *et coll.*, 2000). Le rôle de Asf1 semble d'être

le transfert des histones libres à CAF-1 (Groth *et coll.*, 2005). La structure de Asf1 suggère que Asf1 pourrait dissocier le tétramère, ce qui pourrait avoir des conséquences sur le mode d'assemblage de la chromatine (voir la suite) (Natsume *et coll.*, 2007).

Selon le modèle actuel, le tétramère $(H3\text{-}H4)_2$ est d'abord déposé sur l'ADN puis les deux dimères H2A-H2B viennent ensuite s'ajouter (Almouzni *et coll.*, 1990; Smith and Stillman, 1991; Worcel *et coll.*, 1978).

Cependant de récentes données suggèrent que l'assemblage de la chromatine pourrait être semi-conservatif (Natsume *et coll.*, 2007; Tagami *et coll.*, 2004). L'assemblage semi-conservatif implique que l'information épigénétique portée par les modifications d'histones pourrait être transmise lors de la réplication. Les indices supportant l'existence d'une réplication semi-conservative de la chromatine reposent sur la supposition qu'un nucléosome nouvellement assemblé contiendrait un dimère (H3-H4) parental et un dimère (H3-H4) nouvellement synthétisé.
Les données appuyant cette théorie se basent (Natsume *et coll.*, 2007) sur le fait que les chaperonnes impliquées dans la déposition du tétramère : HIRA et CAF ont été co-purifiées avec des dimères H3-H4 et H3.3-H4 et non pas associées à des tétramères (Tagami *et coll.*, 2004). De plus, Asf1 est également associé à des dimères H3-H4 en solution et non avec des tétramères. La structure de Asf1 semble indiquer que cette chaperonne aurait pour fonction la dissociation des tétramères $(H3\text{-}H4)_2$ stables en solution en deux dimères H3-H4 (Natsume *et coll.*, 2007).

Nap1 (*Nucleosome Assembly Protein 1*) est conservée chez tous les eucaryotes, depuis la levure jusqu'à l'homme (Park and Luger, 2006). La chaperonne d'histone Nap1 montre une affinité pour les quatre histones de cœur *in vitro*, mais co-purifie préférentiellement avec H2A/H2B (Ishimi *et coll.*, 1984; Ishimi *et coll.*, 1987; Ito *et coll.*, 1996). Plusieurs études récentes indiquent que Nap1 incorpore les histones d'une façon couplée à la réplication mais également indépendamment de la synthèse d'ADN. Deux études réalisées chez *S. cerevisiae* montrent que Nap1 exerce sa fonction sous forme de dimère (McBryant *et coll.*, 2003; Toth *et coll.*, 2005).
Des expériences de microscopies indiquent que Nap1 est localisé dans le cytoplasme pendant la phase G2 du cycle cellulaire, NAP1 entre dans le noyau en phase S (Ito *et coll.*, 1996),

suggérant que Nap1 pourrait faire la navette entre ces deux compartiments cellulaires. Le fait que Nap1 interagisse avec Kap114p qui est une importine, supporte l'idée que sa fonction serait l'import nucléaire de H2A-H2AB (Mosammaparast *et coll.*, 2002).

L'incorporation d'histones en cours de réplication est cruciale pour maintenir la densité en nucléosome. Chez *S. cerevisiae*, la déplétion en histone H4 pendant la phase S est létale (Kim *et coll.*, 1988). Malgré, l'expression forcée de H4 pendant la phase G2, les levures meurent, donc l'expression de H4 en G2 ne permet pas de supplémenter le déficit de la phase S (Kim *et coll.*, 1988), démontrant que l'assemblage de la chromatine RC est vital.

Les mutants nuls pour les sous-unités de CAF-1 sont viables et présentent des défauts de *silencing* des télomères et de réparation aux dommages à l'ADN, mais leur densité nucléosomale n'est pas altérée (Enomoto and Berman, 1998; Kaufman *et coll.*, 1997).

La survie des levures en l'absence de CAF-1 suggère qu'il existe des voies alternatives de l'assemblage de la chromatine RC.

I.1.4.3. Assemblage indépendant de la réplication (RI)

Les variants d'histones synthétisés durant tout le cycle cellulaire, ont quant à eux, la possibilité d'être incorporés indépendamment de la réplication de l'ADN. Les variants d'histone sont pris en charge et incorporés dans la chromatine par des chaperonnes spécifiques (table 1). Certains variants d'histone comme H3.3 jouent un rôle fondamental dans l'assemblage RI de la chromatine (Malik and Henikoff, 2003).

Ainsi l'assemblage RI fait toujours intervenir le variant d'histone H3.3 (Ahmad and Henikoff, 2002) (chapitre I.3.2.3). Par immuno-précipitation, l'histone canonique H3 co-purifie la chaperonne CAF-1, alors que le variant H3.3 co-purifie la chaperonne HIRA (Tagami *et coll.*, 2004).

HIRA est la chaperonne en charge de l'incorporation indépendante de la réplication spécifique de l'histone H3.3 (Loppin *et coll.*, 2005). HIRA qui interagit physiquement avec Asf1, est capable de déposer *in vitro* H3-H4 (Green *et coll.*, 2005; Prochasson *et coll.*, 2005).

En plus des chaperonnes, l'incorporation de H3.3 fait également intervenir un complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant appelé CHD1 (chapitre I.1.5) (Konev *et coll.*, 2007) .

Le variant H2A.Z est incorporé par le complexe de remodelage SWR1 et la chaperonne Chz1 (Kobor *et coll.*, 2004; Krogan *et coll.*, 2003a; Mizuguchi *et coll.*, 2004) (Luk *et coll.*, 2007). Chz1 s'associe préférentiellement au dimère H2A.Z-H2B (Luk *et coll.*, 2007).

Histones	Caractéristiques	Chaperonne (espèce)
H2A, H2B	Histones canoniques incorporés de façon réplication dépendante	**FACT** (Levure, Drosophile)
H2B.FWT	Variant de H2B, spécifique à l'homme impliqué dans la spermatogenèse	inconnue
H2A.Z	Variant de H2A conservé pratiquement chez tous les eucaryotes	**SWR1** (Levure) **Tip60** (Drosophile) **Chz1** (Levure)
macroH2A	Variant de H2A spécifique des vertébrés	inconnue
H2A.X	Variant de H2A possédant le motif SQ(E/D)† (†=aa hydrophobe) dans le lequel cette sérine est phosphorylée lors de cassures doubles brins	**INO80** (Levure)
H2A.Bbd	Variant de H2A spécifique des vertébrés	inconnue
H3,H4	Histones canoniques incorporés de façon réplication dépendante	**CAF-1** (plantes, animaux, champignons) **CHD1** (Drosophile)
H3.3	Variant de H3 incorporé en dehors de la réplication.	**HIRA** (Mammifère, Drosophile)

Table 1 : Chaperonnes d'histones

I.1.5. Complexes de remodelage ATP-dépendants

In vitro, le nucléosome représente une barrière pour la transcription par l'ARNPolII (Knezetic and Luse, 1986; Lorch *et coll.*, 1987). Par conséquent, la modulation de l'accessibilité de l'ADN est cruciale pour de nombreux processus cellulaires incluant également la réplication, la réparation, et la recombinaison.

Cette régulation fait intervenir des complexes de remodelage capables de modifier de façon non-covalente le nucléosome (figures 5,6). Par le biais d'un mécanisme dépendant de l'ATP, ces complexes de remodelage altèrent les interactions histone-ADN, facilitant l'accès

de l'ADN aux facteurs diffusibles (pour revue: (Saha *et coll.*, 2006)). Le mécanisme par lequel l'hydrolyse de l'ATP est convertie en force mécanique capable de déplacer l'octamère n'est pas connu. Plusieurs modèles de mécanismes moléculaires, faisant intervenir la création de défauts de torsion de l'ADN ou la formation d'une boucle d'ADN qui se propagerait, ont été proposés (Saha *et coll.*, 2006).

L'action des facteurs de remodelage de la chromatine a trois conséquences fonctionnelles sur le nucléosome (figure 5) (Langst and Becker, 2001; Lorch *et coll.*, 2006; Lorch *et coll.*, 2001):

- la perturbation de la structure du nucléosome
- le déplacement en *cis* de l'octamère par glissement
- la translocation en *trans* par transfert de dimère H2A-H2B

Il existe de nombreux complexes de remodelage de fonction et de composition diverses. Tous ont en commun l'appartenance à la famille Snf2 des ATPases (figure 8) (Eisen *et coll.*, 1995). Ces complexes peuvent être divisé en 4 classes suivant les similarités de leurs sous-unités ATPases (Eberharter and Becker, 2004):

- SWI/SNF (*mating type SWItching/Sucrose Non Fermenting*)
- ISWI (*Imitation of SWItch*)
- CHD (*Chromodomain Helicase/ATPase DNA binding protein*)
- INO (*INOsitol*) / SWR

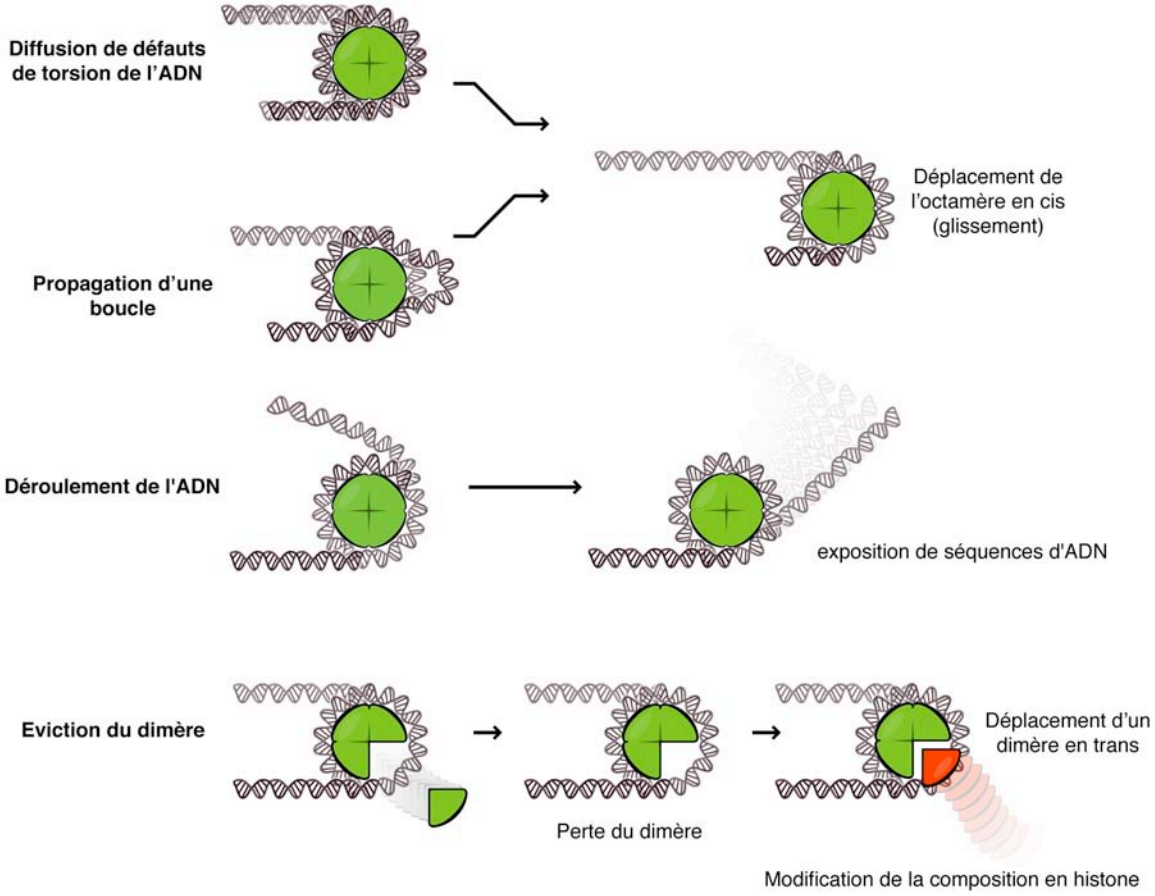


Figure 6 : Actions des complexes de remodelage ATP-dépendant

Conséquences de l'action des complexes de remodelage ATP-dépendant sur la position, la structure, et la fonction des nucléosomes. Les deux mode d'actions hypothétiques des facteurs de remodelage sont la création de défauts de torsion de l'ADN et la création de d'une boucle. Ces deux types d'interventions potentielles aboutissent à la même conséquence qui est le déplacement de l'octamère par glissement. Ce repositionnement du nucléosome modifie l'exposition des séquences préalablement masquées par le nucléosome.
Les complexes de remodelage peuvent dérouler l'ADN complexé autour de l'octamère d'histone. Cette action entraîne également un démasquage de séquences d'ADN.
Les facteurs de remodelage catalysent aussi l'éviction du dimère (H2A-H2B). La perte du dimère favorise la mise en œuvre de processus nécessitant un accès à l'ADN comme la transcription ou la réparation. L'absence de dimère peut également permettre l'échange de dimères, qui est un moyen utilisé par la cellule pour modifier la composition en histones du nucléosome par l'incorporation de variant d'histone.

I.1.5.1. Fonctions biologiques

SWI/SNF

Le premier complexe caractérisé fut le complexe SWI/SNF chez la levure *S. cerevisiae* (Peterson and Tamkun, 1995; Winston and Carlson, 1992). C'est un gros complexe d'environ 2 MDa conservé depuis la levure jusqu'à l'homme.
L'action du complexe SWI/SNF est positif sur la transcription (Hirschhorn *et coll.*, 1992). Toutefois, SWI/SNF ne semble pas être un régulateur majeur de la transcription puisque celui-ci est essentiel pour la régulation de l'expression d'environ 6% des gènes chez *S. cerevisiae* (Holstege *et coll.*, 1998; Sudarsanam *et coll.*, 2000). Les études à grande échelle (génome entier) montrent que les complexes de remodelage ont à la fois un rôle positif et négatif sur la transcription (Armstrong *et coll.*, 2002; Ng *et coll.*, 2002).
Les facteurs de la famille SWI/SNF sont également impliqués dans la réparation de l'ADN (Chai *et coll.*, 2005).

D'autre part, RSC (*Remodel the structure of chromatin*), un membre de la famille SWI/SNF joue, entre autres, un rôle majeur dans l'organisation des centromères. En effet, RSC est important pour faciliter la liaison des cohésines au chromosome (Baetz *et coll.*, 2004). RSC interagit physiquement avec les kinétochores, sa perte de fonction induit un défaut de ségrégation des chromosomes (Hsu *et coll.*, 2003).

ISWI

Le complexe ISWI est important pour l'assemblage de la chromatine consécutivement à la réplication. ISWI est ciblé sur la fourche de réplication via l'interaction de sa sous-unité WSTF avec PCNA (Poot *et coll.*, 2004). Le complexe ISWI-ACF-1 est requis pour la réplication de l'hétérochromatine péricentrique (Collins *et coll.*, 2002).
Chez la drosophile ISWI apparaît également important pour le maintien de structures d'ordres supérieurs de la chromatine (Deuring *et coll.*, 2000).
En outre, il joue un rôle dans la cohésion des chromatides sœurs en promouvant la fixation de la cohésine Rad21 (Hakimi *et coll.*, 2002).

CHR

Les complexes de remodelage Mi2/NURD de la famille CHR ont pour fonction principale l'assistance de la déacétylation des histones par les histones déacétylases, cruciale pour la répression transcriptionnelle (chapitre I.3.3.2.) (Kehle *et coll.*, 1998; Xue *et coll.*, 1998). Mi2/NURD ont donc une action négative sur la transcription.

Ces exemples illustrent la diversité des processus biologiques dans lesquels les complexes de remodelage ATP-dépendant sont impliqués. Les modifications de la chromatine qu'ils catalysent orientent la différenciation cellulaire. Par conséquent les facteurs de remodelages ATP-dépendant sont requis pour le développement (Bultman *et coll.*, 2005; Chi *et coll.*, 2002; Gresh *et coll.*, 2005). L'invalidation génique chez la souris des sous-unités catalytiques est létale au stade embryonnaire (Lickert *et coll.*, 2004; Stopka and Skoultchi, 2003; Wang *et coll.*, 2004).

I.1.5.2. Interactions avec les variants d'histones

Les complexes de remodelage jouent également un rôle fondamental dans la modulation de la composition de la chromatine en permettant l'incorporation de variants d'histones. Certains complexes permettent l'incorporation de variants des histones H2A ou H2B en catalysant le transfert de dimères en *trans* (figure 7) ; d'autres sont nécessaires pour le dépôt de H3.3 via un mécanisme inconnu (Konev *et coll.*, 2007; Mizuguchi *et coll.*, 2004).

Chaque famille de complexes de remodelage est pourvue d'un domaine de liaison aux histones modifiés ou aux variants d'histones suggérant que les complexes de remodelage pourraient êtres recrutés sur leur séquence cible en fonction de la composition en histones de la chromatine (figure 8) (Bottomley, 2004). Toutefois, la présence d'autres sous unités et également importante pour déterminer la spécificité de ces complexes (Hakimi *et coll.*, 2002).

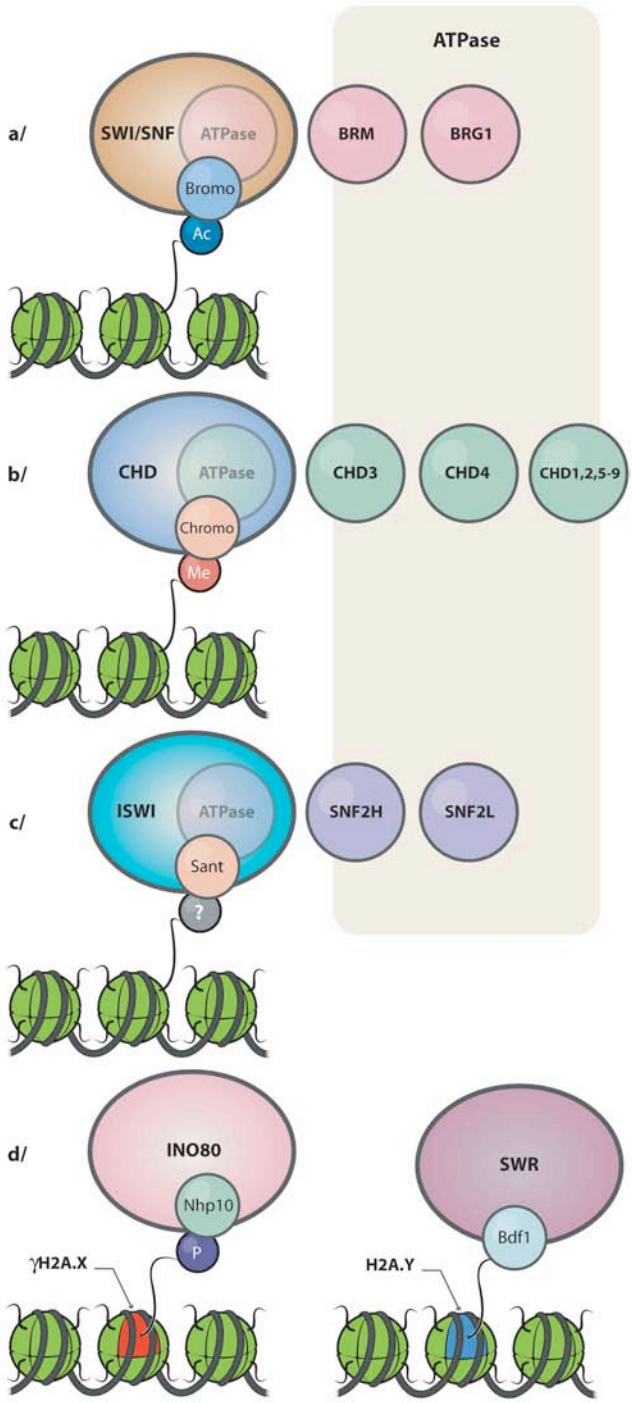


Figure 7 : Facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendant

Les quatre familles de remodelage ATP-dépendant les mieux caractérisés sont SWI/SNT, CHD, ISWI et INO80/SRW. Chaque famille de remodeleur possède un domaine ou une sous-unité capable de se lier à des nucléosomes de composition particulière. Les différents domaines à activité ATPase sont représentés à droite. La protéine INO80 est dotée d'une activité ATPase. Chaque classe d'enzyme forme un complexe avec d'autres protéines. Dans le cas de SWI/SNF, le complexe peut contenir comme sous unité ATPase soit "brahma" (BRM), soit "brahma like 1" (BRG1). L'association ISWI-SNF2H est retrouvée dans plusieurs complexes comme ACF (*ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*) ou RSF (*remodeling and spacing factor*). ISWI en association avec SNF2L sont des composants de NuRF (*nucleosome-remodeling factor)* et CERF (*CECR2-contaning remodeling factor*). La protéine CHD fait partie du complexe NuRD (*nuclesome remodeling and histone deacetylase*). SWR1 catalyse l'échange de dimère H2A-H2B par H2A.Z-H2B.

Les composants de la famille SWI/SNF (Snf2 et Sth2 chez la levure, brahma chez la drosophile et chez les mammifères qui ont également brahma-like 1) possèdent tous un bromo-domaine se liant spécifiquement aux histones acétylés (figure 8.a.) (Hassan *et coll.*, 2002). La sous-unité Bdf1 du complexe de remodelage SWR est également capable de se fixer aux queues d'histones acétylées (Matangkasombut and Buratowski, 2003).
Les protéines de la famille ISWI, quant à elles, sont pourvues d'un domaine SANT se fixant aux histones, potentiellement susceptible de reconnaître certaines modifications (figure 8.c.) (Boyer *et coll.*, 2004; Grune *et coll.*, 2003).
Les facteurs de la famille CHD sont caractérisés par la présence de deux chromo-domaines qui interagissent avec les queues d'histones méthylées (figure 8.b.) (Flanagan *et coll.*, 2005).
Le complexe de remodelage Ino80 est spécifiquement recruté par le variant d'histone H2A.X phosphorylé sur la sérine 129 (γ-H2A.X) via sa sous unité Nhp10 (figure 8.d.), et participe à la réparation de l'ADN (Chapitre I.3.2.4.) (Morrison *et coll.*, 2004; van Attikum *et coll.*, 2004).

INO80

Initialement, le gène *INO80* a été identifié lors d'un crible génétique des mutants affectant la biosynthèse de l'inositol chez *S. cerevisiae (Ebbert et coll., 1999).* INO80 est nécessaire pour la transcription du gène IN01en absence d'inositol chez la levure, par conséquent le complexe INO80 a une influence sur la transcription (Ebbert *et coll.*, 1999). À la différence des autres complexes de remodelage, Ino80 possède une activité hélicase *in vitro* (Shen *et coll.*, 2000).

Ino80 est impliqué dans la réparation de l'ADN: chez la levure, les mutants nuls Ino80 sont hyper-sensibles aux agents mutagènes (Shen *et coll.*, 2000). Ino80 est recruté sur le site de la lésion via une interaction directe avec γ-H2A.X (figure 8.d.) (Morrison *et coll.*, 2004; van Attikum *et coll.*, 2004). Le complexe Ino80 faciliterait l'accès à l'ADN pour les facteurs de réparation en déplaçant les nucléosomes à proximité de la lésion (Tsukuda *et coll.*, 2005). L'action de Ino80 entraîne le retrait des histones H3 et H2B sur environ 5 kb autour de la lésion (Tsukuda *et coll.*, 2005).
Ces données démontrent l'importance des complexes de remodelage ATP-dépendant et du variant H2A.X pour le processus de réparation de l'ADN.

SWR

Le complexe SWR a pour fonction l'incorporation du variant d'histone H2A.Z. Ainsi, SWR catalyse l'incorporation de H2A.Z par le remplacement du dimère canonique H2A-H2B par un dimère H2A.Z-H2B (figure 8.d.) (Mizuguchi *et coll.*, 2004). Le devenir du dimère H2A-H2B retiré n'étant pas connu, ce processus ne peut pas être qualifier "d'échange". La fonction de SWR s'apparente donc plutôt à une fonction de chaperonne d'histone. La sous-unité catalytique Swr1 contient un domaine ATPase/hélicase homologue à Swi2/Snf2, ce qui permet de classer SWR dans le groupe des facteurs de remodelage ATP-dépendant (Flaus *et coll.*, 2006; Krogan *et coll.*, 2003a). Chez les eucaryotes supérieurs, le complexe homologue à SWR fait partie du complexe appelé Tip60 (Jin *et coll.*, 2005).

Malgré l'identification d'une séquence de 22 pb suffisante pour promouvoir l'incorporation de H2A.Z *in vivo* (Raisner *et coll.*, 2005), le signal ciblant l'incorporation de H2A.Z n'est pas connu (chapitre I.3.2.5.). Une possibilité serait que SWR soit recruté par une modification d'histone. La sous-unité Bdf1 qui possède deux bromo-domaines se fixant sur les queues d'histones acétylées pourrait jouer cette fonction (Matangkasombut and Buratowski, 2003). Cette hypothèse est soutenue par le fait que la délétion de Bdf1 associée aux mutations ponctuelles des lysines de H3 et H4, entraîne une diminution la quantité de H2A.Z sur les promoteurs (Raisner *et coll.*, 2005; Zhang *et coll.*, 2005a). Il a également été proposé que SWR pourrait être recruté par des facteurs de liaison de l'ADN (Raisner *et coll.*, 2005).

CHD1

Récemment, le complexe de remodelage ATP-dépendant CHD1 a été identifié comme nécessaire pour le dépôt du variant de l'histone H3.3 (Konev *et coll.*, 2007). En effet, l'élimination de CHD1 chez la Drosophile abolit le remplacement des protamines par des histones (au cours duquel H3.3 remplace H3) dans le pronoyau mâle lors de la fécondation (Konev *et coll.*, 2007). L'interaction physique de CHD1 avec HIRA *in vivo*, suggère que la spécificité de CHD1 envers H3.3 pourrait faire intervenir HIRA (Konev *et coll.*, 2007).
Cette étude est la première à rapporter la nécessité d'un complexe de remodelage ATP-dépendant pour l'incorporation du tétramère. Le mécanisme réactionnel par lequel un complexe de remodelage catalyse l'incorporation du tétramère est inconnu. CHD1 pourrait déstabiliser les structures existantes pour permettre à HIRA de jouer son rôle de chaperonne ;

une autre possibilité serait que CHD1 soit capable d'incorporer le tétramère contenant H3.3 dans la chromatine indépendamment de HIRA.

La nécessité de l'action exercée par les complexes de remodelage pour l'incorporation des variants d'histones démontre que chaperonnes d'histone et facteurs de remodelage agissent de concert afin d'incorporer les variants dans la chromatine indépendamment de la réplication de l'ADN.

I.2. Régulations épigénétiques

I.2.1. Définition

Historiquement, les phénomènes épigénétiques ont été initialement définis comme "les processus gouvernant l'expression du génotype en phénotype durant le développement" (Waddington, 1942). Pendant le développement, le zygote totipotent donne naissance à un organisme composé de différents types cellulaires, par l'intermédiaire de changements de nature de la chromatine. Ces modifications de la chromatine sont à la base de ces phénomènes non expliqués par la génétique, appelés "épigénétiques".
En effet, l'identité d'une cellule donnée, ce qui fait qu'un neurone est un neurone ou qu'une cellule souche est une cellule souche, est en grande partie contrôlée par l'état de la chromatine duquel dépend la transcription de l'ADN.

Plus tard est apparue la notion d'héritabilité de l'information épigénétique, et l'on a considéré l'épigénétique comme "l'étude des modifications stables et héréditaires (par la mitose et/ou la méiose) changeant l'expression des gènes ou l'identité des cellules, sans modification de la séquence d'ADN" (Russo, 1996).

L'élucidation récente de mécanismes moléculaires sous-jacents aux phénomènes épigénétiques a mis en évidence que la composition en histones, de petits ARN ainsi que des protéines liant l'ADN (comme les protéines polycombs) sont à l'origine des orientations de l'expression du programme génétique qui gouverne la différenciation cellulaire (Goldberg *et coll.*, 2007).
L'héritabilité de ces composants de la chromatine n'ayant pas été démontrée, la définition proposée par Russo est devenue trop restrictive pour englober l'ensemble des événements à l'origine des phénomènes épigénétiques observés.

Dans ce manuscrit, nous reviendrons à la définition initiale, plus ouverte, en considérant l'épigénétique comme "l'interaction des gènes avec leurs produits donnant naissance au phénotype" (Waddington, 1942).

I.2.2. L'empreinte génomique parentale

L'empreinte génomique parentale est un mécanisme de régulation de l'expression génique consistant en l'expression d'un gène depuis un seul des deux chromosomes parentaux: cette expression est dite "mono-allélique". L'empreinte génomique parentale est un phénomène épigénétique établi pendant la gamétogenèse et transmis à chaque division cellulaire (Bird, 2002).

Ce processus d'inactivation d'un allèle est fortement associé à la méthylation de l'ADN chez les mammifères et les plantes (Scott and Spielman, 2006) (chapitre I.3.1.).
Les îlots CpG des allèles soumis à l'empreinte sont méthylés pendant la gamétogenèse par l'ADN méthyltransférase Dnmt3a et son cofacteur Dnmt3-like (Dnmt3l) (Bourc'his *et coll.*, 2001; Kaneda *et coll.*, 2004). La reconnaissance des *loci* soumis à la méthylation fait intervenir des marques d'histones préexistantes. Ainsi, Dnmt3l se lie spécifiquement aux nucléosomes dont la queue de l'histone H3 n'est pas méthylée sur la lysine 4 (Ooi *et coll.*, 2007).

Après la fertilisation, la méthylation des gènes soumis à l'empreinte est maintenue, d'abord par l'isoforme de Dnmt1 (*DNA methyltransferase 1*) exprimée dans l'ovocyte appelée Dnmt1o pendant les stades précoces du développement préimplantatoire (Howell *et coll.*, 2001), puis par Dnmt1 dans l'embryon et chez l'adulte (Li *et coll.*, 1993).

Dans cellules germinales primordiales (PGC), la méthylation des gènes soumis à l'empreinte est effacée afin de permettre l'établissement d'une nouvelle empreinte dans la lignée germinale (Hajkova *et coll.*, 2002; Lee *et coll.*, 2002). Tout le profil de méthylation du génome n'est pas perdu dans les PGC puisque les rétrotransposons et séquences répétées restent méthylés (Lane *et coll.*, 2003). Le mécanisme aboutissant à l'effacement spécifique de la méthylation des gènes soumis à l'empreinte dans les PGC n'est pas connu.

Le variant d'histone macroH2A1, enrichi sur les promoteurs des gènes soumis à l'empreinte pourrait intervenir pour réprimer la transcription de l'allèle méthylé (Choo *et coll.*, 2006). L'implication de macroH2A1 dans l'empreinte génomique parentale sera discutée chapitre I.3.2.6..

I.2.3. L'inactivation du chromosome X

L'inactivation du chromosome X est un processus épigénétique aboutissant à la répression d'un chromosome entier par la formation d'hétérochromatine facultative.

Chez les mammifères femelles, la présence de deux chromosomes X est compensée par la répression transcriptionnelle de l'un des deux (Lyon, 1961). Ce processus, appelé inactivation du X aboutissant à la répression de la majorité des gènes localisés sur le chromosome X inactif (Xi) permet la compensation de dose des gènes liés à l'X entre les sexes.

Le Xi est alors compacté dans un état chromatinien alternatif caractérisé par certaines modifications d'histones, l'incorporation de variants, et l'association en *cis* d'un ARN non codant appelé Xist (*X-inactive-specific transcript*) (Avner and Heard, 2001) (table 2).

L'inactivation du chromosome X se déroule pendant l'embryogenèse, celle-ci est de deux types: l'inactivation par l'empreinte se produisant pendant les étapes précoces du développement où le chromosome X paternel (Xp) est inactivé, et l'inactivation aléatoire consécutive à la réactivation du Xp au moment de l'implantation de l'embryon. L'inactivation aléatoire se décompose en plusieurs étapes comprenant le choix du chromosome X actif, le *silencing* du Xi et le maintien du Xi entre chaque division cellulaire (figure 9).

Spécificités du Xi	Description
Xist	ARN non codant
Protéines polycombs (PcG)	PRC1 (Eed, Ezh2, Suz12) PRC2 (Bmi-1, Phc1, Phc2, Cbx2, Cbx7, Ring1a, Ring1b)
Modifications d'histones	Histone H3 Lysine 27 tri-méthylation (par PRC2) Histone H2A Lysine 119 mono-ubiquitination (par PRC1) Histone H4 Lysine 20 mono-méthylation Histone H3 Lysine 9 diméthylation Histone H4 hypo-méthylation
Histone variant	Enrichissement MacroH2A Déplétion H2A.Z Déplétion H2A.Bbd
Autres protéines associées	SAF-A (associé à la matrice nucléaire) BRCA1
Autres propriétés	Exclusion de l'ARN polymérase II Réplication tardive

Table 2 : Caractéristiques du chromosome X inactif

I.2.3.1. Inactivation par l'empreinte

Dans les premiers stades de l'embryogenèse chez les euthériens (ou mammifères placentaires), l'inactivation est initialement soumise à l'empreinte (par opposition à l'empreinte aléatoire). C'est-à-dire que le chromosome X hérité du père (Xp) est spécifiquement réprimé (Huynh and Lee, 2003; Okamoto *et coll.*, 2004).

Dès les premiers stades 2-4 cellules, Xist est transcrit depuis la copie hérité du père et décore le chromosome X paternel (figure 9) (Huynh and Lee, 2003; Okamoto *et coll.*, 2004). Le Xp est inactivé à partir du stade 4 cellules et porte toutes les marques de l'hétérochromatine (méthylation des histones H3K9 et H3K27, hypo-méthylation de H3K4, présence des protéines polycombs EED/EZH2) (figure 9) (table 2) (Okamoto *et coll.*, 2004).

L'inactivation du Xp par l'empreinte est transitoire, elle est sélectivement renversée dans les cellules de la masse interne du blastocyste, après l'extinction de l'expression de Xist depuis le Xp (figure 9) (Mak *et coll.*, 2004). La réactivation du Xp s'effectue exclusivement dans les cellules totipotentes (nanog positives) (Mak *et coll.*, 2004). Ce résultat est en accord avec les précédentes observations d'une réversibilité de l'inactivation induite par Xist dans les cellules souche embryonnaires (issues de la masse interne du blastocyste) (Wutz and Jaenisch, 2000).

L'inactivation par empreinte demeure dans les cellules se différenciant en tissu extra-embryonnaire (trophectoderme et l'endoderme primitif) (figure 9).

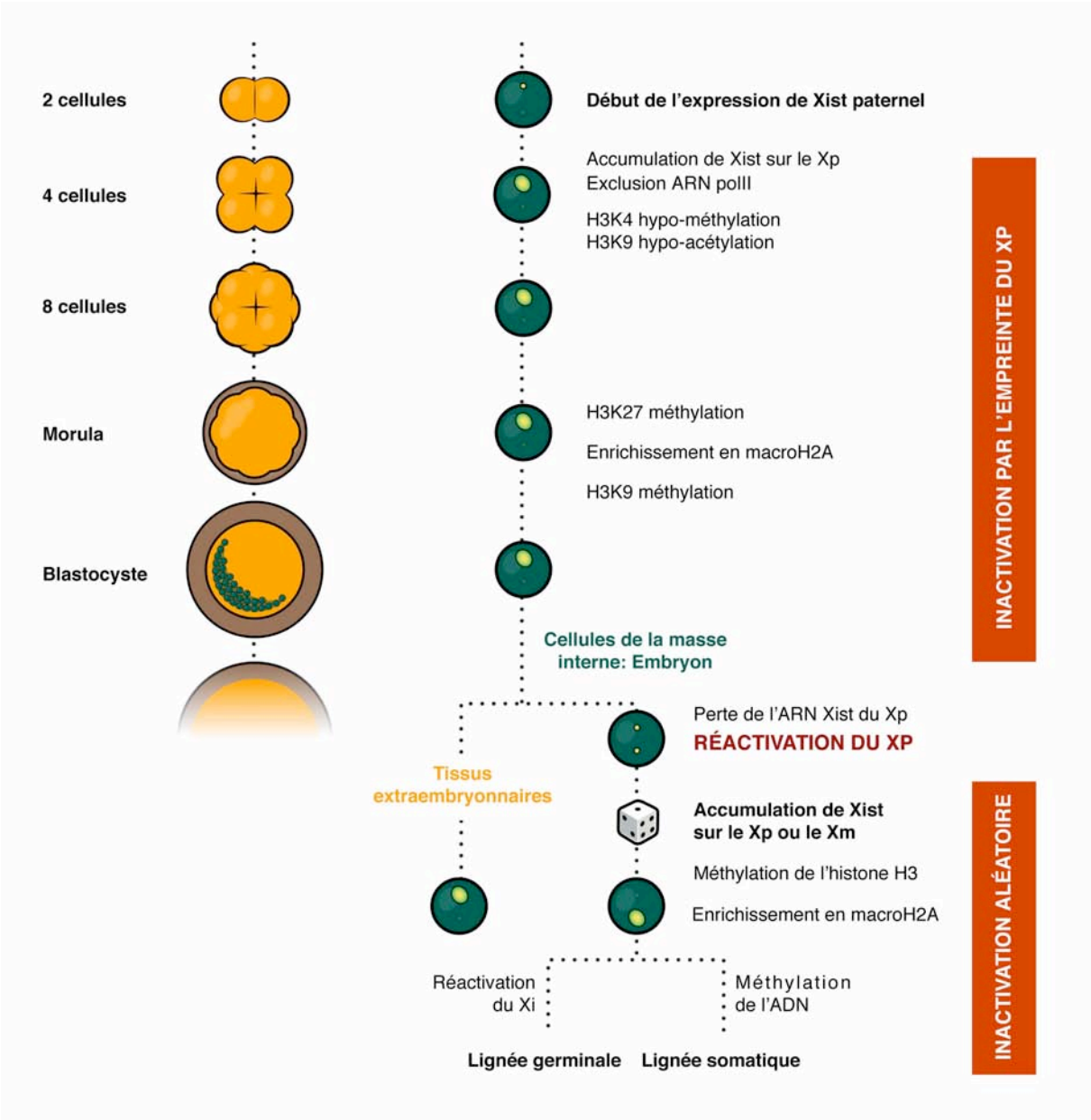


Figure 8 : Cinétique de l'inactivation du chromosome X chez la souris

Au stade deux cellules, l'expression de l'ARN Xist commence depuis le chromosome X hérité du père (Xp). Au stade quatre cellules, Xist s'accumule sur le Xp. MacroH2A1 se concentre sur le futur Xi dès le stade quatre cellules. Puis, le recrutement des protéines polycombs abouti à la méthylation H3K9 et H3K27 consécutivement à la déméthylation de H3K4 et à la déacétylation de H3. Dans les cellules formant le blastocyste le Xp est inactivé.
Les cellules du trophectoderme et de l'endoderme primitif (formant la lignée extra-embryonnaire) l'état inactif du Xp est maintenu. À l'inverse, dans les cellules de la masse interne du blastocyste, le Xp se réactive, perdant Xist et les protéines polycomb qui lui était associées. Les cellules formant l'épiblaste (le futur embryon) contiennent donc deux chromosomes X actifs avant l'inactivation aléatoire du Xp ou du Xm. L'inactivation aléatoire se met en place depuis la transcription de Xist à partir de l'un des deux allèles.
Dans la lignée germinale femelle, les chromosomes X inactifs se réactivent juste avant la méiose.

I.2.3.2. Inactivation aléatoire

Dans les cellules de la masse interne du blastocyste donnant l'épiblaste, le chromosome X s'exprime de manière bi-allélique. L'inactivation aléatoire se met en place après l'implantation de l'embryon (figure 9). Le choix du Xi est aléatoire, l'inactivation génère de cette façon une mosaïque de cellules ayant soit le Xm, soit le Xp inactivé (Avner and Heard, 2001). Une fois établie, l'inactivation est stable et héritée de façon clonale au cours des divisions cellulaires (Avner and Heard, 2001).

Les premiers événements conduisant à l'inactivation du X consistent en un comptage du nombre de chromosome (s) X présent (s) dans la cellule, puis au choix du (des) chromosome (s) à réprimer. Les mécanismes moléculaires mis en jeu lors des ces étapes précoces ne sont pas caractérisés. Toutefois de récentes études mettent en évidence un appariement entre les deux chromosomes X dans les instants précédant l'initiation de l'inactivation (Bacher *et coll.*, 2006; Xu *et coll.*, 2006). Ce contact entre les deux chromosomes semble important à la fois pour le comptage et pour le choix (Bacher *et coll.*, 2006; Xu *et coll.*, 2006).

La reconnaissance et l'initiation de l'inactivation sont sous le contrôle d'une région du chromosome X appelé *Xic* (*X inactivation center*) s'étendant sur environ 1Mb et codant pour quatre transcrits non codant dont Xist et son antisens Tsix (Avner and Heard, 2001).

Une mutation située dans la partie 3' de *Xist* entraîne un défaut de comptage du nombre de chromosome X et aboutit à l'inactivation systématique du chromosome y compris dans les mâles et les femelles hétérozygotes (Clerc and Avner, 1998; Morey *et coll.*, 2004). Une séquence bipartite essentielle pour le comptage a pu être identifié (Morey *et coll.*, 2004), sa délétion abolit l'appariement des deux chromosomes X avant l'inactivation (Bacher *et coll.*, 2006; Xu *et coll.*, 2006). Ces données démontrent que les séquences nécessaires pour le comptage sont contenues dans le locus *Xic.*

L'ajout de *Xic* sur un autosome en transgène est suffisant pour promouvoir l'inactivation de ce chromosome entier (Lee and Jaenisch, 1997; Lee *et coll.*, 1996). Ce résultat important démontre que la seule présence de *Xic* suffit pour initier l'inactivation du chromosome entier.

I.2.3.3. Rôle de l'ARN Xist

L'événement déclencheur de l'inactivation est la transcription de l'ARN non codant Xist depuis le futur chromosome X inactif (Xi). Ainsi, dans les cellules ES femelles non différenciées, Xist est transcrit à faible niveau de façon bi-allélique. Après différenciation, l'inactivation du X se met en place et Xist devient fortement transcrit depuis l'allèle qui sera inactivé (figure 10).

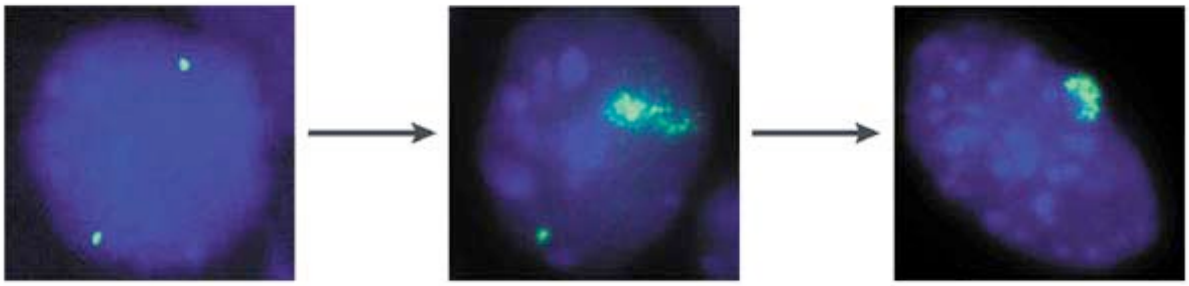


Figure 9 : Expression de l'ARN Xist dans les cellules souches embryonnaires

Localisation par FISH de Xist dans des ES femelles en cours de différenciation. L'image de gauche montre le noyau d'une cellule ES non-différenciée dans lequel Xist est transcrit depuis les deux allèles. L'image du centre montre qu'au cours de la différenciation, l'ARN Xist, traduit depuis un seul des deux allèles se stabilise et décore le chromosome en *cis*. Pendant cette étape le chromosome X actif continue d'exprimer Xist à un faible niveau. Le paneau de droite montre le noyau d'une cellule ES différenciée dans lequel Xist décore le Xi et l'expression de Xist depuis le Xa est réprimée.
D'après (Avner and Heard, 2001)

L'invalidation génique de Xist dans des cellules ES a permis de monter que la présence de Xist est absolument nécessaire à l'initiation du processus d'inactivation (Penny *et coll.*, 1996). L'expression inductible d'une copie de Xist insérée sur différents autosomes ou sur le X, est suffisante pour initier la répression de tous les gènes localisés sur le chromosome portant le transgène, quelque soit les séquences adjacentes (limitée au chromosome portant le transgène) (Wutz and Jaenisch, 2000). Cette inactivation induite dans les ES non différenciées, n'est pas accompagnée des caractéristiques du Xi que sont l'hypo-acétylation des histones et la réplication tardive (Wutz and Jaenisch, 2000). 72 heures après induction de la différenciation des ES, la répression transcriptionnelle du chromosome n'est plus possible; au même moment l'inactivation devient irréversible (Wutz and Jaenisch, 2000). La permissivité de l'inactivation induite par Xist ainsi que la réversibilité de la répression sont observées dans les mêmes stades de différenciation (dans les premières 48 heures après différenciation), suggérant que ces deux états sont liés aux caractéristiques de la chromatine

des cellules ES. La délétion conditionnelle de Xist dans des cellules différenciées ne renverse pas la répression transcriptionnelle, démontrant que la présence de Xist n'est pas nécessaire au maintien de l'inactivation (Brown and Willard, 1994; Csankovszki *et coll.*, 1999).

Le transcrit Xist est stable, il s'associe en *cis* sur toute la longueur du futur Xi (figure 10) (Clemson *et coll.*, 1996). Les séquences de Xist permettant son association au chromosome X sont redondantes et sont dispersées sur toute la longueur du transcrit, alors que sa fonction de répresseur nécessite un motif unique contenant 7,5 répétitions situées dans sa partie 5' (Wutz and Jaenisch, 2000). Compte tenu du fait que l'expression de Xist depuis un transgène inséré sur un autosome aboutit à la décoration de ce chromosome par l'ARN Xist (Wutz and Jaenisch, 2000), nous pouvons conclure que l'association de Xist avec le futur Xi ne dépend pas de séquences spécifiques portées par le chromosome X. Cependant, la propagation du Xist, et la répression sont moins efficaces sur un autosome.

Cette moindre efficacité de l'action de Xist sur un autosome laisse supposer que certains éléments enrichis sur le chromosome X pourraient assister la propagation de Xist sur le chromosome. Cette fonction de potentialisation pourrait être accomplie par les LINE1 (*long interspersed elements*) qui sont des éléments répétés ayant la caractéristique d'être deux fois plus abondants sur le chromosome X que sur les autosomes (Bailey *et coll.*, 2000; Lyon, 1998; Wutz and Jaenisch, 2000). Une étude récente utilisant des cellules portant une translocation entre le chromosome X et un autosome contenant une faible densité de LINE1 (t(X;4)37 H) a permis de montrer que la propagation de Xist s'arrête au niveau du point de translocation (Popova *et coll.*, 2006). Cette corrélation entre propagation de Xist et densité des séquences LINE1, supporte l'hypothèse de l'intervention des LINE1 dans le phénomène de propagation de Xist.

I.2.3.4. Rôle des protéines polycombs

La présence de Xist sur le futur Xi recrute les protéines polycombs (PcG) (table2). Les protéines PcG sont conservées depuis la Drosophile jusqu'aux mammifères, et participent à la répression transcriptionnelle des gènes impliqués dans le développement (Schuettengruber *et coll.*, 2007). Il existe deux complexes PcG d'activité catalytique distincte appelés PRC1 (*Polycomb repressive complex 1*) et PRC2 (*Polycomb repressive complex 1*) (table 2) (Schuettengruber *et coll.*, 2007).

Eed/Enx1 appartenant au groupe PRC1 sont responsables de la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3. Eed/Enx1 sont recrutées sur le Xi après Xist dans les deux processus d'inactivation (par l'empreinte et aléatoire) (Plath *et coll.*, 2003). Ce recrutement, ainsi que le maintien des modifications d'histones conséquentes, sont strictement dépendants de la présence de Xist (Kohlmaier *et coll.*, 2004). La liaison de Xist sur le Xi entraîne ainsi la tri-méthylation de H3K27 sur tout le chromosome (figure 9) (Plath *et coll.*, 2003; Silva *et coll.*, 2003). Notons que la distribution de la marque H3K27me3 n'est pas homogène le long du chromosome ; au contraire H3K27me3 forme des territoires chromatiniens (Chadwick, 2007; Chadwick and Willard, 2004).

Aucune réactivation globale de la transcription n'est observée dans les mutants déficients pour Eed/Enx1, mais seulement une augmentation sporadique de quelques gènes liés au X, démontrant que la méthylation de H3K27 n'est pas essentielle à la mise en place de l'inactivation (Silva *et coll.*, 2003). Les embryons déficients pour Eed ont la capacité d'initier le processus d'inactivation, mais ne sont pas capables de maintenir l'inactivation dans les cellules extra-embryonnaires soumises à l'inactivation par l'empreinte (Wang *et coll.*, 2001b). Donc, PCR2 est requis pour la maintenance de l'inactivation par l'empreinte uniquement.
A l'inverse, le recrutement de Eed/Enx1 sur un transgène codant pour Xist muté sur son extrémité 5' importante pour la répression, induit la tri–méthylation de H3K27 sur ce chromosome (Plath *et coll.*, 2003). Cependant ce recrutement ectopique des protéines PRC1 n'est pas suffisant pour promouvoir l'inactivation (Plath *et coll.*, 2003).

Ces données montrent que la modification H3K27me3 joue un rôle dans la mise en place de l'inactivation, mais que celle-ci n'est ni suffisante ni nécessaire à l'établissement de la répression transcriptionnelle. La fonction de cette modification d'histone dans le processus d'inactivation n'est pas comprise.

Les protéines PgC du groupe PRC2 (ubiquitine ligase Ring1A/Ring1B) entrent en action conjointement à celles du groupe PRC1 et catalysent la mono-ubiquitination de H2A sur la lysine K119 (table 2) (de Napoles *et coll.*, 2004). Le recrutement de PCR2 est indépendant de l'action de PCR1 mais requière la présence de Xist (Schoeftner *et coll.*, 2006).

D'autres modifications d'histones sont spécifiquement associées au chromosome X inactif : l'hypo–acétylation des histones H3 et H4 et la di-méthylation de H3K9 (table 2, figure 9) (Boggs *et coll.*, 2002; Heard *et coll.*, 2001). Le rôle exact de ces modifications caractéristiques de l'hétérochromatine dans le phénomène d'inactivation du X n'est pas connu.

I.2.3.5. Méthylation de l'ADN et variants d'histones

Les événements les plus tardifs de l'inactivation que sont l'établissement d'un nouveau profil de méthylation de l'ADN et l'incorporation du variant d'histone macroH2A, ont été proposés comme importants pour le maintien de l'inactivation (Hernandez-Munoz *et coll.*, 2005; Mermoud *et coll.*, 1999; Sado *et coll.*, 2000). Ces modifications de la chromatine sont décrites dans le chapitre I.3..

L'hypo-méthylation de l'ADN génomique induite par la 5-aza cytidine, provoque la réactivation de gènes localisés sur le Xi, suggérant un rôle de la méthylation de l'ADN dans le maintien de la répression transcriptionnelle (Mohandas *et coll.*, 1981).

Cependant, l'inactivation peut être induite dans les ES dont l'ADN génomique n'est pas méthylé, invalidées pour Dnmt1$^{-/-}$ (la *DNA methyltranferase* responsable du maintien du profil de méthylation de l'ADN) (chapitre I.3.1.), démontrant que l'inactivation ainsi que son maintien ne nécessite pas la méthylation des dinucléotides CpG (Panning and Jaenisch, 1996). De plus, remarquons que le déficit de Dnmt1 ou de Dnmt3B (catalysant la méthylation des CpG *de novo*) qui aboutit à une déméthylation de l'ADN génomique (chapitre I.3.1.), n'induit qu'une réactivation partielle du Xi (Hansen *et coll.*, 2000; Sado *et coll.*, 2000).

Les études à grande échelle (portant sur le chromosome entier) investigant l'état de méthylation des cytosines du chromosome X montrent que le Xi est globalement hypo-méthylé par rapport au Xa (Hellman and Chess, 2007; Weber *et coll.*, 2005). Ceci traduit le fait qu'en dépit d'une hypo-méthylation de leur promoteur, les gènes transcrits depuis l'allèle actif sont méthylés sur le corps du gène selon un mécanisme inconnu vraisemblablement couplé à la transcription (Hellman and Chess, 2007; Weber *et coll.*, 2005).

La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans l'inhibition de la transcription de Xist depuis le Xa. En effet, dans les cellules ES Dnmt1$^{-/-}$, on constate que la différenciation provoque la transcription de Xist à partir des deux allèles conduisant à l'inactivation des deux chromosomes X (Panning and Jaenisch, 1996).

La chromatine du chromosome X inactif se caractérise également par une composition altérée en variants d'histones (table 2).
Certains variants d'histones comme H2A.Z ou H2A.Bbd ne sont pas détectables sur le Xi, d'autres comme macroH2A s'y trouvent enrichis (Chadwick and Willard, 2001a; Costanzi and

Pehrson, 1998; Costanzi *et coll.*, 2000; Csankovszki *et coll.*, 1999; Rangasamy *et coll.*, 2003; Rasmussen *et coll.*, 2000).

Ainsi, une déplétion du variant d'histone H2A.Z (chapitre I.3.2.5) sur le Xi a été observée par immunofluorescence (Rangasamy *et coll.*, 2003).
La sur-expression du variant H2A.Bbd (chapitre I.3.2.7.) dans des fibroblastes embryonnaires ou dans des lignées de cellules rénales tumorales comportant trois chromosomes X a mis en évidence la particularité de H2A.Bbd d'être exclu du Xi (Chadwick and Willard, 2001a).

A l'inverse, le variant macroH2A est spécifiquement incorporé sur le chromosome X en cours d'inactivation (Costanzi and Pehrson, 1998; Costanzi *et coll.*, 2000; Csankovszki *et coll.*, 1999; Rasmussen *et coll.*, 2000). Cet enrichissement spécifique sur le futur Xi se produit chez l'embryon dès le stade 8 cellules durant la mise en place de l'inactivation par l'empreinte (figure 9) (Costanzi *et coll.*, 2000). MacroH2A est également recruté sur le Xi par Xist dans la phase tardive de l'inactivation aléatoire (figure 9) (Costanzi and Pehrson, 1998; Csankovszki *et coll.*, 1999; Rasmussen *et coll.*, 2000). Cependant l'accumulation de macroH2A observée sur le Xi pourrait être en partie artéfactuelle, du fait que la densité en nucléosome se trouve être plus importante sur Xi par rapport aux autosomes et au Xa (Perche *et coll.*, 2000).
L'importance du recrutement de macroH2A dans le processus d'inactivation du chromosome X sera abordée dans le chapitre I.3.2.6..

I.3. Supports de l'information épigénétique

I.3.1. La méthylation de l'ADN

La modification covalente des cytosines par méthylation représente une marque épigénétique héritable importante pour de nombreux processus cellulaires. Le pattern de méthylation de l'ADN est stable et transmis à chaque division cellulaire (Wigler *et coll.*, 1981). La méthylation de l'ADN est la seule modification de la chromatine dont l'héritabilité a été démontrée (Bestor, 2000).

La méthylation de l'ADN existe chez des espèces très éloignées, depuis les plantes jusqu'à l'homme, mais semble absente chez certains organismes comme le nématode *C. elegans* et la levure *C. cerevisaie* (Bird, 2002). Chez les vertébrés, celle-ci se produit presque exclusivement sur les cytosines dans un contexte CpG. Dans les cellules somatiques humaines, l'ADN génomique se trouve globalement dans un état méthylé, on estime effectivement que 70% à 80 % des CpG sont méthylés (Ehrlich *et coll.*, 1982).

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN joue un rôle fondamental dans la répression transcriptionnelle (Bestor, 2000). En particulier, la méthylation de l'ADN est essentielle pour le développement embryonnaire, la mise en place de l'empreinte génomique parentale, l'inactivation du chromosome X et la répression des rétrotransposons (Bird, 2002).

La méthylation des dinucléotides CpG est catalysée par un groupe conservé de protéines appelées "*DNA (cytosine 5) methyltransferase*" (Dnmt). La régulation de la méthylation du génome s'effectue par l'action coordonnée de trois enzymes : Dnmt1, Dnmt3a et Dnmt3b (Bestor, 2000). Le profil de méthylation d'une lignée de cellules résulte de la combinaison des deux voies du système de méthylation (Bestor, 2000; Bird, 2002):

- La méthylation *de novo* assurée par Dnmt3a et Dnmt3b
- La méthylation de maintenance catalysée par Dnmt1 permettant la transmission du profil de méthylation entre les divisons cellulaires

L'invalidation du gène codant Dnmt1 chez la souris est létale. L'absence de Dnmt1 induit une déméthylation massive du génome, provoquant l'expression bi-allélique des gènes soumis à l'empreinte génomique parentale (Li *et coll.*, 1992).
Les rétrotransposons se réactivent chez les mutants dont l'ADN n'est pas méthylé, démontrant que la méthylation de l'ADN est nécessaire à la répression des rétrotransposons (Bourc'his and Bestor, 2004; Walsh *et coll.*, 1998).
In vitro, Dnmt1 est 5 à 30 fois plus active sur les substrats hémi–méthylés par rapport aux substrats non-méthylés, en accord avec sa fonction de maintenance (Yoder *et coll.*, 1997). Remarquons que dans certaines cellules cancéreuses, la méthylation de l'ADN peut être maintenue en l'absence de Dnmt1, l'unique ADN méthyltransférase de maintien connue (Rhee *et coll.*, 2000). Ceci indique qu'il doit exister une voie alternative du maintien de la méthylation de l'ADN.

Les doubles mutants Dnmt3a$^{-/-}$, Dnmt3b$^{-/-}$ meurent pendant la gestation et présentent une déméthylation globale du génome (toutefois moins importante que celle observée dans les embryons Dnmt1$^{-/-}$) (Okano *et coll.*, 1999). Les cellules ES Dnmt3a$^{-/-}$, Dnmt3b$^{-/-}$, sont incapables de méthyler un ADN rétroviral nouvellement intégré, démontrant la nécessité de Dnmt3a/b pour établir la méthylation *de novo* (Okano *et coll.*, 1999).

Le mécanisme par lequel la méthylation de l'ADN entraîne la répression transcriptionnelle n'est pas connu. Certaines protéines ayant la capacité de se lier spécifiquement aux CpG méthylés dont MeCP2 et Mbd2 pourraient êtres impliquées dans la répression des gènes dont le promoteur est méthylé (Hendrich and Bird, 1998; Nan *et coll.*, 1997). Cependant, le phénotype des souris déficientes pour MeCP2 et Mbd2 est éloigné de celui des souris déficientes pour les Dnmts (Guy *et coll.*, 2001; Hendrich and Bird, 1998). De plus, la délétion de MeCP2 ou Mbd2 n'induit pas d'activation des séquences réprimées par la méthylation (rétrotransposons, gènes soumis à l'empreinte) (Guy *et coll.*, 2001; Hendrich and Bird, 1998). Ces données indiquent que MeCP2 et Mbd2 ne sont pas nécessaires pour la répression des séquences méthylées.

Il a été proposé que la méthylation de l'ADN pourrait entraîner la répression des rétrotransposons et des gènes soumis à l'empreinte par le recrutement du variant d'histone macroH2A1 (Choo *et coll.*, 2006; Damelin and Bestor, 2007). Cette hypothèse sera discutée chapitre I.3.2.6.

I.3.2. Les variants d'histones

I.3.2.1. Généralités

Les variants d'histones sont des isoformes non-alléliques des histones conventionnelles, qui ont la capacité d'être substitués aux histones canoniques au sein du nucléosome. La présence des variants d'histones dans le nucléosome a un impact important sur plusieurs processus cellulaire impliquant l'ADN, incluant la transcription, la réparation de l'ADN endommagé, la division cellulaire et la méiose ; et pourrait avoir d'importantes conséquences épigénétiques.

Des variants ont été rapportés pour chaque type d'histone à l'exception de l'histone H4. Contrairement à leurs contreparties conventionnelles, leur messager est dépourvu de la structure en tige boucle sur sa partie 3', qui est requise pour la dégradation régulée par le cycle cellulaire (Pandey and Marzluff, 1987). À la place de cette tige boucle, les transcrits codants les variants sont poly-adénylés, ce qui augmente leur stabilité (Moss *et coll.*, 1989).

Ces spécificités impliquent que les variants d'histones sont incorporés dans le nucléosome par différentes voies et sont pris en charge par des chaperonnes spécifiques.

VARIANTS DE L'HISTONE H3

Les variants de l'histone H3 jouent un rôle particulier dans la transcription et la ségrégation des chromosomes. Les principaux variants de l'histone H3 sont H3.3 et les variants centromériques appelés cenH3 (pour revue, (Henikoff and Dalal, 2005)).

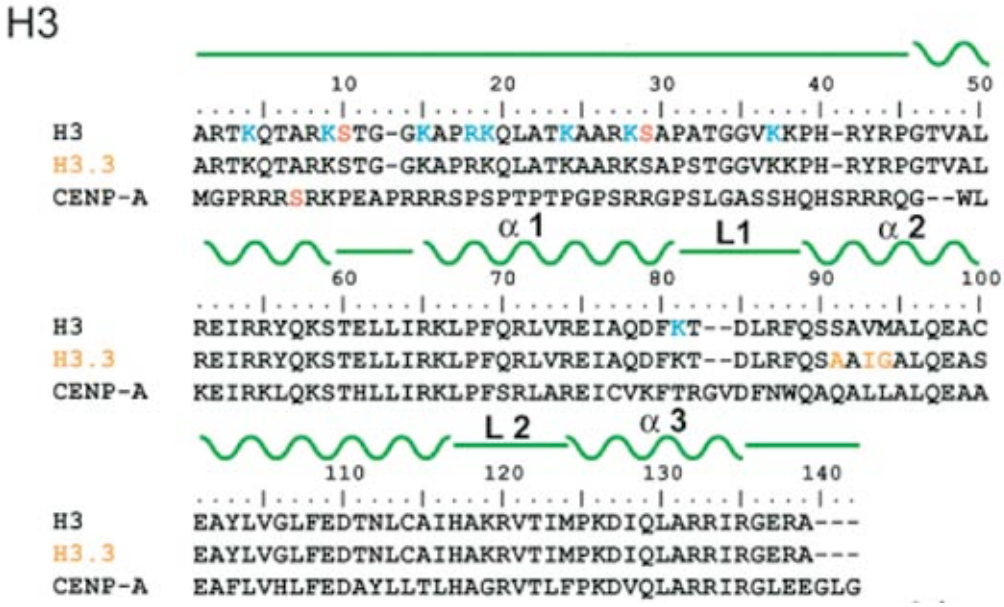


Figure 10 : Alignements de séquences des variants de l'histone H3

Comparaison de séquence entre CENP-A, H3.3 et H3. Remarquons que H3.3 ne diffère de l'histone canonique H3 que par quelques résidus.
D'après (Khorasanizadeh, 2004)

I.3.2.2. Variants centromériques

Chez les mammifères, le variant d'histone CenH3 appelé "CENP-A" (*centromere protein A*) remplace l'histone canonique H3 au niveau des centromères (Palmer *et coll.*, 1987). CenH3, appelé Cse4 chez *Saccharomyces cerevisiae* et Cid chez *Drosophila* est conservé phylogéniquement sur sa partie globulaire formant l'*histone fold* mais pas sur son extrémité N-terminale (Malik and Henikoff, 2003).

Les centromères correspondent aux régions du chromosome où sont assemblés les kinétochores responsables de l'attachement des microtubules, nécessaires pour la ségrégation chromosomique lors de la mitose et de la méiose (Blower and Karpen, 2001). Dans certains

organismes, tels que l'homme ou la mouche, la séquence primaire d'ADN n'est pas suffisante pour diriger la formation de centromères fonctionnels (Karpen and Allshire, 1997). Dans ces espèces, l'identité du centromère est déterminée épigénétiquement (Karpen and Allshire, 1997). Ce qui signifie que la séquence d'ADN n'est pas essentielle pour la formation du centromère ; ce serait plutôt la composition de la chromatine qui dirigerait l'assemblage des kinétochores.

Le mécanisme qui adresse spécifiquement CenH3 et les autres protéines du kinétochore au centromère demeure largement inconnu. L'incorporation de CENP-A est suffisante pour cibler l'assemblage du kinétochore et des facteurs associés aux microtubules (Collins *et coll.*, 2005; Van Hooser *et coll.*, 2001).

Récemment, la chaperonne appelée RbAp48, participant à l'incorporation de CenH3 au centromère, a été biochimiquement purifiée chez *Drosophila* (Furuyama *et coll.*, 2006). Cette protéine a la capacité de promouvoir seule, l'assemblage de la chromatine *in vitro*. RbAp48 fait partie du complexe qui dépose spécifiquement CenH3 sur les séquences d'ADN hétérogènes des centromères, indépendamment de la réplication (et de la transcription), contrairement à H3.1/H3.2 et H3.3 dont l'incorporation met en jeu des procédés couplés aux polymérases (chapitre I.1.4.).

La présence de CENP-A est cruciale pour l'assemblage et la maintenance des kinétochores, sa délétion provoque des défauts de fonctionnement du kinétochore et de ségrégation des chromosomes (Buchwitz *et coll.*, 1999; Howman *et coll.*, 2000; Stoler *et coll.*, 1995).

La structure du tétramère CENP-A-H4 présente des différences par rapport à celle du tétramère H3-H4: l'interaction modifiée avec H4 réduit la mobilité conformationelle du tétramère aboutissant à un nucléosome globalement plus rigide (Black *et coll.*, 2004).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, où le centromère contient un seul nucléosome formé du variant centromérique Cse4, la structure et la composition du nucléosome centromérique est totalement différente de celle du nucléosome canonique (Mizuguchi *et coll.*, 2007). En effet, une protéine non-histone appelée Scm3 entre dans la composition de ces nucléosomes centromériques dont la présence est requise pour le fonctionnement du kinétochore (Camahort

et coll., 2007; Mizuguchi *et coll.*, 2007). Scm3, n'est pas conservée est serait présente exclusivement dans les espèces possédant un nucléosome CENP-A unique (Mizuguchi *et coll.*, 2007). L'immuno-précipitation de chromatine centromérique a permis de démontrer que ces nucléosomes particuliers contenant Cse4 et Smc3, sont dépourvus en histones H2A et H2B *in vivo* (Mizuguchi *et coll.*, 2007). Le nucléosome centromérique chez *Saccharomyces cerevisiae* est donc composé d'un tétramère Cse4-H4 et de la protéine Scm3. Cet assemblage nucléoprotéique de structure inconnue est très éloigné du nucléosome canonique. L'existence de telles structures met en relief l'hétérogénéité et la diversité structurale des nucléosomes composant la chromatine.

Une récente étude menée chez *Drosophila melanogaster*, suggère que les nucléosomes centromériques pourraient ne contenir qu'une seule copie de chaque histone (CenH3, H2A, H2B et H4) formant un tétramère, autour duquel ne seraient complexées que 120 pb d'ADN (Dalal *et coll.*, 2007). Ces nouvelles données nécessitant de plus amples investigations, révèlent que les nucléosomes centromériques adoptent des structures très spécifiques et différentes de celle du nucléosome canonique.

I.3.2.3. H3.3

L'histone H3 est dite "réplicative" car elle est exprimée et incorporée dans la chromatine exclusivement lors de la réplication et la réparation. L'appellation "H3" regroupe H3.1 et H3.2 (ne divergeant que par un seul acide aminé). Les insectes, amphibiens, oiseaux et plantes ne possèdent qu'une seule histone H3 réplicative : H3.2. (Malik and Henikoff, 2003).

H3.3 diffère des formes H3.1 et H3.2 seulement par quelques résidus localisés dans le domaine *histone fold* de la protéine. Précisément, H3.3 diverge respectivement de H3.2 et de H3.1 sur quatre et cinq positions. Ces différences sont conservées chez tous les eucaryotes supérieurs, suggérant des conséquences fonctionnelles importantes (Malik and Henikoff, 2003). En outre, les ascomycètes comme *S.cerevisiae*, sont dépourvus des formes H3.1 et H3.2 de l'histone H3 et possèdent seulement le "variant" H3.3. (Malik and Henikoff, 2003).

H3.3 possède une sérine à la position 31, alors que ce résidu est une alanine dans la séquence de H3. Cette sérine peut être phosphorylée *in vivo* (Hake *et coll.*, 2005). Cette

modification spécifique à H3.3 de fonction inconnue se produit pendant la prophase sur les régions péricentromériques (Hake *et coll.*, 2005).

Mis à part S31, les résidus spécifiques de H3.3 étant localisés sur l'*histone fold*, ils ne sont pas accessibles aux facteurs diffusibles (enzymes de modification, complexe de remodelage…).

Les différences subtiles entre H3.3 et l'histone canonique n'affectent vraisemblablement pas la structure globale du nucléosome. En revanche elles sont responsables de la plus faible stabilité du nucléosome H3.3 (Jin and Felsenfeld, 2007). Ainsi, le nucléosome contenant H3.3 est plus favorable à la dissociation du dimère (H2A-H2B) que le nucléosome canonique (Jin and Felsenfeld, 2007).

Contrairement à l'histone H3, le variant H3.3 est exprimé pendant tout le cycle cellulaire (Frank *et coll.*, 2003; Wu *et coll.*, 1982). H3.3 est incorporé dans la chromatine indépendamment de la réplication (Ahmad and Henikoff, 2002).

L'utilisation d'une chimère H3.3 fusionnée à GFP, a permis de montrer chez la Drosophile que H3.3 est déposé à la fois pendant et en dehors de la phase S (Ahmad and Henikoff, 2002). Dans des cellules post-mitotiques comme les neurones, H3.3 se trouve être la forme majoritaire au point de remplacer presque totalement H3.1 et H3.2 qui ne sont pas synthétisés dans les cellules qui ne se divisent pas (Bosch and Suau, 1995).

Les résidus A, I et G (87,89 et 90) sont responsables de la capacité de H3.3 à être déposée de façon RI. Il est important de noter que H3.3 conserve également la séquence N-terminale nécessaire au dépôt RC de H3. Par conséquent H3.3 peut aussi être déposé pendant la phase S. En revanche, cette séquence N-terminale n’est pas requise pour l’assemblage RI.
Il semblerait, qu'à l'exception de la sérine 31 de H3.3, les trois autres résidus propre à H3.3 soient dévolus à la détermination du mode d’assemblage.

Le gène codant le variant H3.3 est activement transcrit dans les cellules en division, et marque l’euchromatine active (Ahmad and Henikoff, 2002). Cette association entre H3.3 et transcription est connue de longue date, il avait en effet déjà été rapporté au début des années

80, que les macronoyaux transcriptionnellement actifs du protiste *Tetrahymena thermophila* sont enrichis en H3.3 (Allis *et coll.*, 1980).

Remarquons, que H3.3 est déposé sur des *loci* spécifiques, incluant les répétitions de rDNA actifs, suggérant un lien entre l'incorporation de H3.3 et la transcription (Ahmad and Henikoff, 2002). En outre, la distribution de H3.3 à l'échelle du génome montre que ce variant est localisé sur les unités transcriptionnelles (Mito *et coll.*, 2005).

Suite à un choc thermique, l'histone H3.3 remplace la forme canonique sur le promoteur de *HSP70* chez la Drosphile, démontrant que l'induction de la transcription promeut le dépôt de H3.3 (Schwartz and Ahmad, 2005). L'induction du choc thermique ne provoque pas le remplacement de H3 par H3.3 sur un transgène contenant une répétition de promoteurs *HSP70* non fonctionnels, pouvant que c'est le processus de transcription qui est la l'origine de l'incorporation de H3.3 (Schwartz and Ahmad, 2005).

Des expériences d'immuno-précipitation de chromatine (ChIP) ont complété ces résultats en démontrant que l'assemblage de H3.3 se produit conjointement à l'élongation de l'ARN (Daury *et coll.*, 2006; Wirbelauer *et coll.*, 2005). L'incorporation de H3.3 couplé à la transcription est un processus rapide s'effectuant en une heure comme cela a été observé à partir d'un transgène array dans des cellules vivantes (Janicki *et coll.*, 2004).

Tandis que l'incorporation de H3.1 est couplée à la fourche de réplication, celle de H3.3 est indépendante de la réplication. En ayant recours à des méthodes biochimiques, un complexe nommé HIRA a été co-purifié avec H3.3 (Tagami *et coll.*, 2004). HIRA est la chaperonne d'histone spécialisé dans l'incorporation de H3.3.

L'accumulation de données sur l'incorporation de H3.3 couplée à la transcription laisse supposer que la fonction biologique principale de H3.3 serait le remplacement de l'histone H3 en dehors de la réplication.

Un résultat surprenant publié récemment remet en cause cette affirmation : les mutants de *Tetrahymena* invalidés pour les deux gènes codant les deux variants RI de H3 de cette espèce (H3.3 et H3.4) sont viables et ne présentent pas d'altération de densité de nucléosomes sur les régions fortement transcrites (Cui *et coll.*, 2006). Cette étude montrant également que H3 RC n'est pas déposé pendant la transcription, remet en cause la nécessité de l'assemblage de la chromatine RI couplée à la réplication (Cui *et coll.*, 2006).

En revanche ces mutants dépourvus des formes RI de H3 sont stériles (Cui *et coll.*, 2006), ce qui suggère que l'incorporation RI de H3.3 est essentielle pour la spermatogenèse et/ou la fécondation.

La nécessité de l'incorporation de H3.3 après fécondation dans le pronoyau mâle a été mise en évidence chez la Drosophile, grâce aux mutants de chaperonnes ou de complexes de remodelage ATP-dépendant, nécessaires à l'incorporation de H3.3 (Konev *et coll.*, 2007; Loppin *et coll.*, 2005). Les embryons déficients pour la chaperonne HIRA ou le complexe de remodelage CHD1, ne sont pas capables d'incorporer H3.3 dans la chromatine du pronoyau mâle (en remplacement des protamines), induisant une incapacité du génome paternel à participer à la mitose zygotique (Konev *et coll.*, 2007; Loppin *et coll.*, 2005). Donc l'assemblage de la chromatine indépendant de la réplication faisant intervenir H3.3 est essentiel pour la fécondation.

Les approches actuelles utilisées pour comprendre le rôle de H3.3 ont caractérisé une partie du mécanisme par lequel il est déposé et sa localisation à travers le génome ainsi que son rôle essentiel dans la formation de la chromatine dans le pronoyau mâle. Cependant la fonction biologique de H3.3 dans les cellules somatiques différenciées n'est pas encore comprise.

VARIANTS DE L'HISTONE H2A

L'histone H2A est doté de longues extensions de part et d'autre de l'*histone fold*: sa queue N-terminale s'intercale entre les deux tours d'ADN nucléosomal, alors que son extension C-terminale interagit avec le dimère H3-H4 via un motif appelé "*docking domain*" (Luger *et coll.*, 1997; Suto *et coll.*, 2000).

L'histone H2A est celui qui compte le plus grand nombre de variants. Certains de ces variants se caractérisent par des divergences de séquence importantes (Malik and Henikoff, 2003). Quelques variants de H2A sont présents chez tous les eucaryotes comme H2A.X et H2A.Z, d'autres n'existent que chez les vertébrés comme macroH2A, certains comme H2A.Bbd ne sont présents que chez les mammifères (Eirin-Lopez *et coll.*, 2007; Malik and Henikoff, 2003).

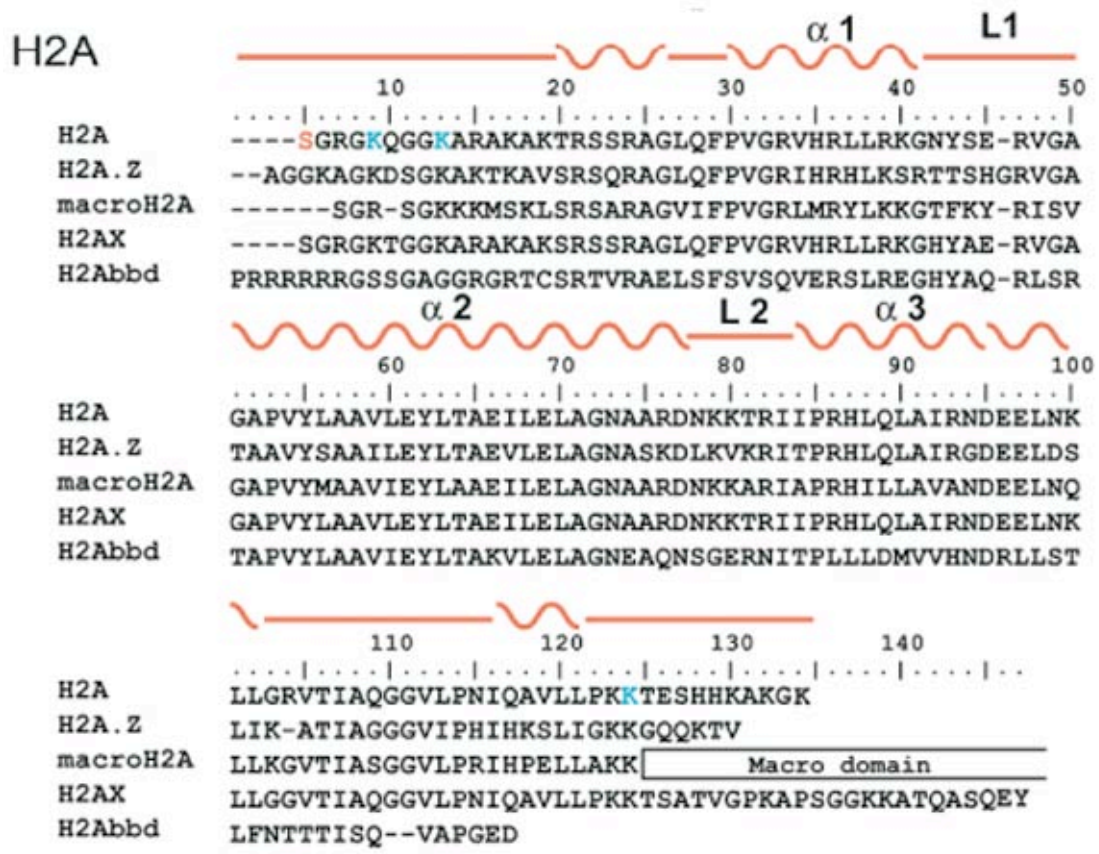


Figure 11 : Alignements de séquences des variants de l'histone H2A

Comparaison de séquence entre H2A, H2A.Z, macroH2A, H2A.X et H2A.Bbd. La partie non–histone (NHR) de macroH2A n'est pas représentée.
D'après (Khorasanizadeh, 2004)

I.3.2.4. H2A.X

Le variant H2A.X joue un rôle critique de senseur de dommages à l'ADN, il est logiquement conservé chez tous les eucaryotes supérieurs étudiés et représente même l'unique forme de l'histone H2A chez *Saccharomyces cerevisiae* (Malik and Henikoff, 2003).
Chez *Tetrahymena thermophila* qui a la particularité de présenter une haute fréquence de recombinaison homologue, la moitié du pool de l'histone H2A est occupé par H2A.X. À l'inverse, *C. elegans* qui utilise principalement d'autres voies de réparation ne possède pas H2A.X (Malik and Henikoff, 2003).

La caractéristique de H2A.X est la présence de la séquence consensus SQ(E/D)Φ (où Φ représente un résidu hydrophobe) sur son domaine C-terminal. Ce motif est crucial pour la réparation par la voie NHEJ (*nonhomologous end joining*) (Malik and Henikoff, 2003). La sérine de ce motif est phosphorylée lors des cassures doubles brins de l'ADN (DSB) (Rogakou *et coll.*, 1998).

Les DSB se produisant dans un contexte de déficience de la réparation de l'ADN sont à l'origine de nombreux types de cancers et d'autres maladies. La réparation des DSBs requiert la participation du variant d'histone H2A.X. De telles cassures se produisent accidentellement durant la réplication de l'ADN ou sont causées par des causes externes comme les rayons ionisants. Les DSB peuvent également avoir lieu de manière physiologique lors des réarrangements génomiques dans les cellules immunitaires ou encore lors de la recombinaison homologue pendant la méiose.

L'histone H2AX participe à la réparation des DSB accidentelles lors des dommages à l'ADN mais aussi à la recombinaison des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) dans les lymphocytes B et au crossing-over méiotique dans les cellules germinales (Hunter *et coll.*, 2001). H2AX est intimement lié à la réparation de l'ADN : les DSBs induisent la phosphorylation de H2AX ; celle ci est médiée par les kinases de la famille ATM/ATR dans les cellules mammifères (Rogakou *et coll.*, 1998). Bien que la présence de H2AX ne soit pas requise pour la reconnaissance initiale des DSBs, la phosphorylation de la serine 136 de H2AX (S139 chez la souris) aboutissant à la formation de γ-H2AX est un événement précoce de la réponse cellulaire aux formations de DSBs (figure 12) (Celeste *et coll.*, 2003). Le site de phosphorylation se situant à l'extrémité C-terminale de la protéine, il est supposé accessible

aux facteurs diffusibles. La phosphorylation de H2AX s'étend sur 25 kb de chaque coté de la lésion, mais curieusement, celle-ci est absente sur les séquences immédiatement adjacentes (1-2 kb) à la cassure, peut être à cause d'une perte des nucléosomes des régions proches de la cassure (Shroff *et coll.*, 2004). γ-H2AX participe à l'organisation de l'assemblage dynamique de complexes protéiques participant à la réparation de la DSB, ceux-ci forment des *foci* cytologiquement visibles (Bassing *et coll.*, 2002; Celeste *et coll.*, 2002). Les expériences d'invalidation génique chez la souris montrent que H2AX intervient dans la réparation des DSB. H2AX est important pour la stabilité génomique, c'est un gène suppresseur de tumeur (Bassing *et coll.*, 2002; Celeste *et coll.*, 2002). En effet, les souris $H2AX^{-/-}$ sont hyper-sensibles aux radiations et présentent un niveau réduit d'immunoglobulines, indiquant un trouble dans la recombinaison génomique des immunoglobulines; les mâles déficients sont stériles (Celeste *et coll.*, 2002).
Les cellules embryonnaires (MEF) dérivées des souris $H2AX^{-/-}$ présentent un niveau important d'aberrations chromosomiques induites par rayonnement ionisant, ce qui confirme que H2AX est impliqué dans la signalisation et/ou la réparation des DSBs (Stucki *et coll.*, 2005). En accord avec la fonction suppresseur de tumeur de H2AX, il est important de relever que le locus du gène humain codant H2AX se trouve sur une portion cytogénétique (11q23) qui se trouve fréquemment altérée dans un grand nombre de cancers (Monni and Knuutila, 2001).

Toutefois les souris invalidées pour H2AX présentent peu de prédispositions au cancer. La combinaison du déficit total ou partiel de H2AX avec un déficit du suppresseur de tumeur p53, qui intervient dans un *checkpoint* signalant les DSB afin d'induire l'arrêt du cycle ou l'apotose, conduit à une augmentation importante de l'incidence des cancers, incluant des lymphomes des lignages T et B, des sarcomes, des leucémies et des tumeurs solides (Bassing *et coll.*, 2003; Celeste *et coll.*, 2002).

La phosphorylation de la sérine 136 de H2A.X n'est pas seulement impliquée dans la réparation de l'ADN. En effet, cette phosphorylation catalysée par la kinase ATR est également requise pour la condensation et le maintien de l'état silencieux des chromosomes sexuels chez les mammifères (Turner *et coll.*, 2004).

En outre, il a été rapporté que le déficit en H2AX résulte en un arrêt de la spermatogenèse au stade pachytène (Celeste *et coll.*, 2002). H2AX étant requis pour la

condensation de la chromatine et la répression transcriptionnelle du chromosome sexuel mâle durant la spermatogenèse, il est possible que l'arrêt au stade pachytène observé chez les mâles H2AX$^{-/-}$ soit une conséquence directe de l'incapacité des souris déficientes à former le *sex body*, appelé inactivation méiotique du chromosome sexuel (Fernandez-Capetillo *et coll.*, 2003).

I.3.2.5. H2A.Z

H2A.Z a initialement été décrit comme un variant de l'histone H2A exprimé indépendamment de la réplication de l'ADN (Wu and Bonner, 1981). H2AZ est très conservé phylogéniquement. Sa conservation entre espèces est même supérieure à celle de l'histone H2A dite "canonique", suggérant que H2A.Z joue un rôle fondamental (Redon *et coll.*, 2002). H2A.Z a été identifié dans une large variété d'espèces incluant la levure à bourgeonnement (HTz1), la levure à fission (Pht1), Tetrahymena (hv1), *Drosophila* (H2AV), poulet, oiseaux (H2A.F), xenopus, la souris et l'humain.
Remarquons que l'orthologue présent chez la Drosophile, H2AV est un hybride entre H2A.Z et H2A.X, puisque H2AV possède sur son extrémité C-terminale le motif permettant la phosphorylation en réponse aux dommages à l'ADN.

L'absence de H2A.Z est létale chez la souris, *Drosophila* et *Tetrahymena*, (Faast *et coll.*, 2001; Liu *et coll.*, 1996; van Daal and Elgin, 1992), tandis que les levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* survivent sans H2A.Z et présentent seulement des défauts de croissance (Jackson and Gorovsky, 2000; Santisteban *et coll.*, 2000). Les mutants nuls (cellules de mammifère et levure) présentent une instabilité chromosomique se traduisant par une augmentation du taux de perte de chromosomes (Carr *et coll.*, 1994; Rangasamy *et coll.*, 2004).

H2A.Z est relativement divergent par rapport à l'histone canonique, puisque les deux protéines ne partagent que 63 % d'homologie (figure 12). La résolution de la structure du nucléosome contenant H2A.Z révèle une différence dans l'affinité de la liaison au tétramère (Suto *et coll.*, 2000). La perte de trois liaisons hydrogènes déstabilise l'interaction entre H3 et H2A.Z (Suto *et coll.*, 2000). De plus, la région acide présentée par le dimère H2A.Z-H2B à la surface de l'octamère pourrait être importante pour lier la queue de l'histone H4 ou d'autres interacteurs non-histones (Suto *et coll.*, 2000).

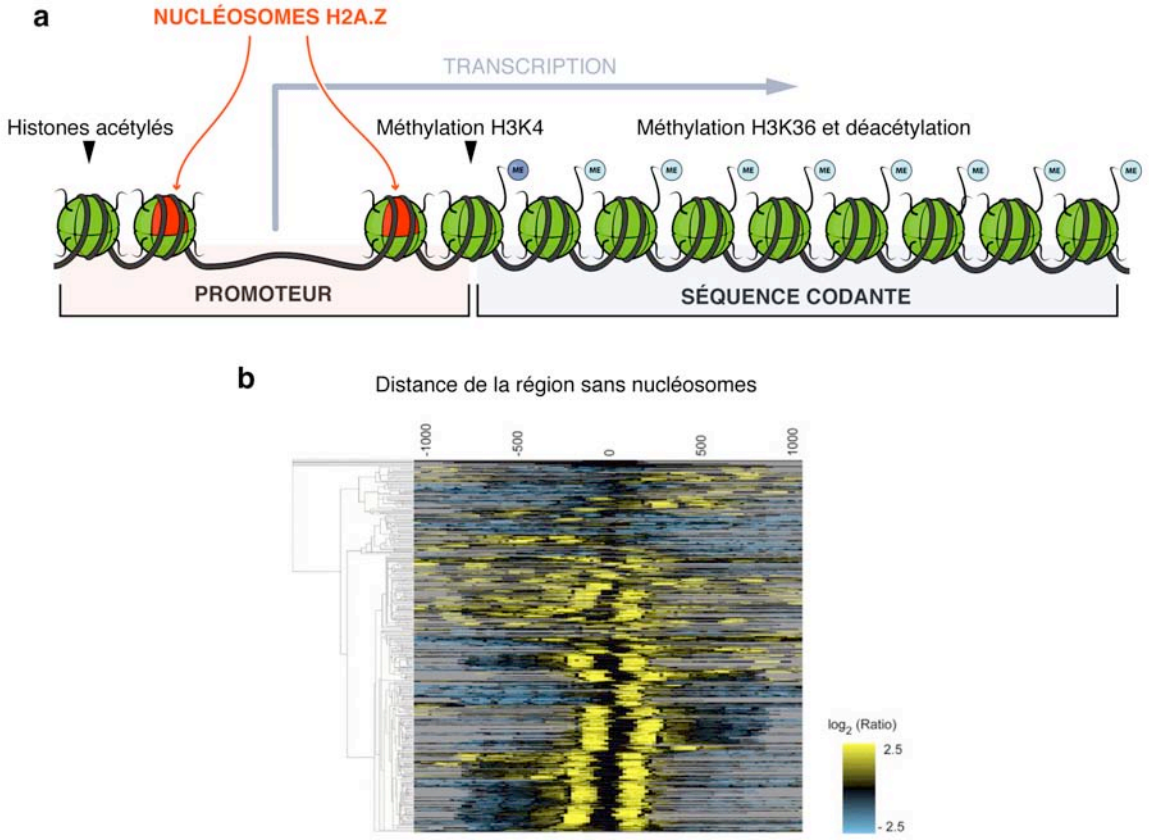


Figure 12 : H2A.Z participe à la structure des promoteurs

a. Deux nucléosomes contenant H2A.Z sont fréquemment présents de part et d'autre de la région sans nucléosome du promoteur.
b. Localisation à haute résolution de H2A.Z chez *S. cerevisiae*. Représentation de données obtenues par *tilled ChIP on chip* (puce a ADN à sondes chevauchantes) centrées sur la région dépourvue en nucléosome du promoteur. Chaque ligne représente une séquence promotrice. L'enrichissement en H2A.Z est normalisé par rapport à la densité en nucléosome.
D'après (Raisner *et coll.*, 2005)

Les différentes études réalisées *in vitro* des propriétés physiques du nucléosome variant contenant H2A.Z aboutissent à des conclusions différentes. Certaines mesures concluent que le nucléosome contenant H2A.Z serait moins stable (Abbott *et coll.*, 2001), d'autres concluent à une plus grande stabilité du nucléosome H2A.Z (Fan *et coll.*, 2002; Jin and Felsenfeld, 2007; Park *et coll.*, 2004).

In vitro, H2A.Z permet la reconstitution de chaînes de nucléosomes, mais inhibe leur capacité à oligomériser (Fan *et coll.*, 2002). Ces données suggèrent que la chromatine contenant H2A.Z pourrait être réfractaire à la condensation et par conséquent serait favorable à la transcription (Fan *et coll.*, 2002).

Six groupes indépendants ont déterminé les *loci* où les nucléosomes contenant H2A.Z sont positionnés à l'échelle du génome (Barski *et coll.*, 2007; Guillemette *et coll.*, 2005; Li *et coll.*, 2005b; Millar *et coll.*, 2006; Raisner *et coll.*, 2005; Zhang *et coll.*, 2005a). Les résultats de ces études ne sont pas tous concordants, vraisemblablement à cause des différents biais inhérents à la technique de *ChIp on chip* discutés plus loin. Cependant tous ces travaux s'accordent sur le point qu'une fraction importante des nucléosomes contenant H2A.Z se trouve localisée sur des promoteurs.

La corrélation entre la présence de H2A.Z sur le promoteur et l'activité du gène n'est pas admise par toutes les études et se trouve encore débattue.

Quatre études réalisées chez la levure montrent que H2A.Z est préférentiellement localisé sur des promoteurs inactifs, de même que certains gènes actifs se trouvent déplétés en H2A.Z (Guillemette *et coll.*, 2005; Li *et coll.*, 2005b; Millar *et coll.*, 2006; Zhang *et coll.*, 2005a).

Cependant l'étude réalisée par Raisner *et coll.* conclue que la présence de H2A.Z et l'activité du gène ne sont pas corrélées. D'après cette étude l'incorporation de H2A.Z s'effectuerait indépendamment de la transcription (Raisner *et coll.*, 2005). Ces travaux ont permis de définir la carte à haute résolution (20 pb) du positivement de H2A.Z chez la levure, grâce à l'utilisation de puces hautes densités composées de sondes chevauchantes (Raisner *et coll.*, 2005).

Une autre analyse à haute résolution, réalisée cette fois chez l'homme en utilisant la technique de séquençage haut débit "*solexa*", démontre que contrairement à ce qui a été observé chez la levure, la présence de H2A.Z sur le promoteur est corrélée avec une transcription active (Barski *et coll.*, 2007).

Ces études à haute résolution du positionnement de H2A.Z sur le génome montrent toutes que H2A.Z est fortement enrichi aux abords de la région sans nucléosome (NFR) du promoteur (figure 13) (Barski *et coll.*, 2007; Raisner *et coll.*, 2005).

Ces travaux mettent en évidence que deux nucléosomes contenant H2A.Z encadrent la NFR du promoteur, chez la levure et chez l'homme (figure 13) (Barski *et coll.*, 2007; Raisner *et coll.*, 2005).

Ces données ont abouti à l'identification d'une séquence de 22 pb suffisante pour promouvoir à la fois la formation d'une NFR et l'incorporation de H2A.Z dans les deux nucléosomes flanquants cette région (Raisner *et coll.*, 2005). Cette séquence, fréquemment présente dans les promoteurs chez la levure, semble être le signal compris dans la séquence d'ADN favorisant la déposition de H2A.Z. Chez la levure, l'acétylation des histones contribue

également à diriger l'incorporation de H2A.Z vers les régions euchromatiques (Raisner *et coll.*, 2005; Zhang *et coll.*, 2005a).

L'incorporation de H2A.Z dans la chromatine est spécifiquement prise en charge par le complexe de remodelage SWR1 (Kobor *et coll.*, 2004; Krogan *et coll.*, 2004; Krogan *et coll.*, 2003a; Mizuguchi *et coll.*, 2004). Une autre chaperonne d'histone appelée Chz1 dépose préférentiellement le dimère H2A.Z-H2B (Luk *et coll.*, 2007).

L'ensemble des données disponibles suggère que H2A.Z est impliqué dans plusieurs processus cellulaires, parmi ceux-ci la formation d'une architecture de la chromatine particulière sur les promoteurs par la création d'une NFR semble être importante.

I.3.2.6. MacroH2A

MacroH2A est un variant spécifique des vertébrés dont la particularité réside en sa grande taille : 42kDA, soit trois fois la taille de l'histone canonique H2A (Pehrson and Fried, 1992). La partie N-terminale de la protéine portant l'*histone fold*, partage 64% d'homologie avec H2A. Son domaine C-terminal, appelé "domaine macro" (*macrodomain*) ou NHR pour *Non Histone Region*, a été cristallisé par plusieurs groupes (figure 14) (Allen *et coll.*, 2003; Chakravarthy *et coll.*, 2005a).

Figure 13 : Structure cristallographique du domaine macro AF1521

D'après (Allen *et coll.*, 2003)

Le domaine macro représentant un motif d'environ 135 acides aminés est conservé chez tous les organismes, y compris les procaryotes (figure 14) (Allen *et coll.*, 2003). Remarquons que certains membres de la famille des PARP (poly ADP-ribose polymerase) portent également un domaine macro (Aravind, 2001).

Il existe deux isoformes non-alléliques, macroH2A1 et macroH2A2, identiques entre elles à 80% (Chadwick and Willard, 2001b; Costanzi and Pehrson, 2001). L'ARN transcrit depuis le gène *mH2A1* (*H2AY* chez la souris) subit un épissage alternatif conduisant aux formes mH2A1.1 et mH2A1.2, différant par seulement 30 acides aminés (figure 15) (Chadwick and Willard, 2001b).

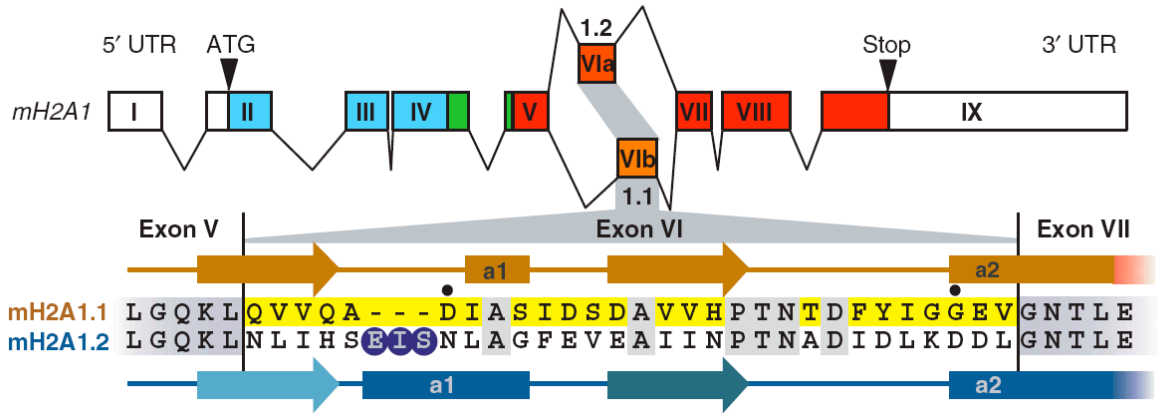


Figure 14 : Epissage alternatif de l'ARNm codant pour macroH2A1.1 et macroH2A1.2

L'exon VIa est spécifique de la forme macroH2A1.2 alors que l'exon VIb est spécifique de la forme macroH2A1.1. Les résidus conservés sont représentés en gris, et les acides aminés variables en jaune. Les acides aminés insérés sur la forme macroH2A1.2 sont entourés de bleu.
D'après (Kustatscher *et coll.*, 2005)

L'expression des différentes isoformes de macroH2A est spécifique de certains types cellulaires et évolue au cours du développement, suggérant que les fonctions des variants de macroH2A1 ne se recouvrent pas (Costanzi and Pehrson, 2001; Pehrson *et coll.*, 1997). De plus, leur distribution nucléaire est similaire mais pas identique, indiquant que chaque variant de macroH2A possède une fonction cellulaire propre (Costanzi and Pehrson, 2001).

MacroH2A2 est très peu étudié, cette isoforme est exprimée à un niveau plus bas que celui de macroH2A1 (communication personnelle S. Dimitrov, profils EST) (Costanzi and Pehrson, 2001).

Dans la suite du texte, le terme "macroH2A" englobera les deux isoformes "macroH2A1" et "macroH2A2"; sous la dénomination "macroH2A1" les deux variants d'épissage "macroH2A1.1" et "macroH2A1.2" seront inclus (figure 15).

a. MacroH2A et le chromosome X inactif

De nombreuses expériences d'immuno-histochimie ont permis de démontrer que macroH2A1 se trouve enrichi sur le chromosome X inactif (Xi), bien qu'il soit également présent sur d'autres parties du génome (Costanzi and Pehrson, 1998; Mermoud *et coll.*, 1999; Rasmussen *et coll.*, 2000).
L'utilisation de cellules portant "n" chromosomes X permet l'observation de "n-1" foyers de macroH2A (Chadwick and Willard, 2001b), suggérant que macroH2A1 s'accumule sur le Xi .
Notons que d'une part, macroH2A est exprimé en quantité équivalente chez la femelle et chez le mâle, et que d'autre part, il ne se localise pas exclusivement sur le Xi (Costanzi and Pehrson, 1998; Mermoud *et coll.*, 1999); ce qui indique que la fonction de macroH2A n'est pas restreinte au processus conduisant à l'inactivation du X. De plus macroH2A existe aussi chez les oiseaux qui ont des chromosomes sexuels différents et ne possèdent pas le mécanisme d'inactivation du X (Ellegren, 2002), suggérant que la fonction première de macroH2A n'est pas l'inactivation du X.

L'observation de la localisation de macroH2A pendant la mise en place de l'inactivation induite dans des cellules ES a permis de mettre en évidence que le positionnement de macroH2A sur le chromosome X se trouve être un phénomène dynamique (Rasmussen *et coll.*, 2000).
Pendant le processus d'inactivation, il a ainsi été observé une relocalisation de macroH2A1, dont un pool est initialement concentré dans les centrosomes, vers le chromosome X en cours d'inactivation (Rasmussen *et coll.*, 2000).
Une étude de la dynamique de localisation de macroH2A1, au cours des premiers stades de développement chez l'embryon pré-implanté, a montré que macroH2A1 se localise sur le chromosome X dès le stade 8 cellules durant lequel se produit l'inactivation par l'empreinte

(Costanzi *et coll.*, 2000). MacroH2A1 pourrait donc jouer un rôle dans le remodelage de la chromatine lors des premières étapes d'inactivation par l'empreinte. Cependant, les études de cinétique réalisées à partir de cellules ES induites en différenciation montrent que macroH2A est recruté dans les phases tardives de l'inactivation (Chadwick and Willard, 2003; Rasmussen *et coll.*, 2000). Cette apparente contradiction n'est pas expliquée, il est possible que Xist recrute macroH2A1 pendant l'inactivation par l'empreinte, puis un seconde fois pendant l'inactivation aléatoire.

Toutefois, l'enrichissement observé sur le Xi est à relativiser car il est en partie le reflet d'une densité globale en nucléosomes plus grande sur le Xi par rapport aux autres chromosomes (Perche *et coll.*, 2000). De récentes expériences de *ChIp on Chip* (chapitre I.3.3.) montrent un enrichissement relatif de macroH2A1 sur le Xi d'environ 30% par rapport à sa densité sur les autres chromosomes (communication personnelle S. Dimitrov).

Différents signaux de positionnement dirigeant l'incorporation vers le Xi ont été identifiés sur la séquence de macroH2A1 (Chadwick *et coll.*, 2001; Nusinow *et coll.*, 2007b). De courtes séquences de quatre ou cinq amino-acides dispersées sur le domaine *H2A like* de macroH2A1 et macroH2A2 sont suffisantes pour promouvoir la localisation sur le chromosome Xi (Nusinow *et coll.*, 2007b).
La boucle L1, qui est l'unique partie structurellement divergente de macroH2A1 de la partie *histone fold* (Chakravarthy *et coll.*, 2005a) semble jouer un rôle important pour permettre sa localisation sur le Xi.

La localisation de macroH2A1 sur le Xi est dépendante de Xist (Beletskii *et coll.*, 2001; Csankovszki *et coll.*, 1999). En outre, l'immuno-précipitation de chromatine à l'aide d'un anticorps anti-macroH2A1 contient Xist, démontrant que Xist et macroH2A1 appartiennent au même complexe ribonucléique (Gilbert *et coll.*, 2000).
L'expression ectopique d'un transgène *Xist* sur un autosome est suffisante pour promouvoir une accumulation de macroH2A sur ce chromosome (Rasmussen *et coll.*, 2001). Ceci prouve que Xist dirige le positionnement de macroH2Al vers le futur Xi.
Il n'est pas établi si Xist recrute macroH2A sur le Xi via une interaction directe, ou si la fixation du Xist sur le futur Xi entraîne un remodelage de la chromatine favorable au chargement de macroH2A1. Aucune liaison directe entre macroH2A et le Xist n'a été rapportée à ce jour.

Grâce à l'utilisation d'un transgène inductible intégré sur le chromosome X, codant pour différents mutants de Xist, il a été démontré que la partie 3' de Xist est nécessaire au recrutement de macroH2A1 (Wutz *et coll.*, 2002).

La délétion conditionnelle de Xist entraîne une délocalisation de macroH2A1, malgré un maintien de la répression, ce qui prouve que Xist est nécessaire pour recruter macroH2A1 sur le Xi. En effet, en l'absence de Xist, macroH2A n'est pas détecté de façon intense sur le Xi et se trouve réparti dans tout le noyau (Beletskii *et coll.*, 2001; Csankovszki *et coll.*, 1999).

L'ensemble de ces données démontre que la présence de Xist est nécessaire et suffisante pour promouvoir l'incorporation de macroH2A1 sur le chromosome X inactif, et ce indépendamment de phénomène d'inhibition de la transcription.

Remarquons qu'en l'absence de Xist, le chromosome X inactif (dépourvu en macroH2A) ne se réactive pas (Beletskii *et coll.*, 2001; Csankovszki *et coll.*, 1999), ce qui suggère que macroH2A n'est pas nécessaire au maintien de la répression de la transcription du Xi.

L'absence de corrélation entre la présence de macroH2A1 et le maintien de l'état silencieux du Xi, a été confirmée grâce à l'utilisation de cellules où l'expression de macroH2A1 est éliminée par siRNA. Dans ces cellules presque dépourvues de macroH2A1, la réactivation du Xi est évaluée à l'aide d'un transgène codant pour la luciférase, intégré sur le chromosome X. En l'absence de macroH2A1, le chromosome X inactif ne se réactive pas, se qui prouve que macroH2A1 n'est pas nécessaire pour assurer le maintien de l'inactivation (Hernandez-Munoz *et coll.*, 2005).

Cependant une faible réactivation (6,5% des cellules) de la transcription du Xi est mesurée lorsque le siRNA contre macroH2A1 est associé à un traitement TSA (inhibiteur des histones déacétylase) et 5-aza-dC (inhibiteur de la méthylation de l'ADN) (Hernandez-Munoz *et coll.*, 2005). Ces données suggèrent que la combinaison de plusieurs composants du Xi serait à l'origine du maintien de l'inactivation.

b. MacroH2A et la méthylation de l'ADN

Une fraction de macroH2A contenue dans le noyau est spécifiquement incorporée au Xi via l'ARN Xist, mais rien n'est décrit sur l'autre pool de macroH2A dispersé à travers le génome. Ni la chaperonne en charge de l'incorporation de macroH2A au sein du nucléosome, ni les séquences génomiques sur lesquelles les nucléosomes macroH2A se positionnent ne sont connues.

En revanche, il a été montré que la localisation de macroH2A dans la chromatine dépend de la méthylation de l'ADN génomique (Damelin and Bestor, 2007). Ceci a été mis en évidence grâce à l'utilisation de cellules ES déficientes pour Dnmt1 dont l'ADN génomique est globalement hypo-méthylé. Dans les cellules ES Dnmt1$^{-/-}$, macroH2A1 n'est pas correctement localisé et semble se concentrer dans les régions péricentromériques (Ma *et coll.*, 2005). La localisation de macroH2A1 est restaurée lorsque ces ES Dnmt1$^{-/-}$ sont transfectées par un minigène codant Dnmt1 qui permet de rétablir la méthylation de l'ADN de ces cellules (Damelin and Bestor, 2007). Lorsque ces cellules sont transfectées par le minigène Dnmt1c1229S possédant une mutation qui abolit l'activité méthyltransférase, macroH2A demeure délocalisé.
Ces expériences prouvent que l'incorporation de macroH2A est dépendante de la méthylation de l'ADN.

Un autre lien entre la méthylation de l'ADN et macroH2A1 a été évoqué par la mise en évidence de l'enrichissement de macroH2A1 sur certains gènes soumis à l'empreinte génomique parentale. Il a en effet été rapporté via des expériences de *ChIP* que macroH2A1 est préférentiellement incorporé sur des régions du génome comprenant des îlots CpG méthylés (l'immuno-précipitation de chromatine: *ChIP* est traitée chapitre I.3.3.) (Choo *et coll.*, 2006). Les séquences génomiques méthylées identifiées comme enrichies en macroH2A1 comprennent le promoteur du Xist, ainsi que certains *loci* soumis à l'empreinte génomique parentale tels que H19/Igf2 et Gtl2/Dlk1 (Choo *et coll.*, 2006). L'enrichissement observé sur ces zones différentiellements méthylées est deux à trois fois supérieur à celui mesuré sur certains gènes réprimés sur le chromosome X inactif (comme Hcfc 1 ou AK122447) (Choo *et coll.*, 2006).

Par ailleurs, macroH2A1 ainsi qu'une ADN méthyletransférase sont transcrits de façon très importante dans certaines cellules souches hématopoïétiques (Phillips *et coll.*, 2000). En utilisant une technique soustraction de banque de cDNA, les gènes spécifiquement transcrits dans les cellules souches hématopoïétiques (Sca^{pos} AA4.1^{pos} Kit^{pos} Lin^{neg}) de foie foetal de souris ont été identifiés. Parmi les gènes spécifiquement transcrits dans ces cellules souches hématopoïétiques, se trouve macroH2A1 et la *cytosine DNA methyltransferase* Dnmt3b. MacroH2A1 et Dnmt3b sont les deux gènes les plus activement transcrits dans les cellules souches de foie foetal, par rapport aux cellules souches hématopoïétiques adultes de la moelle osseuse (Phillips *et coll.*, 2000). Ces données suggèrent que ces deux protéines pourraient agir

conjointement afin de modifier la structure de la chromatine des cellules souches hématopoïétiques fœtales.

Remarquons que les précurseurs hématopoïétiques sont les seules cellules adultes capables de réprimer la transcription consécutivement à l'induction de la transcription d'un transgène *Xist* (Savarese *et coll.*, 2006). Il existe un espace de temps durant la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en précurseurs hématopoïétiques immatures, pendant lequel la chromatine se trouve dans un état permissif pour l'inactivation du X (Savarese *et coll.*, 2006). Bien que macroH2A joue un rôle tardif dans l'inactivation aléatoire, sa présence précoce dans l'inactivation par l'empreinte pourrait être importante pour modifier la chromatine du Xp de façon à ce qu'elle devienne favorable à l'initiation ou à la propagation de l'inactivation.

c. MacroH2A et la répression de la transcription

Dès les premières observations de l'enrichissement de macroH2A sur le chromosome X inactif, une fonction de répresseur transcriptionnel a été suspectée (Costanzi and Pehrson, 1998).

Les deux domaines, "*H2A like*" et la partie NHR, participent à la répression de la transcription:

In vitro, l'incorporation de macroH2A dans le nucléosome interfère avec la liaison de facteur de transcription (Angelov *et coll.*, 2003). Les nucléosomes variants contenant macroH2A sont réfractaires au déplacement par les facteurs de remodelage tels que SWI/SNF ou ACF (Angelov *et coll.*, 2003; Doyen *et coll.*, 2006a).
De façon intéressante, c'est le domaine *histone fold* de la protéine, appelé "*H2A like*" qui interfère avec le remodelage (Angelov *et coll.*, 2003).

La présence de nucléosomes contenant macroH2A1.2 dans une chromatine reconstituée *in vitro* interfère avec la transcription RNA polII dépendante de l'acétylation des histones par l'histone acétyletransférase appelée p300 (chapitreI.3.3.2.) (Doyen *et coll.*, 2006a). La partie NHR de macroH2A1.2 est responsable de l'inhibition de l'acétylation causant la répression transcriptionnelle (Doyen *et coll.*, 2006a).

Les propriétés de macroH2A1.2 de répression de la transcription par inhibition de l'acétylation et du remodelage observées *in vitro* laissent supposer que macroH2A1.2 pourrait participer à la création de régions de chromatine transcriptionnellement inactives dans le noyau des cellules.

Cette question a été abordée par la transfection d'un plasmide codant pour une fusion NHR-Gal4 dans des cellules contenant un gène rapporteur dont le promoteur est situé à proximité de site de fixation Gal4 (Perche *et coll.*, 2000). Cette technique permet de cibler artificiellement le domaine NHR sur un promoteur *in vivo* et d'en mesurer l'activité transcriptionnelle. Cette expérience a montré que la présence du NHR à proximité du promoteur *in vivo* réduit son activité (Perche *et coll.*, 2000), suggérant que macroH2A pourrait également inhiber la transcription *in vivo*.

Récemment, une corrélation entre la présence de macroH2A1 sur le promoteur de l'IL8 et son activité transcriptionnelle a été décrite *in vivo* (Agelopoulos and Thanos, 2006). Cette étude réalisée à partir de cellules humaines en culture rapporte pour la première fois l'existence d'un nucléosome positionné unique contenant macroH2A1 sur un promoteur. MacroH2A1 est ainsi détecté sur le promoteur de l'IL8 des cellules n'exprimant pas l'IL8, comme les lymphocytes B Namalwa infectés par un virus.
La déplétion de macroH2A1 par siRNA induit la transcription de l'IL8 dans ces cellules (Agelopoulos and Thanos, 2006). En accord les résultats obtenus *in vitro,* ces données indiquent que la présence d'un nucléosome contenant macroH2A sur le promoteur *in vivo* inhibe la transcription. Les résultats de cette étude, générés à partir de cellules en culture immortalisées (infectées par un virus, ou HeLa) demandent à êtres confirmés sur des lignées primaires ou sur un organisme entier.

d. MacroH2A et le métabolisme de l'ADP-ribose

La protéine Af1521 d'*Archaeoglobus fulgidus* consiste en elle seule en un domaine macro similaire à celui porté par macroH2A (Allen *et coll.*, 2003).
Il a été démontré que Af1521 a la capacité de lier l'ADP-ribose avec une grande affinité et possède une activité ADP-ribose phophoestérase (Karras *et coll.*, 2005).

MacroH2A via son NHR est également capable de lier le monomère ADP-ribose avec une affinité comparable à Af1521 (Karras *et coll.*, 2005). Mais, il a été montré que macroH2A ne se lie pas au polymère poly-ADP-ribose (PAR) (Kustatscher *et coll.*, 2005).

L'activité ADP-ribose phophoesterase de Af1521, suggère que le NHR de macroH2A pourrait également avoir une activité catalytique envers des substrats ADP-ribosylés ; conduisant au concept attractif d'histone/enzyme (Ladurner, 2003). Cette hypothèse implique que les nucléosomes contenant macroH2A seraient dotés d'une activité catalytique (sur des substrats ADP-ribosylés). Malgré d'intenses efforts de recherche, aucune activité enzymatique phosphoestérase n'a pu être caractérisée dans le cas de macroH2A (données non publiées).

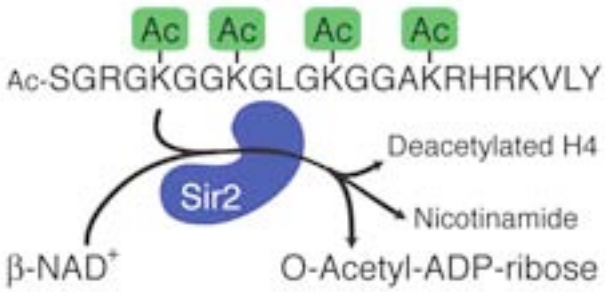


Figure 15 : Biogenèse de l'O-Acétyl-ADP-ribose

Les protéines Sir2 sont des lysines déacétylases qui utilisent le NAD^+ comme cofacteur pour déacétyler des protéines, et produire du nicotinamide, ou de l'O-Acétyl-ADP-ribose.
D'après (Kustatscher *et coll.*, 2005)

Contrairement à macroH2A1.2, l'isoforme macroH2A1.1 se lie à une forme modifiée d'ADP-ribose: l'O-acétyl-ADP-ribose, généré par déacétylation via l'enzyme SIRT qui joue également un rôle dans la formation de l'hétérochromatine (figure 16) (Kustatscher *et coll.*, 2005). SIRT, l'orthologue humain de sir2 chez la levure, est une HDAC utilisant le NAD comme cofacteur et produisant l'O-acétyl-ADP-ribose lors de la réaction de déacétylation des lysines des histones (H3K9, H3K14 et H4K16) (figure 16). Sir2 est un composant de l'hétérochromatine intervenant dans la répression de la transcription (Imai *et coll.*, 2000).
Les données de cristallographie permettent d'expliquer le fait que malgré des structures proches macroH2A1.1 et macroH2A1.2, ont des affinités très différentes pour l'O-acétyl-ADP-ribose (Chakravarthy *et coll.*, 2005a; Kustatscher *et coll.*, 2005). Ces deux

isoformes aux *timings* d'expression différents (Pehrson *et coll.*, 1997) ont vraisemblablement des ligands différents.
Les conséquences biologiques de la fixation de ce métabolite du NAD^+ à macroH2A1.1 ne sont pas connues. De même que la fonction de macroH2A dans les voies de signalisation de l'ADP-ribose reste à déterminer.

Une première découverte fortuite avait suggéré que PARP1 (Poly-ADP ribose polymérase 1) pourrait se lier au nucléosome via le domaine macro de macroH2A1 : en recherchant les partenaires protéiques de la protéine virale LANA, un complexe comprenant le nucléosome macroH2A1.2 et PARP1 avait été mis décrit (Barbera *et coll.*, 2006).
La protéine LANA (*Latency-Associated Nuclear Antigen*) du virus KSHV (*Kaposi's Sacrcoma-Associated Herpesvirus*) permet l'association du génome viral au chromosome mitotique. Lorsque Barbera et ses collaborateurs ont étudié la liaison de LANA au nucléosome, en identifiant par spectrométrie de masse les protéines co-immuno-précipitées avec LANA, ils ont mis en évidence l'existence d'un complexe contenant, entre autres, les protéines: H2A, H2B, H3, H4, macroH2A1.2 et PARP1 (Barbera *et coll.*, 2006). Ce qui montre que macroH2A1.2 et PARP1 co-existent *in vivo* dans le même complexe.

L'interaction physique du nucléosome macroH2A1 avec PARP1 a récemment été confirmée par des expériences d'immuno-précipitation utilisant une chimère macroH2A1 fusionnée à un épitope (*TAP-ChIP*) (Nusinow *et coll.*, 2007a; Ouararhni *et coll.*, 2006).
Ces travaux ont permis de démontrer que PARP1 se lie spécifiquement à macroH2A1.2 et macroH2A1.1 via le domaine NHR *in vitro* et *in vivo* (Nusinow *et coll.*, 2007a; Ouararhni *et coll.*, 2006).
D'autre part, ces études ont démontré que la liaison de macroH2A1 avec PARP1 inhibe l'activité enzymatique de PARP1 (Nusinow *et coll.*, 2007a; Ouararhni *et coll.*, 2006).
D'après ces données importantes pour la compréhension de la fonction biologique de macroH2A1, le rôle de macroH2A1 serait de cibler une fraction de PARP1 inactivée sur la chromatine. Les conséquences biologiques de cette inhibition de PARP1 par macroH2A1 ne sont pas comprises.
Ouararhni et ses collaborateurs proposent que PARP1 et macroH2A1 réprimeraient la transcription de HSP70.1 en condition physiologique (Ouararhni *et coll.*, 2006). Pour défendre cette hypothèse, ils montrent qu'un choc thermique provoquant la transcription de HSP70.1 induit également un déplacement de macroH2A1.1 et de PARP1 du promoteur

HSP70.1, ainsi qu'une ADP-ribosylation importante des protéines associées à ce promoteur (Ouararhni *et coll.*, 2006).

Paradoxalement, cette étude démontre aussi que la présence de macroH2A1.1 ou de PARP1 est nécessaire à l'activation de la transcription de HSP70.1 : en l'absence de l'une de ces deux protéines, le choc thermique est sans effet sur la transcription de HSP70.1 qui reste silencieux (Ouararhni *et coll.*, 2006).

En revanche, lorsque la cellule est déplétée en macroH2A1.1, alors HSP70.1 demeure silencieux, ce qui prouve que la présence de macroH2A1.1 n'est pas nécessaire à la répression de la transcription de ce gène.

e. MacroH2A et l'arrêt du cycle cellulaire

MacroH2A est impliqué dans deux processus cellulaires marquant un arrêt du cycle: la sénescence et la quiescence (Grigoryev *et coll.*, 2004; Zhang *et coll.*, 2005b). La sénescence contribue au vieillissement tissulaire en limitant la capacité d'autorenouvellement des cellules souches de tissus adultes. Elle représente aussi un mécanisme important de suppression de tumeur en restreignant la prolifération de cellules cancéreuses (Campisi, 2005). Dans les cellules sénescentes, des domaines spécialisés constitués d'hétérochromatine facultative appelés *silent senescence-associated heterochromatic foci* (SAHF) contribuent à la sortie définitive du cycle cellulaire en réprimant l'expression de gènes de prolifération comme la cycline A (Narita *et coll.*, 2003). Les SAHF sont des domaines transcriptionnellement silencieux où les gènes responsables de la prolifération sont vraisemblablement réprimés.

MacroH2A ainsi que des chaperonnes d'histones ont été observés par immuno-fluorescence enrichies dans les SAHF (Zhang *et coll.*, 2005b). Une voie de signalisation dépendante de HIRA/ASF1 pourrait être responsable de la formation de SAHF contenant macroH2A (et HP1), et ainsi conduire à la sortie du cycle cellulaire dans les cellules sénescentes (Zhang *et coll.*, 2005b).

Alors que macroH2A se trouve localisé sur les centromères dans les cellules quiescentes, les SAHF contenant macroH2A, eux ne sont pas centromériques (Narita *et coll.*, 2003).

La principale différence, entre sénescence et quiescence, se situe dans l'irréversibilité de la sénescence. L'arrêt irréversible du cycle cellulaire induit par la sénescence cellulaire permet de réprimer la prolifération des cellules endommagées, ce qui constitue la contrepartie cellulaire au vieillissement. Compte tenu de son implication dans des processus antiprolifératifs, macroH2A pourrait être un gène suppresseur de tumeur.

I.3.2.7. H2ABbd et autres variants de la spermatogenèse

a. H2A.Bbd

H2A.Bbd est un variant de l'histone H2A présent exclusivement chez les mammifères (Eirin-Lopez *et coll.*, 2007). Contrairement aux autres histones qui sont phylogéniquement très conservés (Malik and Henikoff, 2003), H2A.Bbd présente des variations de séquences importantes entre les espèces (Eirin-Lopez *et coll.*, 2007). Les causes de l'évolution rapide de ce variant reste à élucider (Eirin-Lopez *et coll.*, 2007).

H2A.Bbd ne partage que 48 % d'homologie avec l'histone canonique H2A (figure 12) (Chadwick and Willard, 2001a). H2A.Bbd est plus petit que l'histone canonique; la présence d'une extension de résidus arginine dans son domaine N-terminal en fait sa principale spécificité (figure 12). Les acides aminés ciblés par les modifications post-traductionnelles ne sont pas conservés dans la séquence de H2A.Bbd, suggérant une régulation particulière de ce variant (Chadwick and Willard, 2001a).

A l'inverse de macroH2A, H2A.Bbd (*bar body deficient*) est exclu de la zone dense dite du corpuscule de Barr qui correspond au Xi. Cette exclusion du Xi a pu être observé en surexprimant H2A.Bbd dans des cellules en cultures (Chadwick and Willard, 2001a). Sa localisation dans des zones riches en H4K12 acétylé, suggère que sa présence pourrait avoir un rôle positif sur la transcription (Chadwick and Willard, 2001a). Cette hypothèse est supportée par des expériences *in vitro* montrant qu'un *array* de nucléosomes contenant H2A.Bbd est plus efficacement transcrit et que les histones en sont plus efficacement acétylés (Angelov *et coll.*, 2004).

Des mesures de FRAP, FRET et de sédimentation, mettent en évidence que le nucléosome variant H2A.Bbd est moins stable qu'un nucléosome canonique, ce qui signifie que le dimère H2A.Bbd-H2B peut s'éjecter et peut être transféré plus facilement qu'un dimère H2A-H2B (Angelov *et coll.*, 2004; Bao *et coll.*, 2004; Gautier *et coll.*, 2004). L'instabilité du dimère H2A.Bbd-H2B implique que le nucléosome H2A.Bbd est une structure plus ouverte facilitant l'accès aux HAT, facteurs de transcription et à la polymérase ; ceci pourrait expliquer le rôle positif de H2A.Bbd sur la transcription.

Cette plus grande accessibilité de l'ADN du nucléosome H2A.Bbd pourrait de façon générale faciliter la mise en oeuvre des processus nécessitant la liaison de facteurs à l'ADN. Ainsi, il a récemment été montré que le nucléosome H2A.Bbd est plus permissif à la réparation par excision de base (BER) que le nucléosome canonique qui représente une barrière aux mécanismes de la réparation (Menoni *et coll.*, 2007).

Des expériences de digestion du nucléosome H2A.Bbd par la microcoque nucléase, permettent de conclure que l'ADN s'enroule autour de l'octamère sur seulement 118 pb alors que la longueur d'ADN complexé autour d'un nucléosome conventionnel est de 146 pb (Bao *et coll.*, 2004). Ce résultat est remis en cause par des expériences de microscopie à force atomique et de cryo-microscopie électronique, qui aboutissent à la mesure d'une même longueur d'ADN complexée de 130 paires de bases (Doyen *et coll.*, 2006b). Le fait que la taille de l'ADN complexée mesurée par digestion à la nucléase soit inférieure au résultat fourni par les techniques de microscopie peut être expliqué par la faible stabilité du dimère variant qui permet à la nucléase de digérer l'ADN au-delà des bornes du nucléosome.

Les propriétés structurales de H2A.Bbd sont bien caractérisées, mais très peu de données sont disponibles quant à sa localisation dans le noyau et sur le génome. Son rôle biologique n'est pas connu.

Chez l'homme, H2A.Bbd est détecté par northern-blot dans le testicule et par RT-PCR dans certaines lignées cellulaires (Chadwick and Willard, 2001a). Récemment H2A.bbd a été également détecté chez la souris a un faible niveau dans d'autres tissus (cerveau, foie, rein, prostate) (Eirin-Lopez *et coll.*, 2007).

L'abondance de H2A.Bbd dans le testicule comparé aux autres tissus où sa présence est à peine détectable, laisse penser que cet histone serait l'un des nombreux variants impliqués dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse (voir chapitre I.4.).

b. TH2A

TH2A est un variant de l'histone H2A, spécifiquement exprimé dans le testicule chez le rat (Rao *et coll.*, 1983; Trostle-Weige *et coll.*, 1982). Ce variant ne diffère de l'histone canonique que par huit acides aminés. TH2A est synthétisé activement et incorporé à la chromatine des spermatocytes primaires lors de la première méiose (voir chapitre I.3.3.1). TH2A représente 60 % des histones du type H2A dans les spermatocytes au stade pachytène (figure 19) (Rao *et coll.*, 1983).

c. H2AL1 et H2AL2

Récemment H2AL1 (H2A Like1) et H2AL2 (H2A Like2) ont été identifiés chez la souris (Govin *et coll.*, 2007). Ces deux variants sont spécifiques à la souris et aucune séquence orthologue n'a pu être identifiée dans le génome humain. H2AL1 et H2AL2 sont exprimés dans les spermatides rondes et dans celles en allongement et s'accumulent dans les spermatides allongées (Govin *et coll.*, 2007). H2AL1/L2 sont maintenus au sein des spermatozoïdes matures et sont vraisemblablement important pour la fécondation. Ces deux variants pourraient participer à l'organisation des régions péricentromériques pendant les phases tardives de la spermatogenèse (Govin *et coll.*, 2007).

VARIANTS DE L'HISTONE H2B

Peu de variants de l'histone H2B ont été caractérisés à ce jour, tous ceux qui ont été décrits chez les mammifères ont la particularité d'être exprimés spécifiquement dans le testicule (Churikov *et coll.*, 2004b; Gineitis *et coll.*, 2000; Li *et coll.*, 2005a). Leur fonction est largement inconnue, mais leur présence restreinte à la lignée germinale mâle laisse supposer quatre rôles potentiels:

- Une fonction structurale dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogenèse pendant la transition histones/protamines (chapitre I.4.)
- Une fonction épigénétique dans la transmission de l'information entre générations
- Une fonction dans la reprogrammation épigénétique lors du rétablissement de la totipotence dans la lignée germinale
- Une fonction dans la méiose et la recombinaison homologue

Comme l'histone H3, l'histone H2B possède en plus de son domaine *histone fold* une hélice αC sur sa partie C-terminale (figures 2 et 18) (Luger *et coll.*, 1997). L'hélice αC de H2B, placée à la surface du nucléosome (figues 1 et 20), participe à la structure du nucléosome en interagissant avec l'ADN nucléosomal et semble être importante pour relier plusieurs nucléosomes qui formeraient ainsi une structure supérieure (Malik and Henikoff, 2003). L'implication de l'histone H2B dans des structures supérieures de la chromatine, via son hélice αC ou sa partie N-terminale, est vraisemblablement la cause de l'évolution lente de cet histone qui présente une faible diversité (de la Barre *et coll.*, 2001; de la Barre *et coll.*, 2000; Malik and Henikoff, 2003).

Chez, l'homme, deux variants de l'histone H2B spécifiquement exprimés dans le testicule ont été décrits: TH2B et H2BFWT (figure 17).

I.3.2.8. TH2B

Bien que TH2B soit le variant de l'histone H2B le plus étudié, son rôle biologique n'est pas connu. TH2B est conservé entre les espèces: souris, rat et homme (Tanphaichitr *et coll.*, 1978; van Roijen *et coll.*, 1998; Wattanaseree and Svasti, 1983; Zalensky *et coll.*, 2002). TH2B partage 85% d'homologie avec l'histone somatique, les principales variations de séquences résident dans sa partie N–terminale où TH2B possède trois sites additionnels de phosphorylation potentiels (Ser 12, Thr 23 et Thr 34) (Zalensky *et coll.*, 2002).
TH2B est exprimé dans les spermatocytes pachytènes et constitue la forme prédominante d'H2B dans les spermatides rondes et dans celles en allongement (figure 19) (Meistrich *et coll.*, 1985).

L'histone H2B n'est pas détectable parmi les protéines purifiées à partir de nucléosome TH2B isolés de noyaux de testicules de rats, ce qui indique deux dimères HA2-TH2B coexistent dans ces nucléosomes *in vivo* (Chiu and Irvin, 1984).

La distribution nucléaire non-homogène de TH2B laisse supposer que ce variant pourrait être associé à des domaines chromatiniens spécifiques (Zalensky *et coll.*, 2002).

```
Human H2B.1     --------------------------------MPEPT-KSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDG  27
Human TSH2B     --------------------------------MPEVSSKGATISKKGFKKAVVKTQKKEG  28
Human H2BFWT    MLRTEVPRLPRSTTAIVWSCHLMATASAMAGPSSETTSEEQLITQEP-KEANSTTSQKQS  59
Chimp  H2BFWT   XXXXXVPRLPRSTTAIVWSCHLMAAASAMGGPSSETTSEEQLITQEP-KEANSTTAQKQS  59

Human H2B.1     KKRKRSRK-----------ESYSVYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIMNSFVNDIFERIAG  76
Human TSH2B     KKRKRTRK-----------ESYSIYIYKVLKQVHPDTGISSKAMSIMNSFVTDIFERIAS  77
Human H2BFWT    KQRKRGRHGPRRCHSNCRGDSFATYFRRVLKQVHQGLSLSREAVSVMDSLVHDILDRIAT 119
Chimp  H2BFWT   KQRKRGRHGPRRCHSNCRGDSFATYFRRVLKQVHQGLSLSREAVSVTDSLVHDILDRIAT 119

Human H2B.1     EASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK------- 126
Human TSH2B     EASRLAHYSKRSTISSREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK------- 127
Human H2BFWT    EAGHLARSTKRQTITAWETRMAVRLLLPGQMGKLAESEGTKAVLR-TSLYAIQQQRK 175
Chimp  H2BFWT   EAGRLARSTKRQTITAWEIRMAVRLLLPGQMGKLAESEGTKAVLR-TSLYAIQQQRK 175
```

Figure 16 : Alignements de séquence des variants de l'histone H2B présents chez l'homme

D'après (Churikov *et coll.*, 2004a)

I.3.2.9. H2BFWT

Contrairement à TH2B, H2BFWT n'est pas conservé entre les espèces, celui-ci est apparu tard dans l'évolution et existe seulement chez les grands singes et l'homme (Churikov *et coll.*, 2004a). Il est particulièrement divergent de l'histone canonique et ne partage que 45 % d'identité avec H2B (figure 17) (Churikov *et coll.*, 2004a).
Remarquons que la Lysine 120 de l'histone H2B, dont l'ubiquitination joue un rôle dans la répression transcriptionnelle (Sun and Allis, 2002), se trouve conservée dans la séquence de H2BFWT.

Une étude a mis en évidence la présence d'un variant de l'histone H2B impliqué dans la formation du complexe télomérique spécifique du spermatozoïde chez l'humain (Gineitis *et coll.*, 2000). La nature de ce variant n'a pas été identifiée. Il a été démontré que ce variant H2B télomérique n'est pas TH2B (Zalensky *et coll.*, 2002), mais il pourrait potentiellement s'agir de H2BFWT (Churikov *et coll.*, 2004a). Aucune donnée n'est disponible à propos de la structure des nucléosomes variants H2BFWT, ni de leur fonction cellulaire.

L'un des buts de l'étude présentée dans se manuscrit est l'analyse des propriétés particulières des nucléosomes variants contenant H2BFWT.

I.3.2.10. Interactions entre variants

Des variants de différents histones de cœur ont la possibilité de cohabiter au sein du même octamère d'histone et de former des nucléosomes (Jin and Felsenfeld, 2007; Lowell *et coll.*, 2005). Des variants de H2A et H2B peuvent ainsi former des dimères. En outre, des dimères composés d'au moins un variant peuvent être incorporés à un tétramère contenant un variant de l'histone H3 (Jin and Felsenfeld, 2007; Lowell *et coll.*, 2005).
De ce fait, la combinaison de plusieurs variants est à la base d'une grande diversité potentielle de nucléosomes de propriétés structurales et fonctionnelles variées.

L'immuno-précipitation de nucléosomes contenant H3.3 permet de co-purifier H2A ainsi que le variant H2A.Z (Jin and Felsenfeld, 2007), prouvant que H3.3 peut être associé *in vivo* soit à H2A.Z soit à H2A.

H2A.Z peut former un dimère en s'associant avec un variant de l'histone H2B (Lowell *et coll.*, 2005). Par exemple, H2A.Z forme un dimère *in vivo* avec le variant de H2B appelé H2BV (Lowell *et coll.*, 2005). H2BV est un variant très divergent de l'histone H2B, avec lequel il ne partage que 38% d'identité (Lowell *et coll.*, 2005). H2BV a été identifié chez *Trypanosoma brucei*, dont les histones sont très divergentes par rapport à celles des autres organismes modèles (Alsford and Horn, 2004; Lowell *et coll.*, 2005).

L'association de différents variants dans un unique octamère pourrait apporter de nouvelles propriétés au nucléosome en termes de stabilité du dimère (Jin and Felsenfeld, 2007). Contrairement à l'association H2A.Z-H3 qui aboutit à la stabilisation du dimère, l'association de H2A.Z avec H3.3 crée une particule moins stable que celle formée par H3.3-H2A (Jin and Felsenfeld, 2007).
Les nucléosomes composés de H2A.Z et H3.3 sont donc très sensibles à l'éviction du dimère, ce qui est cohérant avec le rôle activateur de la transcription de ces variants (Mito *et coll.*, 2005; Santisteban *et coll.*, 2000). De plus H2A.Z et H3.3 qui sont deux variants déposés indépendamment de la réplication, sont en partie localisés sur les promoteurs (Mito *et coll.*, 2005; Raisner *et coll.*, 2005).

I.3.3. Modifications post-traductionnelles des histones

I.3.3.1. Généralités

Les histones de cœur sont l'objet d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles. Parmis celles-ci on compte l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la sumoylation et la biotinilation des lysines, la méthylation des arginines, la phosphorylation des sérines et thréonines, mais aussi l'ADP ribosylation des acides glutamiques (figure 18) (pour revue (Kouzarides, 2007)). Les quatre histones canoniques sont modifiés post-traductionnellement, ainsi que certains variants (H3.3, H2A.Z) (Bonenfant *et coll.*, 2006).

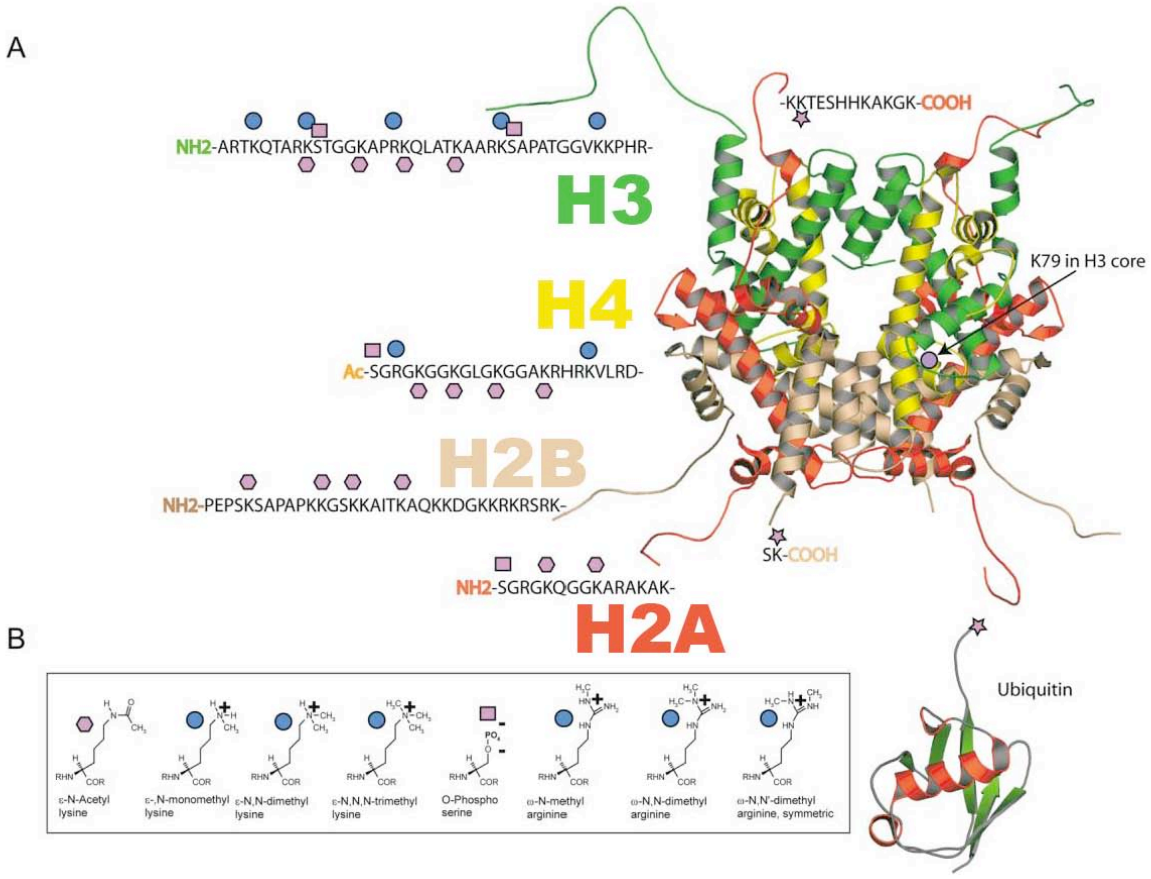


Figure 17 : Représentation des principales modifications post-transcriptionnelles des histones

Ce schéma représente l'octamère d'histone avec les principales modifications d'histones. Pour plus de clarté, les modifications ne sont représentées sur une seule copie de chaque histone. H3 est représenté en vert, H4 en jaune, H2A en rouge et H2B en rose. Les différentes modifications covalentes des acides aminés sont décrites dans le tableau.
Modifié d'après (Khorasanizadeh, 2004)

Toutes les modifications d'histones sont réversibles. L'état de modification d'un résidu d'histone est contrôlé par un équilibre entre les enzymes qui catalysent l'ajout et celles qui catalysent le retrait d'une modification donnée.

Les modifications post-traductionnelles des histones sont classées en deux catégories selon qu'elles sont corrélées avec une activation de la transcription ou une répression:

- Les modifications associées à une transcription active, telles que l'acétylation des histones H3 et H4, ou la di- ou triméthylation de H3K4 ; sont considérées comme des marques de l'euchromatine.
- Les modifications fréquemment observées sur les gènes réprimés, comme H3K9me3 ou H3K27me3, sont référencées comme des modifications de l'hétérochromatine.

Certaines modifications d'histones participent à la régulation de l'expression des gènes, soit en induisant directement une modification de la structure de la chromatine, soit en servant de plateforme de liaison permettant le recrutement d'autres facteurs.
Ainsi, les bromo-domaines sont capables de reconnaître une lysine acétylée, et les chromo-domaines une lysine méthylée.

L'immuno-précipitation de chromatine (ChIP) est la méthode la plus couramment utilisée pour l'étude des modifications d'histones, celle-ci permet d'associer un gène, un élément régulateur, ou un locus à une modification. Cette technique consiste à lier de façon covalente l'ADN aux protéines qui lui sont associées en traitant les cellules au formaldéhyde, puis à *soniquer* la chromatine afin d'obtenir des fragments d'une taille relativement petite (500 - 1000 pb) correspondante approximativement à l'ADN complexé autour du nucléosome. Enfin ces courts fragments d'ADN génomique sont immuno-précipités grâce l'utilisation d'un anticorps spécifique d'une modification d'histone particulière.
Cette méthode a de nombreuses limites. Elle est notamment dépendante de la spécificité de l'anticorps utilisé, et il est difficile d'obtenir un anticorps spécifique d'une seule modification. La fixation et la fragmentation de la chromatine peuvent également être à l'origine de nombreux artéfacts: par le fait que tous les contacts ADN-histones sont fixés par le formaldéhyde y compris ceux entres plusieurs nucléosomes distants. Il existe par ailleurs la possibilité que certaines modifications soient masquées par des protéines liant ces modifications.

Certaines de ces limitations peuvent être en partie surmontées en immuno-précipitant de la chromatine non fixée digérée par la nucléase micrococale (O'Neill and Turner, 2003).
La *ChIP* est utilisable pour des études à grande échelle couvrant un génome tout entier en utilisant des puces à ADN (*micro-array*) : *ChIP-on-chip*. Outre les biais d'amplification possibles, la limite principale du *ChIP-on-chip* se situe dans l'analyse des éléments répétés exclus des puces à ADN. De nouvelles méthodes de séquençage à très haut débit (pyroséquençage, *solexa*) permettent à présent d'étudier tout le génome (séquences répétées comprises) en séquençant un nombre très important de courtes séquences (Albert *et coll.*, 2007; Barski *et coll.*, 2007).

I.3.3.2. Acétylation des histones

L'acétylation des Lysines sur les parties N-terminales des histones est associée à l'activation de la transcription (Allegra *et coll.*, 1987; Tse *et coll.*, 1998). L'acétylation des histones entraîne une modification de la charge nette du nucléosome, ce qui pourrait induire une diminution des interactions ADN-histone intra- ou inter-nucléosomes. Cette idée est supportée par l'observation que les histones acétylés sont plus facilement dissociés de l'ADN *in vivo* (Reinke and Horz, 2003) et *in vitro* (Hassan *et coll.*, 2006). Il a été proposé que l'acétylation des histones pourrait altérer les interactions électrostatiques liant l'ADN aux histones, conduisant à une ouverture du nucléosome qui deviendrait ainsi favorable à la transcription (Cosgrove *et coll.*, 2004; Freitas *et coll.*, 2004).

L'acétylation sur l'*histone fold* de H3 pourrait interférer directement sur la stabilité de la liaison histone-histone qui rendrait le dimère plus labile.
Par exemple, l'acétylation de H3K91, située à l'interface dimère-tétramère, diminue la stabilité du dimère (Ye *et coll.*, 2005). L'éviction du dimère serait alors la cause de la permissivité à la transcription.

L'acétylation peut également influencer la structure d'ordre supérieure de la chromatine. Ainsi l'acétylation de H4K16 inhibe la formation de la fibre de 30 nm (Shogren-Knaak *et coll.*, 2006).

Notons que l'acétylation de H4K16 déstabilise également la liaison de la HAT (*histone acetyltransferase*) appelée SAGA et du complexe de remodelage SWI/SNF au nucléosome; H4K16ac inhibe également la mobilisation du nucléosome par le complexe de

remodelage ACF (Shogren-Knaak *et coll.*, 2006). Ces différents effets de l'acétylation de H4K16 sur le mono-nucléosome suggèrent que seule modification peut entraîner plusieurs effets distincts sur la structure de la chromatine.

L'état d'acétylation des histones résulte d'un équilibre dynamique entre deux activités antagonistes, régulées par deux familles d'enzymes : les acétyltransférases d'histones (HAT) qui ajoutent un groupement acétyl sur le groupement amine des lysines et les déacétylases d'histones (HDAC) qui l'enlèvent.

LES HISTONES ACETYLTRANSFERASES (HAT)

Les HAT sont divisées en trois familles, GNAT, MYST et CBP/p300 (Sterner and Berger, 2000). En général ces enzymes modifient plusieurs lysines sur la queue N-terminale d'un histone ; leur spécificité de substrat est donc relative.
Par exemple, Gcn5 (*general control non-derepressible 5*) et PCAF acétylent préférentiellement H3K9 et H3K14 alors que le complexe HAT NuA4 acétyle préférentiellement les résidus K4, K8, K12 et K16 de l'histone H4 (Peterson and Laniel, 2004; Yang *et coll.*, 1996).

LES HISTONES DESACETYLASES (HDAC)

L'acétylation est supprimée par les histones déacétylases (HDAC), qui catalysent le retrait d'un groupe acétyle du groupe ε-amino des lysines (Holbert and Marmorstein, 2005).

Il existe quatre familles de HDAC : classe I, classe II, et classe III appartenant à la famille Sir qui utilise le NAD^+ comme cofacteur et la classe IV (HDAC 11) (Gregoretti *et coll.*, 2004). Les HDAC de classe I présentent une homologie avec la protéine Rpd3, celles de classe II sont homologues à la protéine Hda1, et les HDAC de classe III sont homologues à Sir 2 (Blander and Guarente, 2004).
Les membres de la classe I sont exclusivement localisés dans le noyau alors que ceux de la classe II font la navette entre le cytoplasme et le noyau.
Contrairement aux HDAC de classe I et II, les HDAC de classe III ne sont pas inhibées par la trichostatine A (TSA).

Les HDAC sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation et sont présentes dans de nombreux complexes répresseurs de la chromatine.

I.3.3.3. Méthylation des histones

Contrairement à l'acétylation qui est en général corrélée avec une activation de la transcription, la méthylation des lysines peut être associée soit à une activation soit à une répression transcriptionnelle selon la position du résidu qui se trouve méthylé (Martin and Zhang, 2005). De plus, un amino-acide peut accepter jusqu'à trois groupements méthyles.

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 (Kouzarides, 2007).

Les conséquences biologiques de la méthylation d'une lysine sont différentes selon que le résidu modifié se trouve mono-, di-, ou tri-méthylé (Santos-Rosa *et coll.*, 2002; Wang *et coll.*, 2003).

Le groupement méthyle n'est pas capable de modifier la charge de l'acide aminée (L ou R) sur lequel il est fixé. Par conséquent, il est peu probable que la méthylation des histones exerce sa fonction biologique via une modification de la structure de la chromatine. La méthylation des lysines des histones semble plutôt être une marque reconnue par des effecteurs capables de modifier la chromatine (Bannister *et coll.*, 2001; Huang *et coll.*, 2006; Lachner *et coll.*, 2001; Wysocka *et coll.*, 2006).

Trois sites de méthylation sont impliqués dans l'activation de la transcription : H3K4, H3K36 et H3K79.

Tandis que H3K4 se concentre à proximité du promoteur, H3K36 est exclusivement localisé sur l'ORF des gènes transcrits et s'accumule vers l'extrémité 3' (Barski *et coll.*, 2007; Pokholok *et coll.*, 2005).

Set2 est la méthyltransférase responsable de la méthylation de H3K36, celle ci interagit physiquement avec la forme activée de polII, expliquant le pattern de H3K36 sur les gènes actifs (Krogan *et coll.*, 2003b). Le rôle de la méthylation de H3K36 consiste à recruter le complexe à activité histone déacétylase Rpd3S, qui déacétyle les histones acétylés durant le processus de transcription (Carrozza *et coll.*, 2005; Keogh *et coll.*, 2005).

Le mécanisme moléculaire à la base de la reconnaissance de la marque H3K36 commence à être compris, celui-ci requiert le chromo-domaine de la sous unité Eaf3 (Li *et coll.*, 2007). Paradoxalement Eaf3 appartient également au complexe acétyle transférase NuA4. Rpd3S acquiert sa spécificité de reconnaissance de H3K36 grâce au domaine PHD de sa sous unité Rco1 (Li *et coll.*, 2007). Ce couplage d'un chromo-domaine avec un domaine PHD afin de permettre la reconnaissance d'une modification d'histone (H3K36me3) suggère que d'autres marques d'histones pourraient également être reconnues spécifiquement par différentes combinaisons de protéines.
La déacétylation des histones par le complexe Rpd3S est nécessaire à la répression de sites cryptiques de transcription situés dans l'unité transcriptionnelle (Carrozza *et coll.*, 2005).
La voie de signalisation portée par H3K36 aboutit à la déacétylation consécutivement à la transcription afin de ramener la chromatine dans un état plus stable réfractaire à l'initiation interne de la transcription. Certaines histones déméthylases à domaine JmjC déméthyle spécifiquement H3K36me3, la signification biologique de la déméthylation de H3K36 n'est pas connue (Tsukada *et coll.*, 2006).

Trois sites de méthylation sont liés à la répression de la transcription : H3K9, H3K27 et H4K20.

Tous les états de modification de H3K27 (mono-, di-, triméthylation) sont catalysés par des protéines polycombs PCR2 (Cao *et coll.*, 2002; Muller *et coll.*, 2002). La méthylation de H3K27 intervient dans de nombreux processus tels que l'inactivation du chromosome X, la répression de gènes homéotiques et l'empreinte génomique parentale (chapitre I.2).

La tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) est associée à la formation de l'hétérochromatine. H3K9me3 recrute des protéines impliquées dans la formation de l'hétérochromatine telle que HP1 (*heterochromatin protein 1*) (Lachner *et coll.*, 2001). HP1 reconnaît H3K9me grâce à son chromo-domaine (Bannister *et coll.*, 2001).

HISTONE METHYLTRANSFERASE

La méthylation des histones est prise en charge par des "histones methyltransférases" (HMT) qui catalysent le transfert d'un groupement méthyl depuis la S-adénosylméthionine vers le résidu cible. Le résidu méthylé peut être soit une lysine soit une arginine.

Les "lysines méthyltransférases" (HKMT) méthylent les lysines et les "proteines arginine méthyltransférase″ (PRMT) catalysent la méthylation des arginines.

La HKMT appelée G9a catalyse la mono- et di-méthylation de H3K9 sur les régions euchromatiques, alors que la HKMT appelé SUV39H catalyse la tri-méthylation de H3K9 principalement sur l'hétérochromatine péricentrique (Peters *et coll.*, 2003).

A l'exception de l'enzyme Dot1, toutes les HKMT possèdent un domaine catalytique SET. La spécificité de l'action des HKMT, ainsi que le nombre de groupements méthyles ajouté dépend de la nature de chaque enzyme et de la présence de certains cofacteurs.

La méthylation des arginines est moins bien caractérisée que celle des lysines et aucune protéine liant une arginine méthylé n'a encore été décrite.
A l'instar de la méthylation de lysine, la méthylation des arginines peut être soit activatrice soit répressive (Strahl *et coll.*, 2001; Wang *et coll.*, 2001a; Yu *et coll.*, 2006).

DEMETHYLATION DES HISTONES

La déméthylation des lysines est catalysée par deux classes d'enzymes : la famille LSD1/BHC110 et les protéines à domaines JmjC de la famille Jumonjii (Klose and Zhang, 2007) .

La première classe comprend LSD1 qui est une amine oxydase très conservée depuis *S. Pombe* jusqu'à l'homme, dont la fonction est d'être une histone lysine déméthylase (Shi *et coll.*, 2004). LSD1 ne peut utiliser comme substrat que les lysines mono- ou di–méthylées et catalyse la déméthylation de H3K4me1 et de H3K4me2. La déplétion de LSD1 dans des cellules entraîne une augmentation de la transcription de certains gènes, concordante avec le rôle positif attribué à H3K4me1 dans la transcription (Shi *et coll.*, 2004).
La spécificité de LSD1 est modulée par sa liaison à d'autres facteurs. En effet, lorsque LSD1 est associéa au récepteur androgène, il acquiert la capacité de déméthyler H3K9me1 et H3K9me2 (Metzger *et coll.*, 2005).

Les protéines à domaine JmjC conservées depuis la levure jusqu'à l'homme, déméthylent les lysines des histones par une réaction d'hydroxylation (Trewick *et coll.*,

2005). Ce mécanisme réactionnel rend possible la déméthylation de lysines tri–méthylées que LSD1 n'est pas capable de catalyser. Les protéines JmjC catalysent préférentiellement la déméthylation de H3K36 *in vivo* et *in vitro* (Tsukada *et coll.*, 2006) (Whetstine *et coll.*, 2006).

I.3.3.4. ADP-ribosylation

La mono-ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle mal connue dont les conséquences biologiques ne sont pas bien comprises.
Les histones peuvent être mono- ou poly-ADP ribosylés. Les enzymes catalysant ce transfert sont les mono-ADP-ribosyltransférases (MARTS) et les poly-ADP-ribose polymérases (PARPs).
La famille des PARP compte 17 membres qui catalysent le transfert séquentiel d'ADP-ribose sur des acides glutamiques ou acides asparagiques, en utilisant le NAD^+ comme cofacteur (Schreiber *et coll.*, 2006).

PARP1, le membre le plus étudié de cette famille joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires. En particulier, PARP1 est un senseur des dommages à l'ADN, et joue un rôle dans l'organisation spatiale et temporelle de la réparation (de Murcia *et coll.*, 1997; Wang *et coll.*, 1997). Les souris déficientes $PARP1^{-/-}$ sont plus sensibles aux agents causant des dommages à l'ADN tels que les rayons ionisants (de Murcia *et coll.*, 1997; Wang *et coll.*, 1997).
Suite à une cassure de l'ADN, les extrémités C- et N-terminales des histones H1 et H2B sont ADP-ribosylées ce qui entraîne une relaxation de la fibre de 30 nm facilitant l'accès au dommage.
Outre l'ouverture de la fibre de 30nm, l'ADP-ribosylation et un signal influençant le cycle cellulaire et permet le recrutement des facteurs de la réparation SSBR/BER sur le site de la lésion.

I.3.3.5. Ubiquitination

La mono-ubiquitination consiste en l'ajout covalent sur la position ε-amine des lysines, d'un peptide très conservé de 76 résidus appelé ubiquitine (Moore *et coll.*, 2002). L'ubiquitination intervient dans la régulation de la transcription et dans le mécanisme de remplacement des histones par les protamines.

Par nature, cette modification antagonise l'acétylation et la méthylation dont ces résidus pourraient être les cibles. Contrairement à la poly-ubiquitination, la mono-ubiquitination des histones ne semble pas conduire à la dégradation de la protéine modifiée. L'ubiquitination des histones touche principalement H2A et H2B bien que H3 soit également ubiquitiné dans les spermatides allongées (Moore *et coll.*, 2002). L'ubiquitination constitue une modification post-transcriptionnelle essentielle pour la transition histone-protamine (chapitre I.4.). En effet, l'invalidation de *HR6* chez la souris, un gène codant une enzyme catalysant l'ubiquitination de H2B, entraîne une stérilité mâle avec des défauts de spermiogenèse suggérant un problème de condensation de la chromatine (Roest *et coll.*, 1996).

I.3.3.6. Interactions entre modifications d'histones

Plusieurs études montrent que des interactions entre différentes modifications existent. La méthylation de H3K36 aboutissant au recrutement d'histone déacétylase telle que décrite précédemment constitue un exemple de communication entre différentes marques d'histone.

Une lysine conservée de la partie C-terminale de l'histone H2B (K119 chez S. pombe, K123 chez *S. cerevisiae* ou K120 chez les mammifères) peut être mono-ubiquitinée. Cette ubiquitination de H2B est associée avec la transcription active par polII (Sun and Allis, 2002). La mono-ubiquitination de H2B est requise pour la méthylation de la lysine 4 de l'histone (Jair *et coll.*, 2006)H3.

I.3.4. Interactions entre différents niveaux d'informations épigénétiques

La méthylation de l'ADN et méthylation des queues d'histones constituent deux couches distinctes d'information épigénétique. Ces deux types de modification de la chromatine communiquent entre eux via des molécules adaptatrice participant à la conversion de l'information codée par les queue d'histone en une information épigénétique codée par la méthylation de l'ADN génomique.

De récents travaux ont mis en évidence que le profil de méthylation de certains résidus des queues des histones sert de guide pour l'établissement du pattern de méthylation de l'ADN par les Dnmts.

Les embryons déficients pour la HKMT SUV39H, hypo-méthylés sur la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9), présentent également des défauts de méthylation de l'ADN sur les régions satellites, suggérant fortement que la modification H3K9me est requise pour la méthylation de l'ADN (Lehnertz *et coll.*, 2003).
La voie de signalisation permettant la traduction du profil de modifications d'histones en un profil de méthylation de dinucléotide CpG commence à être élucidée. Ce mécanisme fait intervenir la protéine HP1 qui se fixe spécifiquement sur H3K9me2 (Smallwood *et coll.*, 2007). En recrutant Dnmt1, HP1 joue la fonction d'un adaptateur et recrute ainsi l'ADN méthyltransférase de maintenance sur la chromatine portant la modification H3K9me2 (Smallwood *et coll.*, 2007). Le rôle d'adaptateur de HP1 dans la voie de méthylation de l'ADN est également supporté par le fait que l'homologue de HP1 chez *Neurospora* est essentiel pour la méthylation de l'ADN (Freitag *et coll.*, 2004).
L'utilisation de cellules déficientes pour Dnmt1 (cellules HCT166) a permis de prouver que la présence de Dnmt1 est nécessaire pour que HP1 puisse réprimer la transcription des régions hétérochromatiques (Smallwood *et coll.*, 2007).
Le fait que ce soit Dnmt1, considérée comme l' "ADN méthyltransférase de maintenance", qui établisse le pattern de méthylation *de novo* peut paraître surprenant. Cependant il faut garder à l'esprit que Dnmt1 pourrait également être doté d'une activité de méthylation *de novo* (Jair *et coll.*, 2006).
L'association physique caractérisée entre G9a et Dnmt1 pourrait être à l'origine d'une boucle assurant le maintien de la méthylation H3K9me2 (Esteve *et coll.*, 2006).

Un autre exemple de conversion du pattern d'une marque histone en méthylation de l'ADN a été dernièrement décrit (Ooi *et coll.*, 2007). Le cofacteur Dnmt3L nécessaire à la méthylation de l'ADN dans la lignée germinale mâle et femelle (Bourc'his and Bestor, 2004; Bourc'his *et coll.*, 2001), reconnait spécifiquement l'histone H3 dont la lysine 4 n'est pas méthylée et recrute l' ADN méthyltransférase *de novo* Dnmt3a2 (Ooi *et coll.*, 2007).
A l'instar de HP1, Dnmt3L est un adaptateur, permettant de cibler une Dnmt sur la chromatine selon la composition en histone.

La cristallographie de Dnmt3L a montré que son domaine riche en cystéines, appelé CXXC, se fixe sur H3 non-méthylé sur K4 (Ooi *et coll.*, 2007). La méthylation de H3K4 inhibe la liaison de Dnmt3L (Ooi *et coll.*, 2007).

Ainsi, l'information génétique codée par les modifications d'histone dont le caractère héritable n'a pas été établi, est convertie en un pattern de méthylation de l'ADN transmis à chaque division cellulaire (Bestor, 2000).

I.4. Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus complexe au cours duquel les précurseurs germinaux diploïdes se différencient en spermatozoïdes haploïdes. Cette différenciation nécessite un remodelage drastique de la chromatine des cellules germinales ainsi qu'une remise à zéro de leur programme épigénétique afin de rétablir de leur totipotence (Sassone-Corsi, 2002).

I.4.1.1. Déroulement de la spermatogenèse

Sur le plan fonctionnel, la spermatogenèse peut être décomposée en trois phases : la phase pré-méiotique, caractérisée par la maturation des cellules germinales souches; puis la méiose permettant le brassage du patrimoine génétique et sa répartition en quatre cellules haploïdes; et enfin, la différenciation terminale des spermatozoïdes.

LA PHASE PRE-MEIOTIQUE

C'est une phase proliférative durant laquelle les cellules germinales souches appelées spermatogonies se divisent par des mitoses classiques (figure 17).

LA MEIOSE

Les cellules germinales franchissant cette étape appelées spermatocytes subissent une phase de division méïotique. La prophase de la première division méiotique est subdivisée en 5 étapes successives : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse (figure 17). La duplication de l'ADN puis la condensation des chromosomes ont lieu au stade leptotène. Les chromosomes homologues s'apparient lors du stade zygotène. Lors du stade pachytène, la recombinaison homologue brasse l'information génétique entre les chromosomes d'une même paire. Les complexes synaptonémaux se rompent lors du stade diplotène, ce qui sépare les chromosomes homologues. L'enveloppe nucléaire disparaît pendant la diacinèse.

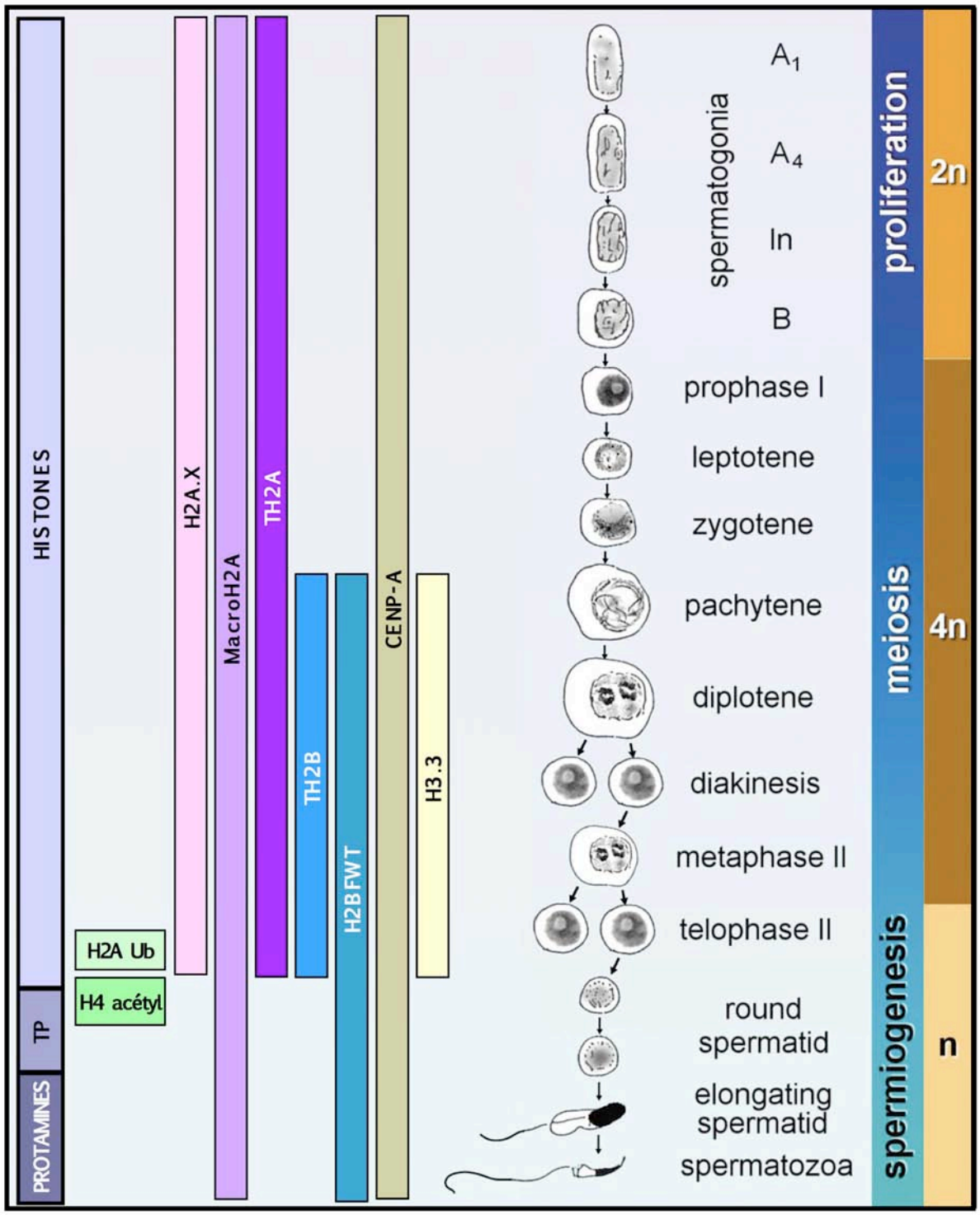


Figure 18 : Composants de la chromatine au cours de la spermatogenèse

Illustration des étapes de la spermatogenèse et du remodelage de la chromatine associé chez les mammifères. La partie droite du schéma représente la morphologie des cellules à chaque étape de la spermatogenèse. Le diagramme sur la partie gauche montre la modification de la composition en histones de la chromatine et l'incorporation de protéines de transitions et de protamines.
Modifié d'après (Lewis *et coll.*, 2003)

Après s'être alignés sur la plaque métaphasique, les deux chromosomes homologues de chaque paire sont séparés et migrent vers un pôle différent durant l'anaphase I. La télophase sépare complètement les chromosomes et produit les spermatocytes secondaires. Cette première division est dite réductionnelle car elle divise le stock chromosomique par deux en produisant des cellules haploïdes. Les spermatocytes secondaires traversent une interphase très courte, sans répliquer leur ADN. La deuxième division, dite équationnelle car le stock génétique est conservé, se déroule comme une mitose conventionnelle, avec séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome. Cette dernière division donne naissance aux spermatides.

LA SPERMIOGENESE

La spermiogenèse se résume en une phase de différenciation des spermatides, ou spermiogenèse, durant laquelle une réorganisation cytoplasmique majeure et un remodelage chromatinien complexe se produisent (figure 17). Le noyau des spermatides s'allonge, et la chromatine se condense en une structure très compacte dans un processus séparé en 16 étapes chez la souris comprenant les types de différenciation: spermatides rondes (étapes 1 à 7), spermatides en allongement (étape 8 à 11) et spermatides condensées (étapes 12 à 16).

I.4.1.2. Remodelage de la chromatine

Pendant la maturation post-méiotique, une réorganisation générale de la chromatine du génome haploïde se produit, mettant en jeu les histones canoniques, des variants d'histones, des protéines de transition et des protamines (figure 17) (Churikov *et coll.*, 2004b; Kimmins and Sassone-Corsi, 2005).

Le remodelage de la chromatine caractérisant la spermatogenèse aboutit à une compaction extrême de l'ADN du noyau de sperme qui devient transcriptionellement inactif (Churikov *et coll.*, 2004b; Kimmins and Sassone-Corsi, 2005). La compaction de l'ADN haploïde mâle dans un volume correspondant à environ 5% de celui d'un noyau de cellule somatique est assurée par le remplacement des histones par les protamines (figure 19) (Churikov *et coll.*, 2004b; Kimmins and Sassone-Corsi, 2005). La structure formée par l'assemblage de l'ADN avec des protéines riches en lysines et en cystéines que sont les

protamines est fondamentalement différente de l'architecture nucléosomale (Sassone-Corsi, 2002).

Chez les mammifères, les histones ne sont pas remplacés directement par les protamines. Des protéines de transition basiques (TP) sont incorporées à la suite du déplacement des histones (Churikov *et coll.*, 2004b; Kimmins and Sassone-Corsi, 2005). TP1 et TP2, d'un poids moléculaire respectif de 6.2 kDa et 13 kDA sont les protéines de transition les mieux caractérisées (Kimmins and Sassone-Corsi, 2005).
Les souris mutantes $Tpn1^{-/-}$ ou $Tpn2^{-/-}$ sont fertiles et présentent des défauts mineurs de spermiogenèse indiquant des fonctions redondantes de ces protéines (Yu *et coll.*, 2000; Zhao *et coll.*, 2001). Les doubles mutants quant à eux sont stériles et présentent des défauts sévères de condensation de la chromatine (Shirley *et coll.*, 2004; Zhao *et coll.*, 2004).

L'incorporation comme le retrait des protéines de transition est contrôlé par des voies de signalisation faisant intervenir la phosphorylation et l'ubiquitination (Sassone-Corsi, 2002).

L'hyperacétylation des histones observée dans les spermatides en cours d'élongation, pourrait être un signal important pour le retrait des histones (Hazzouri *et coll.*, 2000).
La phosphorylation de TP2 par la protéine kinase A est associée à une décondensation de la chromatine et pourrait faciliter l'incorporation des protamines (Meetei *et coll.*, 2002).
La phosphorylation des protamines immédiatement après leur synthèse faciliterait leur incorporation dans la chromatine (Oliva and Dixon, 1991). Les protamines sont des protéines essentielles pour la formation des gamètes mâles car l'haploinsuffisance de chacune de ces protéines rend les souris hétérozygotes stériles, et empêche également la transmission de l'allèle sauvage (Cho *et coll.*, 2001). L'empaquetage de l'ADN par les protamines induit une répression de la transcription.

Au cours de la fertilisation, le génome paternel est décondensé, les protamines sont remplacées par des histones dans le pronoyau mâle, afin de modifier la structure de la chromatine de manière à ce qu'elle soit compatible avec les fonctions cellulaires somatiques telle que la transcription. Une reprogrammation épigénétique du génome paternel se produit après la fertilisation (Sassone-Corsi, 2002).

I.4.1.3. Rôle des variants d'histones dans la transmission de l'information épigénétique

Chez l'homme, le remplacement des histones n'est pas complet. En effet, des expériences de biochimie ont permis d'évaluer qu'environ 15 % des protéines basiques nucléaires se trouvent être des histones dans le sperme humain (Tanphaichitr *et coll.*, 1978; Yoshii *et coll.*, 2005). Parmi ces histones retenues dans la chromatine des spermatozoïdes matures, les variants macroH2A, H2A.X, H2BFWT et H3.3 ont été détectés (Churikov *et coll.*, 2004a; Gatewood *et coll.*, 1990; Hoyer-Fender *et coll.*, 2000; Tanphaichitr *et coll.*, 1978).

La rétention de variants d'histones dans les noyaux de sperme matures, suggère que ceux-ci pourraient avoir un rôle dans l'héritabilité de l'information épigénétique. La question est de savoir si la présence de ces histones est la conséquence d'un remplacement incomplet ou si ces variants sont positionnés spécifiquement sur des séquences régulatrices telles que des promoteurs ?

Du fait de la difficulté de l'étude de la chromatine extrêmement compacte des spermatozoïdes matures, les données décrivant ce phénomène sont rares.

Une étude parue en 1987, apporte les preuves que les histones présentes dans les noyaux de sperme matures sont positionnés sur des séquences spécifiques, supportant l'hypothèse d'une fonction de transmission d'une information épigénétique (Gatewood *et coll.*, 1987).

À partir de sperme humain, les auteurs de ces travaux sont parvenus à séparer l'ADN associé aux histones de celui associé aux protamines. Les séquences d'ADN uniques isolées de la fraction "nucléohistone", ne s'hybrident pas à l'ADN extrait de la fraction "nucléoprotamine" dans un expérience de Southern-blot et inversement (Gatewood *et coll.*, 1987). Cette expérience démontre que dans les spermatozoïdes humains, une fraction du génome est compactée sous forme de nucléosomes positionnés sur des séquences spécifiques (Gatewood *et coll.*, 1987).

Une étude basée sur l'analyse de la composition de la chromatine des gènes de la famille de la β-globine dans les noyaux de sperme humain confirme que certaines séquences demeurent spécifiquement associées à des nucléosomes à l'issue de la spermiogenèse

(Gardiner-Garden *et coll.*, 1998). En effet, les gènes codant les globines ε- et γ- exprimés durant l'embryogenèse précoce sont associés à des histones, alors que le gène de la δ-globine qui n'est transcrit qu'après la naissance se trouve quant à lui associé à des protamines, suggérant que la présence d'histones sur certaines séquences participe à la régulation du *timing* d'expression pendant le développement (Gardiner-Garden *et coll.*, 1998).

Ces résultats démontrent que les histones retenues dans les spermatozoïdes matures sont déposés d'une façon non aléatoire. Par conséquent les variants retenus dans la chromatine des spermatozoïdes sont susceptibles d'influencer l'activité des gènes pendant l'embryogenèse. Cependant le rôle des histones, incluant variants et modifications, dans la transmission de l'information épigénétique à travers la lignée germinale ou la méiose reste à démontrer.

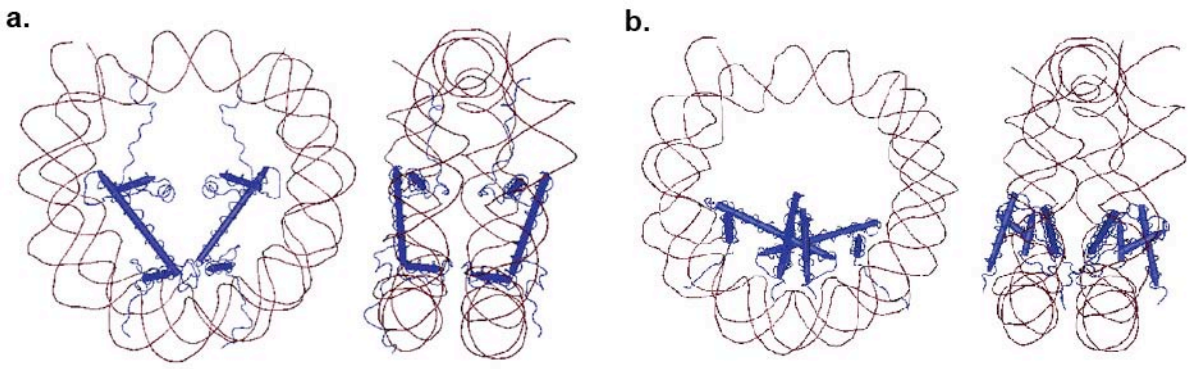


Figure 19 : Positions des histones du dimère (H2A et H2B) dans le nucléosome

Pour plus de clarté, seules les histones H2A (a.) ou H2B (b.) sont représentées
a. position des deux histones H2A dans le nucléosome
L'interface d'autodimérisation de H2A se trouve dans la boucle L1.
b. position des deux histones H2B dans le nucléosome.
H2B occupe une position plus périphérique, son hélice αC est au contact de la surface.
d'après (Malik and Henikoff, 2003)

I.5. Objectifs

Le nucléosome est une entité dynamique capable d'être modifiée dans sa composition et sa structure. Le dimère H2A-H2B occupe une position particulière dans le nucléosome qui le rend disponible et moins stable que le tétramère H3-H4 (figure 18) (Jackson, 1990; Kimura and Cook, 2001). La mobilité du dimère H2A-H2B mesurée par FRAP traduit le fait que les histones H2A et H2B peuvent être retirés du nucléosome ou être échangés entre nucléosomes, au cours d'une réaction de remodelage de la chromatine.

En outre, les variants d'histones modifient les propriétés fonctionnelles du nucléosome. Ces changements peuvent êtres mis en œuvre par changements directs dans la structure du nucléosome ou de la stabilité du dimère, ou via l'intervention d'effecteurs recrutés par le variant d'histone.

Cette propriété structurale du nucléosome implique que la mémoire épigénétique fait plutôt intervenir H3 (et H4 dans une moindre mesure) plus stables, alors que la modulation de la stabilité du dimère par l'incorporation de variants de H2A ou H2B permet de réguler l'accessibilité de l'ADN (figure 18) (Chakravarthy *et coll.*, 2005b; Malik and Henikoff, 2003). Le remplacement dynamique de H2A ou H2B intervient dans la régulation de nombreux processus cellulaires faisant intervenir l'accessibilité ou la compaction de l'ADN.

L'objectif de ce travail est d'apporter des éléments permettant de comprendre comment le remplacement des histones formant le dimère H2A-H2B par des variants modifie les propriétés du nucléosome et lui confère de nouvelles fonctionnalités.

Nous nous intéressons plus spécifiquement à deux variants d'histone entrant dans la composition du dimère : H2BFWT et macroH2A1

H2BFWT, dont la conservation au cours de l'évolution est restreinte aux grands singes, a fait l'objet d'investigations basées sur des techniques de biochimie *in vitro*.

Dans le but de mettre en évidence la fonction biologique de macroH2A1, nous avons créé une lignée de souris invalidée pour macroH2A1. L'étude du phénotype de ces animaux aura pour objectif de mieux connaître le rôle biologique de ce variant particulier *in vivo*.

I.5.1. H2BFWT

H2BFWT a été décrit chez l'homme comme un variant spécifiquement exprimé dans le testicule et présent dans les spermatozoïdes matures (Churikov *et coll.*, 2004a). H2BFWT est apparu récemment dans l'évolution : il n'existe en effet que chez l'homme et les grands singes et aucun orthologue n'est présent ni chez la souris ni chez le rat (Churikov *et coll.*, 2004a). La présence de H2BFWT restreinte à l'homme (et à certains singes) rend son étude particulièrement difficile puisqu'aucun système modèle n'est disponible. Aucune lignée cellulaire exprimant H2BFWT n'a été décrite. Du fait de la difficulté d'étude de la fonction de H2BFWT aucune donnée n'est disponible quant à son rôle biologique.
H2BFWT étant spécifiquement exprimé dans le testicule, il participe vraisemblablement au remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse. Afin de comprendre comment H2BFWT est impliqué dans ce processus, nous aborderons la fonction de H2BFWT par l'étude *in vitro* de ces caractéristiques lorsqu'il est incorporé au sein du nucléosome.
Le but de cette étude est de caractériser les modifications structurales du variant nucléosome H2BFWT ainsi que ses propriétés fonctionnelles vis-à-vis de l'assemblage du chromosome mitotique.

Nous étudierons les modifications de structure du nucléosome variant H2BFWT par l'intermédiaire de l'accessibilité de l'ADN complexé à la digestion par la DNAseI. Le comportement vis-à-vis du complexe de remodelage ATP-dépendant SWI/SNF sera analysé afin de déterminer les modifications fonctionnelles du nucléosome variant H2BFWT. La stabilité du dimère H2A-H2BFWT sera également abordée, dans le but de mesurer dans quelle mesure celui-ci peut être échangé. La stabilité du dimère joue un rôle important dans le contexte de la transition histone-protamine Des données sur la capacité du dimère H2A-H2BFWT à être échangé apporteront des indications sur le mécanisme de remplacement des histones par les protamines.

Afin de déterminer quelle peut être l'influence de l'incorporation de H2BFWT sur la compaction d'ordre supérieur de la chromatine, nous étudierons son influence vis-à-vis de la condensation du chromosome mitotique.

I.5.2. MacroH2A1

Malgré l'abondance des travaux voués à l'étude de macroH2A, son rôle biologique demeure incompris.
La fonction de macroH2A1 communément admise est la répression de la transcription. Cette idée est essentiellement basée sur des expériences conduites *in vitro* sur des systèmes reconstitués. Aucune expérience visant à mesurer les conséquences d'une déplétion de macroH2A sur la transcription n'a été effectuée sur des lignées de cellules primaires ou mieux, sur un animal modèle. Cette fonction de répresseur transcriptionel demande donc à être étudiée *in vivo*.

De plus, de récentes expériences montrent que l'influence de macroH2A sur la transcription est beaucoup plus complexe qu'un rôle unique de répresseur.
Par exemple, dans le cas de la régulation de la transcription de HSP70.1, les expériences de RNAi réalisées contre macroH2A1.1 ont montré que la présence de macroH2A1.1 est requise pour l'activation de la transcription par la voie de PARP-1. Cependant macroH2A1.1 n'est pas nécessaire pour le maintien de l'état inactif (Ouararhni *et coll.*, 2006). Ces nouvelles données nous conduisent à reconsidérer la fonction de macroH2A vis-à-vis de la répression transcriptionnelle.

D'autre part, la fonction remplie par macroH2A1 dans l'inactivation du chromosome X n'est pas établie et nécessite d'autres investigations. Notons par ailleurs que la présence de macroH2A1 n'est pas nécessaire au maintien de l'inactivation (Csankovszki *et coll.*, 1999). Ce qui indique que le rôle de macroH2A dans le processus d'inactivation n'est vraisemblablement pas de maintenir l'état répressif de la chromatine. La question du rôle de macroH2A lorsqu'il est recruté sur le chromosome X inactif reste ouverte.
MacroH2A1 n'est pas exclusivement localisé sur le Xi, ce qui indique qu'il est impliqué dans d'autres fonctions cellulaires. De plus, les récentes publications montrant que macroH2A1 est un inhibiteur de PARP1 (Nusinow *et coll.*, 2007a; Ouararhni *et coll.*, 2006) ouvrent un nouveau champ d'investigation. Les conséquences cellulaires du recrutement et de l'inhibition enzymatique de PARP1 ne sont pas connues et pourraient potentiellement êtres importants pour la réparation des dommages à l'ADN.

Notre objectif est d'apporter de nouveaux éléments pour la compréhension du rôle biologique de macroH2A1. Afin d'évaluer les conséquences de la déplétion de macroH2A1 *in vivo* sur le développement, l'inactivation du X et la réparation de l'ADN, nous avons créé au laboratoire une lignée de souris invalidées pour macroH2A1.

L'étude du phénotype de ces animaux a comme objectif de mettre en évidence la fonction biologique de macroH2A1.

II. Chapitre II: Résultats

II.1. Structure et fonction du nucléosome variant H2BFWT

MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Feb. 2006, p. 1518–1526 Vol. 26, No. 4
0270-7306/06/$08.00+0 doi:10.1128/MCB.26.4.1518–1526.2006
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

The NH_2 Tail of the Novel Histone Variant H2BFWT Exhibits Properties Distinct from Conventional H2B with Respect to the Assembly of Mitotic Chromosomes

Mathieu Boulard,[1,2] Thierry Gautier,[1] Gaelh Ouengue Mbele,[1] Véronique Gerson,[1] Ali Hamiche,[3] Dimitar Angelov,[2,4] Philippe Bouvet,[2,4]* and Stefan Dimitrov[1,2]*

Institut Albert Bonniot, INSERM U309, 38706 La Tronche Cedex, France[1]; Ecole Normale Supérieure de Lyon, Laboratoire Joliot Curie, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France[2]; Institut Andre Lwoff, CNRS UPR 9079, 7 rue Guy Moquet, 94800 Villejuif, France[3]; and Ecole Normale Supérieure de Lyon, LBMC, CNRS-UMR 5161, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France[4]

Received 12 September 2005/Returned for modification 14 October 2005/Accepted 21 November 2005

We have studied the functional and structural properties of nucleosomes reconstituted with H2BFWT, a recently identified putative histone variant of the H2B family with totally unknown function. We show that H2BFWT can replace the conventional histone H2B in the nucleosome. The presence of H2BFWT did not affect the overall structure of the nucleosome, and the H2BFWT nucleosomes exhibited the same stability as conventional nucleosomes. SWI/SNF was able to efficiently remodel and mobilize the H2BFWT nucleosomes. Importantly, H2BFWT, in contrast to conventional H2B, was unable to recruit chromosome condensation factors and to participate in the assembly of mitotic chromosomes. This was determined by the highly divergent (compared to conventional H2B) NH_2 tail of H2BFWT. These data, in combination with the observations that H2BFWT was found by others in the sperm nuclei and appeared to be associated with the telomeric chromatin, suggest that H2BFWT could act as a specific epigenetic marker.

DNA is packaged in the somatic nucleus into chromatin. The nucleosome, the basal repeating unit of chromatin, is constituted of an octamer of the core histones (two of each H2A, H2B, H3, and H4), around which two superhelical turns of DNA are wrapped (48). The structures of both the histone octamer (5, 6) and the nucleosome (33) were solved by X-ray crystallography. Each histone within the octamer consists of a structured domain (the histone fold) and a nonstructured NH_2 tail.

The NH_2 tails, initially defined by their sensitivity to proteases, contain about 25% of the total mass of the core histones (5, 48). The tails are very basic, and UV laser protein-DNA cross-linking has shown that they bind to chromatin both in vitro and in vivo (36, 46). The NH_2 tails are not required for either the assembly or the maintenance of the nucleosome particle, and their cleavage results in a very slight effect on the structural properties of the nucleosome (7, 24). However, the NH_2 tails play an essential role in the folding and the maintenance of the 30-nm chromatin fiber (23). Both the compaction of the chromatin fiber and the orientation of the nucleosomes relative to the fiber axis are dependent on the integrity of the NH_2 tails (1, 17). The tails of the individual histones appeared to be involved in distinct phenomena. For example, the integrity of the histone H4 tail is fully required for the folding of the 30-nm chromatin fiber (18), while the tail of the histone H2B is crucial for the assembly of mitotic chromosomes (13, 14). The NH_2 tails of histones H3 and H4 are selectively required for the p300-dependent transcriptional activation of chromatin (2).

In addition to conventional histones, the cells express histone variants. The histone variants are nonallelic forms of the conventional histones, and they are present in the cell in a very small amount compared to the conventional ones (48). The histone variants participate in the regulation of different processes within the cell (26, 44). The best studied are the histone variants of the H2A and H3 families (22, 35, 42). The histone variant H2AX is involved in DNA repair and the maintenance of the stability of the genome (8, 9). Another histone variant, H2A.Z, appeared to be implicated in gene activation, gene silencing, and chromosome segregation (15, 41, 43). The inactive X chromosome is believed to be enriched in the histone variant macroH2A, which could play an essential role in its inactivation (12, 28). CENP-A, a universal histone variant of the H3 family, is specifically associated with the centromeric sequences and is crucial for the assembly and maintenance of the kinetochores (26, 27), while active genes are sites of replacement of H3.3, another universal histone H3 variant (26).

Few H2B variants have been identified to date, and their function is largely unknown (10, 21, 31). Recently, a novel putative H2B variant, H2BFWT, was cloned (10). This putative histone variant exhibits very low homology (45% identity) with the conventional H2B, with its NH_2 tail showing the lowest homology. In this work we have studied the structural and functional properties of nucleosomes reconstituted with H2BFWT and compared them with the properties of conventional nucleosomes. Our data suggest that H2BFWT, in contrast to conventional H2B, is unable to recruit chromosome condensation factors and to assist mitotic chromosome assembly.

* Corresponding author. Mailing address for Stefan Dimitrov: Institut Albert Bonniot, INSERM U309, 38706 La Tronche Cedex, France. Phone: (33) 4 76 54 94 73. Fax: (33) 4 76 54 95 95. E-mail: stefan.dimitrov@ujf-grenoble.fr. Mailing address for Philippe Bouvet: Ecole Normale Supérieure de Lyon, Laboratoire Joliot Curie, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France. Phone and fax: (33) 4 72 72 80 16. E-mail: pbouvet@ens-lyon.fr.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of DNA probes. The 152-bp fragment containing the *Xenopus borealis* 5S RNA gene was obtained from plasmid pXP10 as described previously (30). The 255-bp and 241-bp DNA fragments containing nucleosome-positioning sequence 601 (32), allowing reconstitution of end- or centrally positioned nucleosomes, were prepared by PCR amplification using ^{32}P-labeled primers and plasmids pGEM3Z-601 and p199-1 (kind gifts from J. Widom and B. Bartholomew), respectively. Labeled DNA fragments were gel purified.

H2BFWT cloning and nucleosome reconstitution. The H2BFWT coding sequence was amplified by PCR by using the EST IMAGE clone 5266336 cDNA and the primers 5′-CAGTGGCCATATGGCCACTGCCTCCGCC (forward) and 5′-TGAGGATCCTCACTTTCTCTGTTGCTGTATG (reverse). The PCR product was cloned in a pET3a vector (Novagen). H2BFWT was overexpressed in C41(DE3) cells (Avidis) and purified to homogeneity. The H2BFWT sequence (EST IMAGE clone 5266336 cDNA) contains two potential AUG start codons. We have used AUG start codon 67 (M23), which allows the translation of a shorter version of H2BFWT (153 amino acids), since we have observed this form of H2BFWT to be expressed in vivo (data not shown).

The green fluorescent protein (GFP)-H2BFWT and the hemagglutinin (HA)-H2BFWT (pcDNA/HA-H2BFWT) vectors, the chimeric histone N_{ter}H2B-FWT expression vector (which contains the sequence corresponding to the NH_2 tail of the conventional human H2B [amino acids 1 to E36] in a fusion with the globular part of H2BFWT [from S80 to K175]), and the H3N_{ter}-gH2A expression vector (which contains the sequence corresponding to the NH_2 tail of H3 fused to the histone fold domain of H2A) were prepared using standard techniques.

Recombinant *Xenopus laevis* variant H2BFWT or mutant histones were expressed in bacteria and were purified to homogeneity (13). To reconstitute nucleosomes, an equimolar mixture of the histones was dialyzed overnight at 4°C against histone folding buffer (10 mM Tris [pH 7.5], 5 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EDTA) containing 2.0 M NaCl. The histones were then mixed at a 0.8:1 molar ratio with a mixture of the ^{32}P-labeled DNA fragment and nonlabeled nucleosomal size bulk DNA (at a ratio of 1:15) and stepwise dialyzed against decreasing concentration of NaCl down to 10 mM (36).

EMSA, DNase I footprinting, and exonuclease III mapping. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was carried out in a 5% polyacrylamide gel (acrylamide/bisacrylamide ratio, 29:1 [wt/wt]) in the presence of 1% glycerol (3). DNase I footprinting and exonuclease mapping of the nucleosome boundaries were done as described previously (3, 25). Nucleosome dilution experiments were performed by using histone H3 that was ^{32}P labeled at serine 10 (11).

Histone transfer experiments. For the histone transfer experiment, swapped-tail H3-H2A mutant histone (H3N_{ter}-gH2A) was used. This allows the mutant H2A (H3N_{ter}-gH2A) to be radioactively labeled at serine 10 by the Aurora A kinase (45) and its transfer to the H3-H4 tetrameric particle to be studied.

Briefly, conventional and H2BFWT nucleosomes were reconstituted by using ^{32}P-labeled H3N_{ter}-gH2A and unlabeled 255-bp 601 DNA fragment. Several reaction mixtures containing 14 ng of histone-labeled, centrally positioned nucleosomes in remodeling buffer together with a threefold molar excess of nonlabeled tetrameric H3-H4 particles (reconstituted on a 152-bp DNA fragment containing the 5S RNA gene of *X. borealis*) and 2 μl of SWI/SNF in a 10-μl final volume were prepared. The mixtures were incubated at 30°C for different times, the reactions were arrested, and the samples were stored on ice until being loaded on the gel. EMSA was carried out at 4°C (3).

Immunofluorescence and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). HeLa or A431 cells were transfected with either GFP-H2A, GFP-H2BFWT, or HA-H2BFWT constructs by using either FuGENE 6 reagent (Roche) or Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Nucleosomes were prepared by digestion of isolated nuclei from the transfected cells with micrococcal nuclease, followed by purification on 5 to 30% sucrose gradients containing 0.6 M NaCl (13). The immunoblotting was done according to the protocol described by Mutskov et al. (36). Stable transfected cells were selected with gentamicin (500 μg/ml). The positivity of the amplified cell clones was checked by fluorescence. Stable cell clones were established as described previously (20). Photobleaching and confocal microscopy were performed on a Zeiss LSM510 laser scanning confocal instrument as described previously (20).

Mitotic chromosome assembly. Mitotic extracts from *Xenopus laevis* eggs were prepared as described previously (13). Assembly of mitotic chromosomes and nucleosome competition experiments were performed in a 50-μl final volume of reaction mixture exactly as described previously (13).

RESULTS

In vivo incorporation of HA-H2BFWT within the nucleosome. The putative histone variant H2BFWT exhibits a relatively low (45%) identity to the conventional H2B (Fig. 1A). This raises the question of whether H2BFWT is really a histone protein and whether it can be properly incorporated into the nucleosome. To address this question, we ectopically expressed HA-tagged H2BFWT in HeLa cells and visualized it by immunofluorescence microscopy (Fig. 1B and C) and Western blotting (Fig. 1D, lane 2) with anti-HA antibody. The Western blotting shows a specific reaction with the anti-HA antibody for extracts isolated from cells transfected with the HA-H2BFWT expression vector (Fig. 1D, compare lane 2 with lane 3). The anti-HA immunofluorescent staining shows that HA-H2BFWT is associated with chromatin throughout the cell cycle (Fig. 1B). This was further confirmed by staining of mitotic chromosome spreads with the anti-HA antibody (Fig. 1C). To analyze the incorporation of HA-H2BFWT into the nucleosome, nucleosomes were isolated from HeLa cells expressing HA-H2BFWT and purified through a sucrose gradient containing 0.6 M NaCl. The electrophoretic analysis shows that these highly purified nucleosomes contain only core histones and thus are free from nonhistone and nonspecifically associated proteins (Fig. 1D, lane 1). The Western blotting demonstrates that HA-H2BFWT was present within these nucleosomes (Fig. 1D, lane 4). We conclude that H2BFWT is a bona fide histone.

Remodeling and mobilization of H2BFWT nucleosomes by SWI/SNF. We have shown recently that incorporation of the histone variants macroH2A and H2ABbd results in alterations in the nucleosome structure, which, in turn, interferes with nucleosome variant remodeling (3, 20). Since H2BFWT exhibits a quite high divergence in its primary structure compared to the conventional H2B, one may think that the variant H2BFWT nucleosome would behave similarly to the macroH2A and H2ABbd nucleosomes. To test this hypothesis, we purified to homogeneity conventional core histones and the histone variant H2BFWT (Fig. 2A) and used them, together with a ^{32}P-labeled 152-bp DNA fragment containing the *X. borealis* 5S rRNA gene, to reconstitute positioned nucleosomes (Fig. 2B and C). In agreement with the in vivo data (Fig. 1), the EMSA (Fig. 2B) and the histone composition analysis (Fig. 2C) showed an efficient incorporation of H2BFWT into the nucleosome. We next analyzed the structure of the variant H2BFWT nucleosome in solution by DNase I footprinting (Fig. 2D). The DNase I cutting patterns of the conventional (Fig. 2D, lanes 1 and 2) and the H2BFWT (Fig. 2D, lanes 3 and 4) nucleosomes, in contrast to the digestion pattern of the $(H3\text{-}H4)_2$ tetramer (Fig. 2D, lane 6), are essentially the same. This somewhat surprising result strongly suggests that the structure of the H2BFWT nucleosome in solution is very close to that of the conventional nucleosome.

To study the mobilization of the H2BFWT nucleosomes, we used centrally positioned nucleosome particles reconstituted on a 255-bp 601 DNA fragment (Fig. 3A). Incubation of both conventional and H2BFWT nucleosomal particles with increasing amounts of SWI/SNF in the presence of ATP resulted in efficient mobilization of both histone octamers and the formation of end-positioned nucleosomes (Fig. 3A, compare lanes 2 to 5 with lanes 7 to 10). This was further confirmed by the exonuclease III mapping data (Fig. 3B). Indeed, these data clearly show that upon increasing the amount of added SWI/SNF, both the conventional and the H2BFWT variant octam-

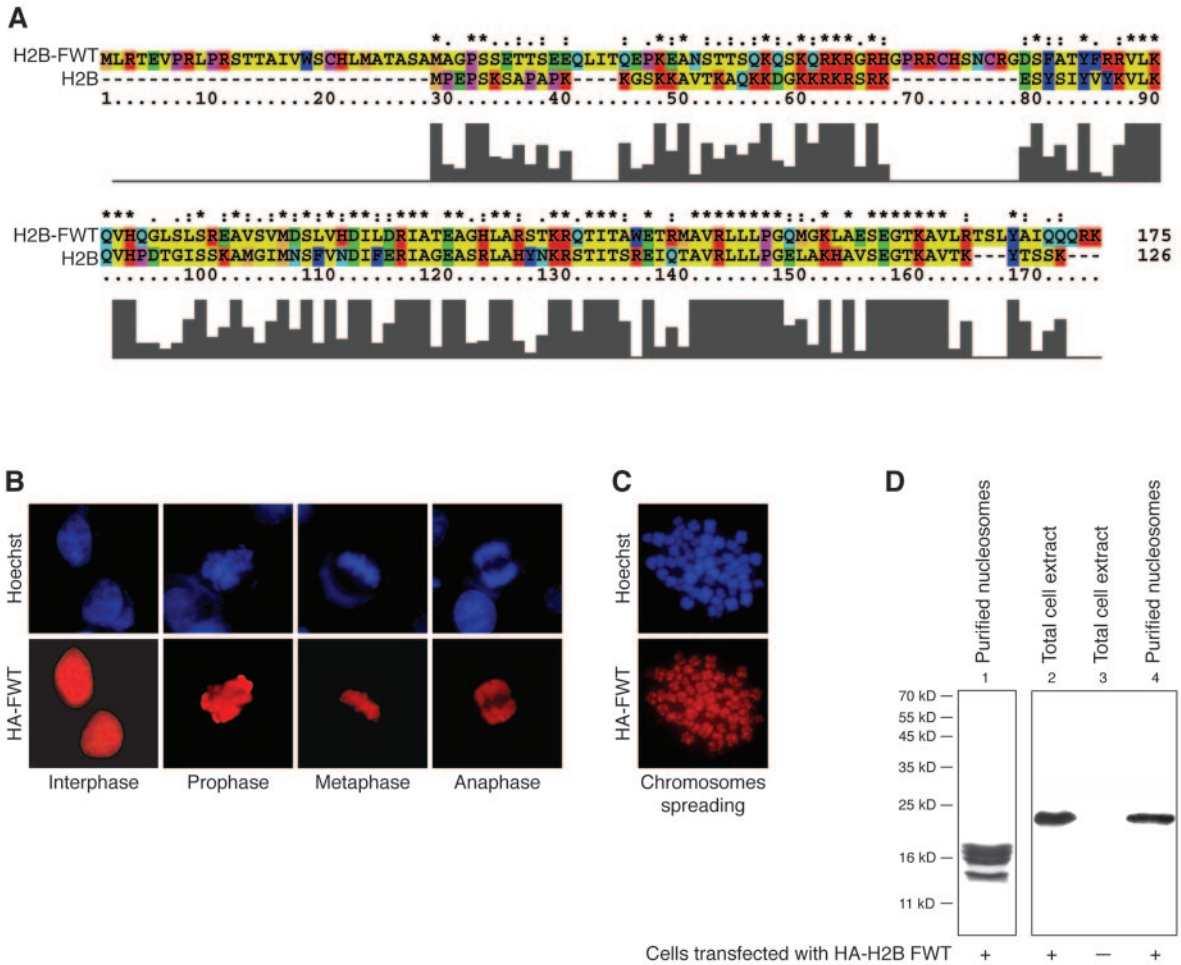


FIG. 1. The histone variant H2BFWT is assembled into nucleosomes. (A) Sequence alignment of conventional H2B and the histone variant H2BFWT. The histograms under the sequences show the degree of homology between the two proteins. The amino acid residues are shown in different colors according to their properties. (B and C) In vivo association of H2BFWT with chromatin. HeLa cells were transiently transfected with a tagged HA-H2BFWT expression vector. The presence of the tagged HA-H2BFWT at different phases of the cell cycle (B) and in spread metaphase chromosomes (C) was detected with anti-HA antibody (red). Hoechst staining of DNA is shown in blue. (D) Incorporation of H2BFWT into the nucleosomes. Nuclei isolated from HA-H2BFWT-transfected cells were digested with micrococcal nuclease, and nucleosomes were purified on a sucrose gradient containing 0.6 M NaCl. The presence of H2BFWT was detected by Western blotting by using anti-HA antibody. Lane 1, Coomassie blue staining of an 18% sodium dodecyl sulfate gel of the loaded nucleosomes. Lanes 2 to 4, Western blotting of extracts isolated from H2BFWT-transfected cells (lane 2), control nontransfected cells (lane 3), and isolated nucleosomes (lane 4). The positions of the molecular mass markers are shown on the left.

ers slide from a central to an end position (Fig. 3B, compare lanes 2 to 6 with lanes 10 to 14).

The ability of SWI/SNF to remodel H2BFWT variant nucleosomes was studied by using DNase I footprinting (Fig. 3C). In the presence of ATP, increasing amount of SWI/SNF in the reaction mixture containing either conventional or H2BFWT nucleosomes resulted in dramatic changes in the DNase I cutting patterns of both particles (Fig. 3C, compare lanes 1 to 5 with lanes 6 to 10), and with the larger amount of SWI/SNF used, the patterns were very similar to that of naked DNA (lane 11). These changes reflect the alterations in the histone-DNA interactions generated by the action of SWI/SNF. Therefore, SWI/SNF was able, as in the case of conventional nucleosomes, to remodel the variant H2BFWT particle. In agreement with this, we found that SWI/SNF has the capacity to induce an efficient transfer of the variant H2A-H2BFWT dimer to a $(H3\text{-}H4)_2$ tetrameric particle (Fig. 3D). In this experiment, we used centrally positioned conventional and variant H2BFWT nucleosomes reconstituted on a 255-bp fragment containing the 601 positioning sequence by using ^{32}P-radiolabeled H2A. The tetrameric particle was reconstituted on a 152-bp fragment which contains the *Xenopus borealis* 5S rRNA gene. When these nucleosomes were mixed with the nonlabeled tetrameric particles in the presence of ATP and SWI/SNF, both labeled octamers were mobilized, and then the labeled conventional H2A-H2B or H2A-H2BFWT variant dimers were transferred efficiently to the tetrameric particles (Fig. 3D, lanes 6 to 10 and lanes 16 to 20). This transfer is dependent on SWI/SNF, since in the absence of the remodeler, no transfer is observed (Fig. 3D, lanes 1 to 5 and lanes 11 to 15). These data demonstrate that H2BFWT does not affect the SWI/SNF-dependent transfer of the heterotypic dimer to the tetrameric particle.

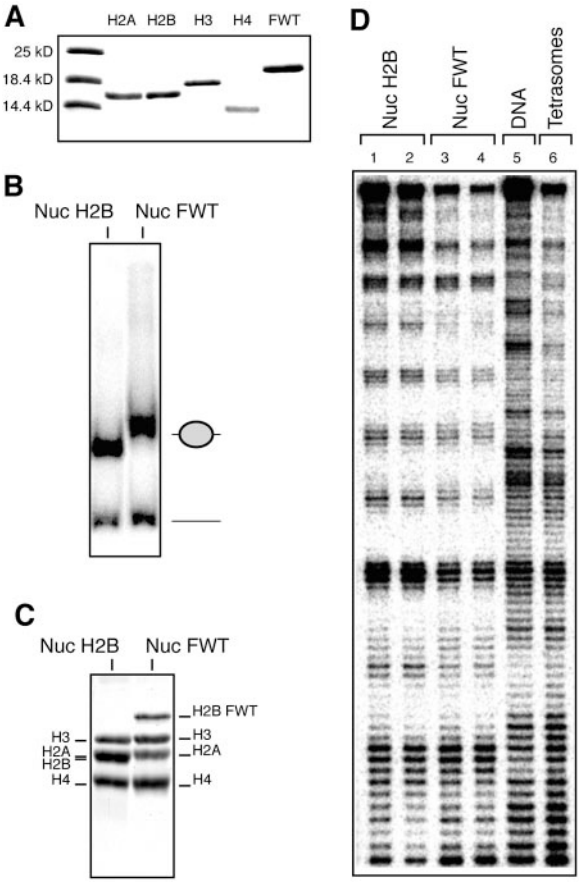


FIG. 2. The presence of H2BFWT has no effect on the structure of the nucleosome. An equimolar mixture of purified-to-homogeneity recombinant core histones H2A, H3, and H4 and either conventional H2A or histone variant H2BFWT and a 152-bp EcoRI-RsaI ^{32}P-end-labeled DNA fragment containing the *X. borealis* 5S RNA gene were used to reconstitute nucleosomes. (A) An 18% sodium dodecyl sulfate electrophoresis of conventional core histones and the histone variant H2BFWT. The first lane shows the molecular mass markers. (B) EMSA of the reconstituted conventional (Nuc) and histone variant H2BFWT (Nuc FWT) nucleosomes. The positions of the nucleosomes and the free DNA are shown on the right. (C) Histone composition of the reconstituted nucleosomes. Preparative EMSA was carried out, the conventional and H2BFWT nucleosome bands were cut from the gel, and the nucleoproteins were eluted. Histones were isolated and separated by 18% sodium dodecyl sulfate electrophoresis, and the gel was stained with Coomassie blue. The positions of the histones are indicated. (D) DNase I footprinting of reconstituted conventional H2AB nucleosomes (in duplicate, lanes 1 and 2), variant H2AB nucleosomes (in duplicate, lanes 3 and 4), and tetrasomal particles containing only the $(H3\text{-}H4)_2$ tetramer (lane 6). Lane 5, footprinting of naked DNA.

Stability of the H2BFWT variant nucleosome. Does the presence of H2BFWT affect the stability of the variant nucleosome? This question was addressed both in vitro and in vivo (Fig. 4). We have recently demonstrated that at a very low nucleosome concentration a selective release of the heterotypic H2A-H2B dimer from the nucleosome particle occurs (11). This release results in the formation of a tetrameric $(H3\text{-}H4)_2$ particle and reflects the strength of the interaction of the H2A-H2B dimer with both the $(H3\text{-}H4)_2$ tetramer and the nucleosomal DNA, i.e., the internal stability of the nucleosome (11). To study the dissociation of H2A-H2BFWT from the nucleosome at a very low nucleosome concentration, we reconstituted both conventional and H2BFWT variant nucleosomes by using ^{32}P-labeled histone H3 and a 241-bp DNA fragment containing the 601 positioned sequence (11) (the use of ^{32}P-labeled H3 was crucial in this experiment, since this has allowed us to visualize the particles at a very low concentration). EMSA was then carried out to follow the release of the heterotypic conventional and H2A-H2BFWT dimers from the nucleosome upon successive twofold dilutions in the range of 50 to 1.5 nM nucleosome particles (Fig. 4A). Upon dilution, in addition to the nucleosome band, a second band corresponding to the tetrameric $(H3\text{-}H4)_2$ particle was observed (Fig. 4A) (it should be noted that identical volumes of individual samples were loaded on the gel, and each successively loaded sample contains half as much radioactivity as the previous one). Interestingly, at the same nucleosome dilution, the extents of dissociation of the conventional H2A-H2B- and variant H2A-H2BFWT dimers were very similar, thus suggesting very similar in vitro stabilities of conventional and H2BFWT variant nucleosomes (Fig. 4A).

The in vivo stability of the H2BFWT nucleosome was analyzed in a series of FRAP experiments by using stable cell lines expressing either GFP-H2A or GFP-H2BFWT (Fig. 4B). In these cell lines the GFP fusions were assembled into nucleosomes, and no free fusions were present (reference 20 and results not shown). A small rectangular area of the nucleus of a single cell expressing either GFP-H2A or GFP-H2BFWT was photobleached (Fig. 4B). Pictures were taken before the photobleaching and then at the indicated times during the recovery of fluorescence (Fig. 4B). The results show that the recovery kinetics are very similar for both fusions (Fig. 4B and C), showing that GFP-H2BFWT exchanges as quickly as the conventional fusion, GFP-H2A. Since the histone exchange rate directly reflects the stability of the nucleosome particle (29), the above-described FRAP data allow the conclusion that the conventional and the H2BFWT nucleosomes exhibit very similar stability.

H2BFWT and assembly of mitotic chromosomes. The NH_2 tail of the conventional histone H2B is crucial for condensation and assembly of mitotic chromosomes (13). The reported data suggest that conserved factors, essential for chromosome condensation, specifically recognize the tail of histone H2B and assist the assembly of mitotic chromosomes (13, 14). The NH_2 tail of H2BFWT is, however, the most divergent H2BFWT domain compared to the respective domains of conventional H2B (Fig. 1A). This suggests that H2BFWT may not be able to play a role similar to that of H2B in chromosome condensation. We tested this hypothesis by the approach we have applied to demonstrate the role of H2B in chromosome condensation in a series of nucleosome competition experiments (13).

We used *Xenopus* egg extract and demembranated *Xenopus* sperm nuclei to assemble mitotic chromosomes (14). Incubation of the sperm in the extract was initially accompanied by a very rapid massive decondensation (Fig. 5A), which reflects the release of the protamine-like proteins from the sperm and their replacement with histones (16, 40). Further incubation resulted in condensation of chromatin and finally in the formation of well-defined chromosomes (Fig. 5A, control) (14). In agreement with reports in the literature (13), when exogenous reconstituted conventional nucleosomes at a concentra-

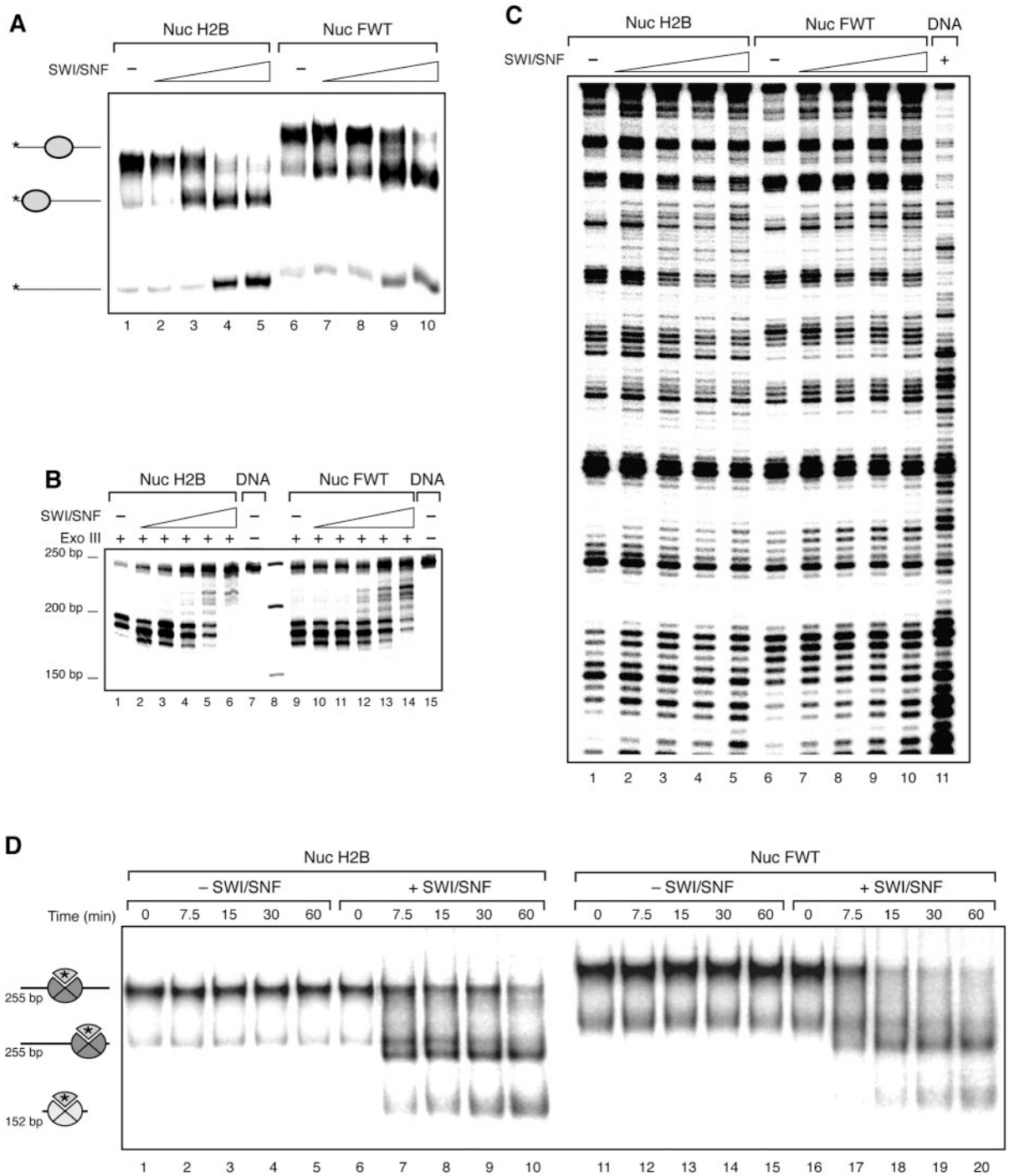


FIG. 3. SWI/SNF remodels and mobilizes conventional and variant H2BFWT nucleosomes. (A) A 255-bp DNA fragment containing the positioning sequence 601 was used to reconstitute conventional and variant H2BFWT centrally positioned nucleosomes. Both types of nucleosomes were incubated with increasing amounts of SWI/SNF in the presence of ATP for 30 min at 30°C. The mobility of the histone octamers was assessed on a 5.5% native polyacrylamide gel. On the left are indicated the positions of the centrally and end-positioned nucleosomes and free DNA. (B) Exonuclease III mapping of the positions of conventional and H2BFWT nucleosomes. Both types of nucleosomes were incubated with SWI/SNF as described for panel A and, after the reaction was arrested, digested with exonuclease III. (C) DNase I footprinting of conventional (lanes 1 to 5) and variant H2BFWT (lanes 6 to 10) nucleosomes, reconstituted on the 152-bp EcoRI-RsaI ^{32}P-end-labeled DNA fragment containing the *X. borealis* 5S RNA. The nucleosomes were incubated with SWI/SNF as for panel A and then subjected to DNase I digestion. Lane 11, DNase I digestion pattern of naked DNA. (D) The H2A-H2BFWT dimer is transferred efficiently to an $(H3\text{-}H4)_2$ tetrameric particle. Conventional and H2BFWT variant nucleosomes were reconstituted on a 255-bp DNA fragment which contains the 601 positioning sequence by using radioactively labeled H2A. Histone H3-H4 particles were reconstituted on a 152-bp fragment containing the *X. borealis* 5S gene. The nucleosomes were incubated in the presence of a threefold molar excess of tetrameric particles at 30°C for the indicated times in the presence or absence of SWI/SNF. The positions of the centrally and end-positioned 255-bp nucleosomes and of the 152-bp nucleosomes are indicated. The asterisk indicates the radioactively labeled H2A. Note that the conventional H2A-H2B and the variant H2A-H2BFWT dimers exhibit very similar efficiencies of transfer to the tetrameric particles.

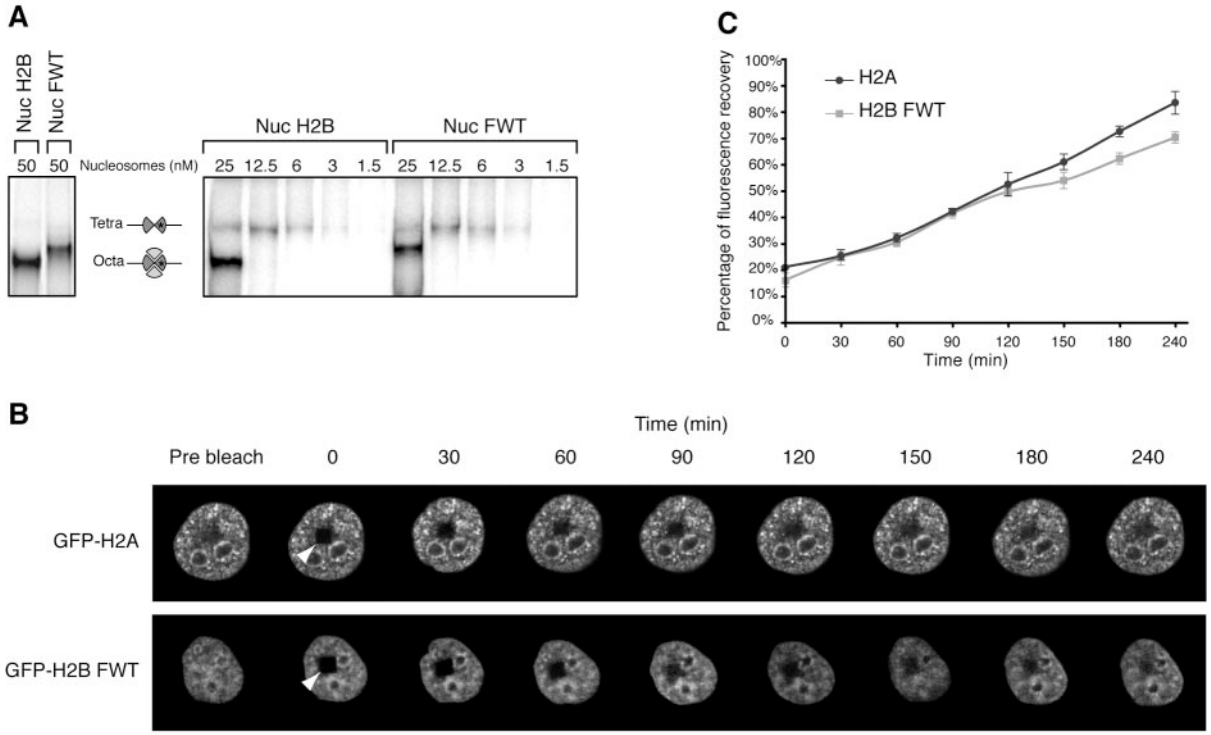


FIG. 4. In vitro and in vivo stabilities of the variant H2BFWT nucleosome. (A) The H2BFWT variant nucleosome exhibits in vitro the same stability as the conventional H2A nucleosome. Conventional and variant H2BFWT nucleosomes and tetrameric $(H3\text{-}H4)_2$ particles were reconstituted by using ^{32}P-labeled histone H3. The samples were diluted to the indicated concentrations with 1× phosphate-buffered saline and run on a native 5.5% polyacrylamide gel. On the left are shown the conventional and H2BFWT nucleosomes at 50 nM. The positions of the intact nucleosomes and tetrameric particles are indicated. Note that upon dilution, the conventional H2A-H2B and the variant H2A-H2BFWT dimers are released with essentially the same efficiency from the reconstituted nucleosomes. (B) FRAP analysis of the mobility of the GFP-H2BFWT variant fusion. Cells stably expressing either GFP-H2A or GFP-H2BFWT were photobleached, and images were recorded at the indicated times postbleaching. The rectangular bleached area is designated by an arrowhead. Images of the cell before bleaching (prebleach) are also shown. (C) Quantification of the data shown in panel B. The means and standard deviations for 45 nuclei from five independent experiments are shown.

tion of 30 ng/μl were added to the reaction mixture, the assembly was inhibited and the process was arrested at the decondensation state (Fig. 5A, Nuc H2B). This phenomenon is associated with the titration of chromosome assembly factors by the NH_2 tails of the exogenous nucleosomes and in particular by the NH_2 tail of histone H2B (13, 14). As a result of the titration, these chromosome assembly factors are no longer available for the decondensed sperm nuclei, and the nuclei fail to further assemble into chromosomes (13, 14). The addition of the same concentration of H2BFWT variant nucleosomes, however, had no effect on the assembly of chromosomes (Fig. 5A, Nuc FWT). Indeed, after 90 min of incubation of the sperm nuclei in the extract in the presence of H2BFWT nucleosomes, piles of well-defined chromosomes (Fig. 5A, Nuc FWT), indistinguishable from the assembled ones in the control reaction (Fig. 5A, control), were observed. Importantly, even an increase in the added H2BFWT nucleosomes in the chromosome assembly reaction of one order of magnitude did not affect the assembly process (Fig. 5B). Therefore, the variant H2BFWT nucleosomes, in contrast to the conventional nucleosomes, were unable to interfere with the mitotic chromosome assembly. Chromosome condensation was also completely inhibited when a mixture of conventional and H2BFWT nucleosomes was used in the competition experiments (results not shown), showing that the H2BFWT nucleosomes do not contain contaminants which could interact with inhibitors of chromosome condensation and affect their ability to function properly.

Bearing in mind that (i) the NH_2 tail of conventional H2B is crucial for the assembly of mitotic chromosomes and (ii) the NH_2 tail of H2B is quite divergent from that of H2BFWT, these results indicate that the H2BFWT tail could be responsible for the inability of H2BFWT nucleosomes to inhibit chromosome assembly. If this was correct, a chimeric nucleosome containing, instead of H2BFWT, a fusion of the tail of conventional H2B with the histone fold motif of H2BFWT (N_{ter}H2B-FWT) would inhibit the condensation process. We found that this was actually the case, since the addition of only 30 ng/μl of N_{ter}H2B-FWT nucleosomes completely rescued the inhibition and the assembly process was arrested at the decondensation state (Fig. 5A and B).

DISCUSSION

The incorporation of a histone variant into the histone octamer may create a nucleosome with a different structure and

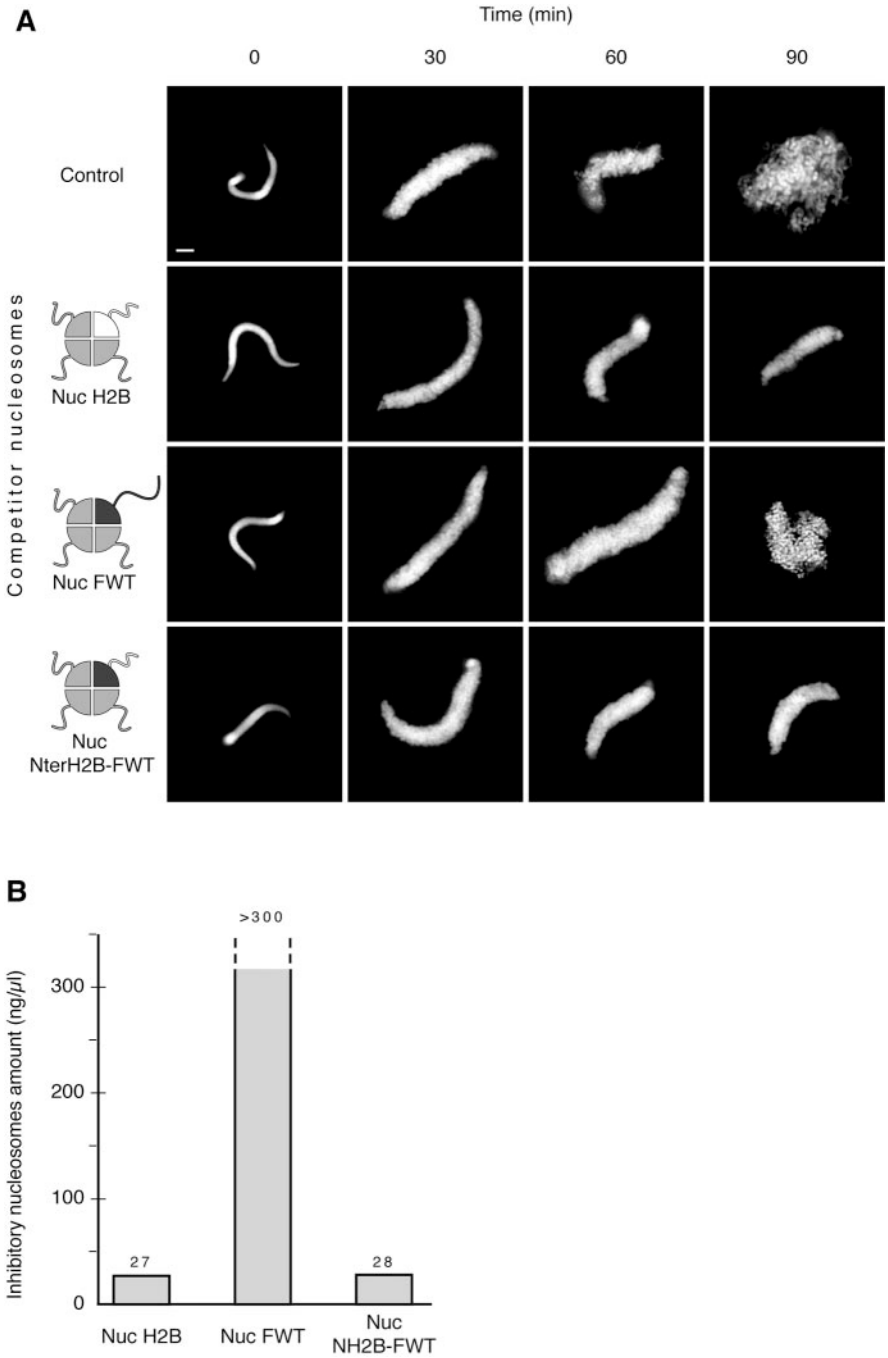


FIG. 5. The assembly of mitotic chromosomes in *Xenopus* egg extract is not inhibited by the variant H2BFWT nucleosomes, in contrast to conventional nucleosomes. (A) Demembranated sperm nuclei were incubated in the extract for the times indicated in the absence (control) or in the presence of either conventional H2B (Nuc H2B), variant H2BFWT (Nuc FWT), or fusion NterH2B-histone fold H2BFWT (Nuc N_{ter}H2B-FWT) nucleosomes at a concentration of 30 ng per μl of extract. After fixation and staining with Hoechst 33258, the assembled structures were observed by fluorescence microscopy. The reconstituted particles are schematically presented on the left. Conventional H2B is in white, while H2BFWT is in black. Note that both the conventional and the fusion NterH2B-histone fold H2BFWT nucleosomes inhibit chromosome assembly, while the variant H2BFWT nucleosomes do not. Bar, 5 μm. (B) Quantification of the minimal nucleosome amount that is able to inhibit mitotic chromosome condensation. Increasing amount of conventional H2B (Nuc H2B), variant H2BFWT (Nuc FWT), or fusion N_{ter}H2B-histone fold H2BFWT (Nuc N_{ter}H2B-FWT) nucleosomes were added to the chromosome assembly reaction mixture, and the minimal concentration of nucleosomes sufficient to inhibit chromosome condensation was measured. Note that even the use of 300 ng/μl of competitor H2BFWT nucleosomes (the highest nucleosomal concentration possible to be used in the experiments) was unable to inhibit the assembly process.

distinct properties. For example, the incorporation of either macroH2A or H2ABbd into the nucleosome resulted in alterations in its structure, which appeared to interfere with both nucleosome remodeling and mobilization (3, 4). H2ABbd nucleosomal arrays are more easily transcribed than their conventional counterparts (4), while the presence of macroH2A may interfere with transcription (39). In addition, H2ABbd nucleosomes showed lower stability both in vitro and in vivo (20). The structure of the variant H2A.Z nucleosome exhibited an extended acidic surface across the face of the H2A.Z octamer (47), which could be important for chromatin fiber folding (19). Thus, the incorporation of variants of the histone H2A family within the histone octamer results in alterations in the nucleosome structure, which may have functional consequences.

Here we have carried out a detailed structural and functional analysis of a nucleosome reconstituted with H2BFWT, a recently cloned putative histone variant showing only 45% identity with conventional H2B (10). We have demonstrated that H2BFWT is a bona fide histone. The reconstituted H2BFWT nucleosomes, in contrast to the H2A variant nucleosomes, were both in vitro and in vivo structurally and dynamically indistinguishable from those reconstituted with conventional histones. In addition, the H2BFWT nucleosomes, unlike the H2ABbd and macroH2A nucleosomes, were efficiently mobilized and remodeled by SWI/SNF. These structural and functional properties of the H2BFWT nucleosomes are determined mainly by the structure of the histone fold domain of the whole variant octamer and its interaction with DNA, which should be very similar to those of the conventional octamer. Interestingly, the structural properties of the hTSH2B nucleosome, the only other histone H2B variant nucleosome studied, were also reported to be the same as those of the conventional nucleosome (31). This indicates that in general the incorporation of an H2B variant within the histone octamer may not alter the properties of the nucleosome, which depends on the structure of the histone fold domain of the octamer.

The NH_2 tail of H2BFWT is very divergent from the conventional NH_2 tail of H2B (Fig. 1A), suggesting that the H2BFWT nucleosome may exhibit distinct NH_2 tail-dependent properties. The NH_2 tail of H2B is crucial for mitotic chromosome assembly, since conserved (between species) chromosome assembly factors interact specifically with it and this allows chromosome condensation to proceed (Fig. 5A) (13, 14). Our competition experiments with *Xenopus* egg extract showed that H2BFWT nucleosomes do not appear to be able to interact with and to titrate these factors from the extract, since the addition of one order of magnitude more of H2BFWT nucleosomes compared to the amount of conventional nucleosomes did not inhibit the assembly of mitotic chromosomes (Fig. 5B). This distinct property of H2BFWT resides in its NH_2 tail, as nucleosomes reconstituted with the fusion N_{ter}H2B-FWT were found to be indistinguishable from the conventional ones in their ability to inhibit chromosome assembly (Fig. 5A and B).

Recent experiments with somatic cells, possessing very large telomeric sequences, indicate that the telomere interstitial blocks might be enriched in H2BFWT (10). The telomere chromatin exhibits a specific chromatin structure (34), and closed chromatin loops are present at the end of the chromosomes (37); thus, H2BFWT may assist in the preservation of this structure during mitosis and consequently its conservation and transmission during the cell cycle. This could be essential for the proper function of the telomeres. Importantly, H2BFWT was found in sperm nuclei, and the reported data suggest that H2BFWT colocalized again with the telomeric sequences (10). We speculate that H2BFWT, like CENP-A (which remains associated with the centromeres in mature spermatozoa [38]), is an epigenetic marker required for telomeric identity and necessary for the transmission of specific chromatin structure (the telomeric chromatin) through generations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNRS, INSERM, Région Rhône-Alpes, and grants from the Ministère de la Recherche (ACI Biologie Cellulaire Moléculaire et Structurale [BCM0070]; ACI Interface Physique-Chimie-Biologie: Dynamique et réactivité des Assemblages Biologiques [DRAB], 2004, no. 04 2 136; and ANR project no. NT05-1_41978).

REFERENCES

1. **Allan, J., N. Harborne, D. C. Rau, and H. Gould.** 1982. Participation of core histone "tails" in the stabilization of the chromatin solenoid. J. Cell Biol. **93:**285–297.
2. **An, W., V. B. Palhan, M. A. Karymov, S. H. Leuba, and R. G. Roeder.** 2002. Selective requirements for histone H3 and H4 N termini in p300-dependent transcriptional activation from chromatin. Mol. Cell **9:**811–821.
3. **Angelov, D., A. Molla, P. Y. Perche, F. Hans, J. Cote, S. Khochbin, P. Bouvet, and S. Dimitrov.** 2003. The Histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. Mol. Cell **11:**1033–1041.
4. **Angelov, D., A. Verdel, W. An, V. Bondarenko, F. Hans, C. M. Doyen, V. M. Studitsky, A. Hamiche, R. G. Roeder, P. Bouvet, and S. Dimitrov.** 2004. SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. EMBO J. **23:**3815–3824.
5. **Arents, G., R. W. Burlingame, B.-C. Wang, W. E. Love, and E. N. Moudrianakis.** 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88:**10148–10152.
6. **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. USA **92:**11170–11174.
7. **Ausio, J., F. Dong, and K. E. van Holde.** 1989. Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone "tails" in the stabilization of the nucleosome. J. Mol. Biol. **206:**451–463.
8. **Bassing, C. H., H. Suh, D. O. Ferguson, K. F. Chua, J. Manis, M. Eckersdorff, M. Gleason, R. Bronson, C. Lee, and F. W. Alt.** 2003. Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. Cell **114:**359–370.
9. **Celeste, A., S. Difilippantonio, M. J. Difilippantonio, O. Fernandez-Capetillo, D. R. Pilch, O. A. Sedelnikova, M. Eckhaus, T. Ried, W. M. Bonner, and A. Nussenzweig.** 2003. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. Cell **114:**371–383.
10. **Churikov, D., J. Siino, M. Svetlova, K. Zhang, A. Gineitis, E. Morton Bradbury, and A. Zalensky.** 2004. Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. Genomics **84:**745–756.
11. **Claudet, C., D. Angelov, P. Bouvet, S. Dimitrov, and J. Bednar.** 2005. Histone octamer instability under single molecule experiment conditions. J. Biol. Chem. **280:**19958–19965.
12. **Costanzi, C., and J. R. Pehrson.** 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. Nature **393:**599–601.
13. **de la Barre, A. E., D. Angelov, A. Molla, and S. Dimitrov.** 2001. The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. EMBO J. **20:**6383–6393.
14. **de la Barre, A. E., V. Gerson, S. Gout, M. Creaven, C. D. Allis, and S. Dimitrov.** 2000. Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. EMBO J. **19:**379–391.
15. **Dhillon, N., and R. T. Kamakaka.** 2000. A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. Mol. Cell **6:**769–780.
16. **Dimitrov, S., M. C. Dasso, and A. P. Wolffe.** 1994. Remodeling sperm chromatin in Xenopus laevis egg extracts: the role of core histone phosphorylation and linker histone B4 in chromatin assembly. J. Cell Biol. **126:**591–601.
17. **Dimitrov, S. I., T. M. Apostolova, V. L. Makarov, and I. G. Pashev.** 1986. Chromatin superstructure. A study with an immobilized trypsin. FEBS Lett. **200:**322–326.

18. **Dorigo, B., T. Schalch, K. Bystricky, and T. J. Richmond.** 2003. Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. J. Mol. Biol. **327:**85–96.
19. **Fan, J. Y., D. Rangasamy, K. Luger, and D. J. Tremethick.** 2004. H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1alpha-mediated chromatin fiber folding. Mol. Cell **16:**655–661.
20. **Gautier, T., D. W. Abbott, A. Molla, A. Verdel, J. Ausio, and S. Dimitrov.** 2004. Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. EMBO Rep. **5:**715–720.
21. **Gineitis, A. A., I. A. Zalenskaya, P. M. Yau, E. M. Bradbury, and A. O. Zalensky.** 2000. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. J. Cell Biol. **151:**1591–1598.
22. **Govin, J., C. Caron, S. Rousseaux, and S. Khochbin.** 2005. Testis-specific histone H3 expression in somatic cells. Trends Biochem. Sci. **30:**357–359.
23. **Hansen, J. C.** 2002. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **31:**361–392.
24. **Hayes, J. J., D. J. Clark, and A. P. Wolffe.** 1991. Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88:**6829–6883.
25. **Hayes, J. J., and K. M. Lee.** 1997. In vitro reconstitution and analysis of mononucleosomes containing defined DNAs and proteins. Methods **12:**2–9.
26. **Henikoff, S., and K. Ahmad.** 2005. Assembly of Variant Histones into Chromatin. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **21:**133–153.
27. **Henikoff, S., and Y. Dalal.** 2005. Centromeric chromatin: what makes it unique? Curr. Opin. Genet. Dev. **15:**177–184.
28. **Hernandez-Munoz, I., A. H. Lund, P. van der Stoop, E. Boutsma, I. Muijrers, E. Verhoeven, D. A. Nusinow, B. Panning, Y. Marahrens, and M. van Lohuizen.** 2005. Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102:**7635–7640.
29. **Kimura, H., and P. R. Cook.** 2001. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. J. Cell Biol. **153:**1341–1353.
30. **Lee, K.-M., and J. J. Hayes.** 1998. Linker DNA and H1-dependent reorganization of histone-DNA interactions within the nucleosome. Biochemistry **37:**8622–8628.
31. **Li, A., A. H. Maffey, W. D. Abbott, N. Conde e Silva, A. Prunell, J. Siino, D. Churikov, A. O. Zalensky, and J. Ausio.** 2005. Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). Biochemistry **44:**2529–2535.
32. **Lowary, P. T., and J. Widom.** 1998. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. J. Mol. Biol. **276:**19–42.
33. **Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond.** 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature **389:**251–260.
34. **Makarov, V. L., S. Lejnine, J. Bedoyan, and J. P. Langmore.** 1993. Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. Cell **73:**775–787.
35. **Malik, H. S., and S. Henikoff.** 2003. Phylogenomics of the nucleosome. Nat. Struct. Biol. **10:**882–891.
36. **Mutskov, V., D. Gerber, D. Angelov, J. Ausio, J. Workman, and S. Dimitrov.** 1998. Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. Mol. Cell. Biol. **18:**6293–6304.
37. **Nikitina, T., and C. L. Woodcock.** 2004. Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. J. Cell Biol. **166:**161–165.
38. **Palmer, D. K., K. O'Day, and R. L. Margolis.** 1990. The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. Chromosoma **100:**32–36.
39. **Perche, P., C. Vourch, C. Souchier, M. Robert-Nicoud, S. Dimitrov, and C. Khochbin.** 2000. Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. Curr. Biol. **10:**1531–1534.
40. **Philpott, A., G. H. Leno, and R. A. Laskey.** 1991. Sperm decondensation in Xenopus egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. Cell **65:**569–578.
41. **Rangasamy, D., I. Greaves, and D. J. Tremethick.** 2004. RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. Nat. Struct. Mol. Biol. **11:**650–655.
42. **Redon, C., D. Pilch, E. Rogakou, O. Sedelnikova, K. Newrock, and W. Bonner.** 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. Curr. Opin. Genet. Dev. **12:**162–169.
43. **Santisteban, M. S., T. Kalashnikova, and M. M. Smith.** 2000. Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. Cell **103:**411–422.
44. **Sarma, K., and D. Reinberg.** 2005. Histone variants meet their match. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **6:**139–149.
45. **Scrittori, L., F. Hans, D. Angelov, M. Charra, C. Prigent, and S. Dimitrov.** 2001. pEg2 aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in Xenopus egg extract. J. Biol. Chem. **276:**30002–30010.
46. **Stefanovsky, V., S. I. Dimitrov, V. R. Russanova, D. Angelov, and I. G. Pashev.** 1989. Laser-induced crosslinking of histones to DNA in chromatin and core particles: implications in studying histone-DNA interactions. Nucleic Acids Res. **17:**10069–10081.
47. **Suto, R. K., M. J. Clarkson, D. J. Tremethick, and K. Luger.** 2000. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. Nat. Struct. Biol. **7:**1121–1124.
48. **van Holde, K.** 1988. Chromatin. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.

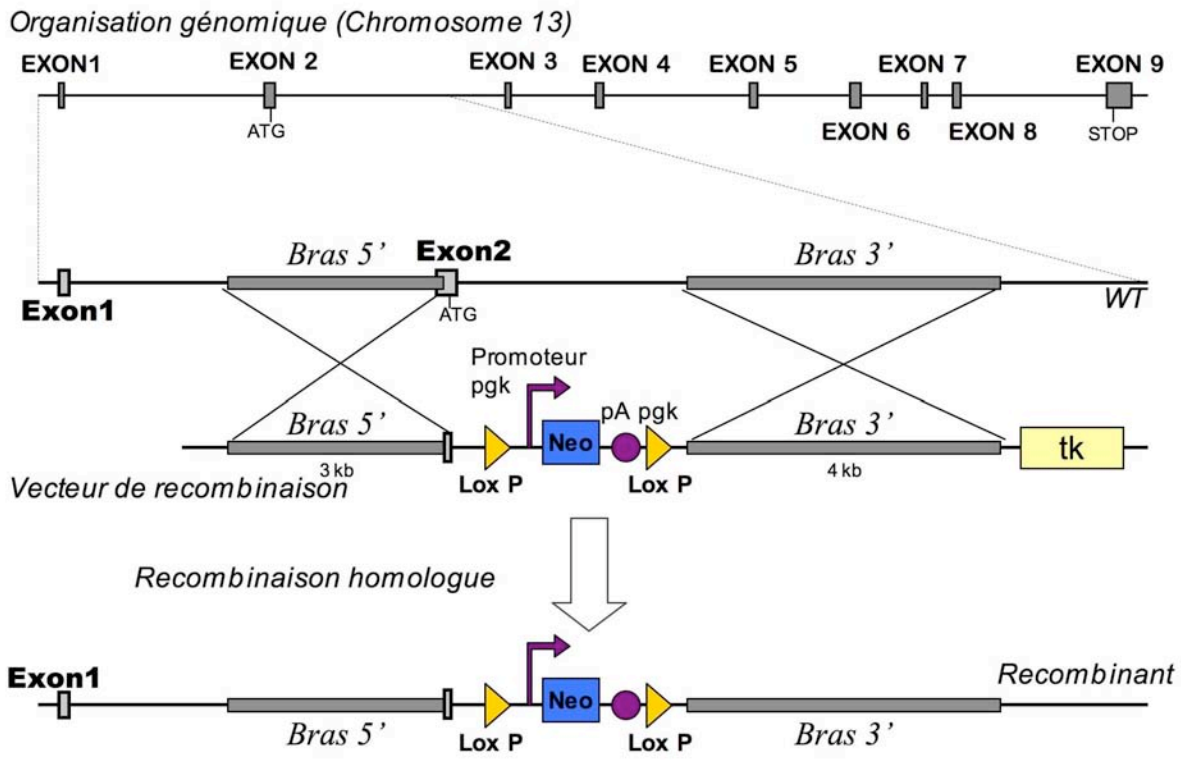


Figure 20 : Stratégie d'invalidation génique de macroH2A1

La stratégie utilisée a pour but la création d'un mutant nul.
Le diagramme montre la composition en exon de la séquence génomique codante pour macroH2A. L'exon 1 n'est pas codant et le codon initiateur est situé dans l'exon 2. La stratégie d'invalidation génique utilisée consiste à substituer par recombinaison homologue une partie de l'exon 2 par une cassette codante pour le gène de résistance à la néomycine. Le bras de recombinaison 5' a été conçu de manière à ce que toute la partie de l'exon en amont de l'ATG soit conservée. De cette façon, le site accepteur d'épissage de l'exon 2 est conservé. L'épissage de l'exon 1 sur l'exon 2 tronqué fusionné à néo se trouve ainsi favorisé. Le gène de résistance est placé sous l'influence du promoteur et du site de polyadénylation pgk (phosphoglycerol kinase). La cassette neo est flanquée de deux sites LoxP orientés dans le même sens, ce qui permet de l'éliminer par croisement des animaux avec une lignée exprimant le transgène codant pour la cre-recombinase.

II.2. Étude in vivo du variant macroH2A1

II.2.1. Matériels et méthodes : Création d'une lignée de souris *knock out* macroH2A1$^{-/-}$

II.2.1.1. Stratégie

Dans le but de comprendre la fonction biologique de macroH2A1 *in vivo* et au cours du développement, nous avons entrepris la création d'une lignée de souris invalidées pour le gène codant pour macroH2A1.

Le gène murin codant macroH2A1 est appelé *H2AY*. Il est constitué de 9 exons localisés sur le chromosome 13 (figure 20). L'exon 1 n'est pas codant et le codon ATG initiateur de la traduction se trouve dans l'exon 2 qui code environ la moitié de *l'histone fold*. Afin d'abolir totalement l'expression de macroH2A1, nous avons entrepris de remplacer par recombinaison homologue l'exon 2 par une cassette contenant un gène de résistance à la néomycine *floxé* ainsi que le signal de polyadénylation de la PGK (figure 20).
Le prochain codon initiateur ATG en phase avec le cadre de lecture ne permet que la traduction d'une petite protéine de 30 acides aminés, ne correspondant ni à un histone ni au macro-domaine fonctionnel.
Les premières bases de l'exon 2 en amont de l'ATG sont conservées après recombinaison homologue afin de maintenir l'épissage de l'exon 1 sur l'exon 2.
Les isoformes macroH2A1.1 et macroH2A1.2 résultant d'un épissage alternatif de l'exon 6, l'élimination de l'exon 2 aboutit à la suppression de l'expression des deux formes d'épissage (figure 14).

II.2.1.2. Construction du vecteur de recombinaison

Les bras de recombinaison ont d'abord été amplifiés par PCR en utilisant comme polymérase : *Phusion (Finnzymes)* à partir d'ADN génomique extrait des cellules ES E14.1 ; puis clonés dans le vecteur de recombinaison pLNTK initialement décrit dans (Gorman *et coll.*, 1996) et modifié dans (Bertocci *et coll.*, 2002).

Le bras de recombinaison 5' couvrant 3 kb en amont de l'ATG (exon 2) fut amplifié avec les amorces suivantes : 5'-AGCTCGAGCTAGAATGGTGAACAGGTTGGAAGG - 3' (sens) ; 5'-TTGTCGACAAACAGATCAGCGAGCTCACTGC- 3' (anti-sens). Le bras de recombinaison 3' situé 2 kb en aval de l'ATG et couvrant 4 kb fut amplifié avec les amorces suivantes : 5'-AGCTCGAGCTGGTCTGCACACATCCTTTAAGG- 3' (sens) ; 5'-ACAGGAGTCAAGATGGTGGCTGGG- 3' (anti-sens).

Les fragments ainsi obtenus ont été insérés au moyen des sites de restriction inclus dans les amorces, dans les sites de clonage SalI et XhoI du vecteur pLNTK situés de part et d'autre du gène de résistance néomycine (neoR).

II.2.1.3. Génération des souris déficientes macroH2A1$^{-/-}$

Les cellules souches embryonnaires E14.1 (lignée 129ola) ont été transfectées comme précédemment décrit (Torres, 1997) puis sélectionnées grâce à un double traitement au G418 et au ganciclovir comme décrit précédemment (Kuhn *et coll.*, 1991) (annexe).

Les clones résistants ont ensuite été screenés par longue PCR en utilisant les amorces : Screen S, située en amont du bras de recombinaison 5' : 5'-TGTGACTTGTCTCTCAGCCATCAGG- 3' ; NeoR, situé dans le gène de résistance à la néomycine du vecteur pLNTK : 5'-GCTGGACGTAAACTCCTCTTCAGAC- 3'.

2 clones sur les 288 testés se sont révélés positifs. La recombinaison homologue a été confirmée par Southern-blot (annexe). Une sonde située en amont du bras de recombinaison 5' a été utilisée (annexe). Un southern-blot a également été réalisé pour contrôle la recombinaison sur l'extrémité 3' (donnée non montrée).

Les deux clones (n°223 et n°277) ont été injectés dans des blastocystes C57/Bl6 comme décrit précédemment (Shinkai *et coll.*, 1992). Les blastocyste ont été réintroduit dans des femelles OF-1 pseudogestantes.

Les mâles chimères résultants ont été accouplés avec des femelles WT C57/Bl6 et testés pour la transmission de la mutation à la lignée germinale.

L'ES E14.1 utilisée est de souche 129 ola, dont le pelage est chinchilla, ce qui permet de savoir si la déscendance est issue de la cellule ES recombinante ou du blastocyte WT (la souche C57/Bl6 étant de couleur noire).

Une PCR amplifiant simultanément l'allèle *Wild type* (800 pb) et l'allèle mutant (500 pb), utilisant les amorces 5'-GTCACAGGATGAAATGTGCGAAGC-3' (sens), 5'-CCACCACACCCAAGCCATAGTGCC-3' (anti-sens *wild type*),

5'-GCTGGACGTAAACTCCTCTTCAGAC-3' (anti-sens dans neoR) a permis d'établir le génotype des souris. Cette PCR a été effectuée en utilisant l'enzyme Taq polymerase (*New England Biolabs*), en conditions standards à une température d'hybridation de 53°C (annexe).

II.2.1.4. Extraction des noyaux à partir de tissus

Les tissus ont été broyés à l'*ultra turrax* à vitesse maximale dans du tampon hypo-osmotique HB (250 mM sucrose, 3mM CaCl2, 20 mM Tris-HCl pH 7, PMSF 1mM), et laissés 15 minutes sur la glace avant d'être filtrés à 50 µm, puis centrifugés 5 minutes à 218 g à 4°C dans un rotor Sorval HB6. Le culot a été lavé deux fois dans 0,25M sucrose, 10 mM $MgCl_2$ avant d'être déposé sur un coussin de 0,88 mM sucrose, 0,05mM $MgCl_2$, et centrifugé 10 minutes à 1200g à 4°C à l'aide du rotor HB6. Le culot contenant les noyaux est prélevé pour quantification des protéines et western-blot.

II.2.1.5. Western-blot

Le western-blot permettant la détection de macroH2A a été réalisé à partir de 7 µg de noyaux; alors que le western-blot permettant la détection de IAP-GAG a été réalisé à partir des protéines totales (15 µg) extraites à partir de différents tissus en utilisant le réactif "*T-PER Tissue Protein Extraction Reagent*" (*Pierce*).

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (10 % pour GAG-IAP ou 16 % pour les histones) et transférées en liquide sur membrane de nitrocellulose dans: 1X tampon Laemmli, 20% éthanol, 0,1% SDS. La membrane est bloquée 1 heure avec 4 % lait déshydraté, 0,06 % Tween 20, PBS 1X. Les anticorps primaires ont été dilués dans 0,2 % Tween 20, 10 % sérum de veaux fœtal PBS 1X; et les secondaires dans 1% lait déshydraté, 0,02 % tween 20 PBS 1X. La membrane a été lavée trois fois 5 minutes dans 0,5 % Triton X-100, 0,4 M NaCl, PBS 1X, puis 10 min dans 0,4 M NaCl, PBS 1X, et enfin rincée au PBS 1X, avant révélation avec le système ECL (*Amersham Biosciences*).

L'anticorps anti-IAP-GAG a été aimablement fourni par Dr Pascal Leblanc, il a été utilisé à une dilution de 1/5000. L'anticorps anti-macroH2A1 a été conçu au laboratoire, il a été utilisé au 1/5000. L'anticorps anti-H2B provient de la société upstate (rabbit plolyclonal IgG # 07-371), il a été utilsé au 1/5000. L'anticorps anti-macroH2A2 provient de la compagnie *Abcam* (*Rabbit polyclonal to Macro H2A.2 # ab 4173*), il a été dilué au 1/1000.

II.2.1.6. Analyses de la méthylation de l'ADN

a. Méthylation globale du génome (Southern-blot)

100 ng d'ADN génomique ont été digérés avec une quantité appropriée d'enzymes de restriction en accord avec les recommandations du fabricant, puis séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7%, et enfin transférés sur membrane de nylon (*Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech*) par la méthode classique de Southern-blot de transfert par capillarité (Sambrook, 1989). L'ADN a été liées de façon covalente à la membrane (*crosslink*) aux UV (70000 mico-joules/cm^2).

La matrice de 282 pb utilisée pour le radio-marquage de la sonde "satellites mineurs" a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces: 5'-CATGGAAAATGATAAAAACC-3' et 5'-CATCTAATATGTTCTACAGTGTGG-3'. La matrice de 776 pb utilisée pour marquer la sonde "satellites majeurs" a été amplifiée par PCR grâce aux amorces : 5'-GACGACTTGAAAAATGACGAAATC-3' et 5'-CATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC-3'. Les séquences satellites de la souris sont décrites dans (Lehnertz *et coll.*, 2003).

Toutes les sondes utilisées ont été radio-marquées avec du [α-^{32}P]dCTP incorporé par *"random priming*" en utilisant le kit "*prime a gene*" (*Promega*); après que la matrice n'ait été digérée via les sites de restriction EcoRI situés de part et d'autre de l'insert du *pGEMTeasy* et purifiée.

Les membranes ont été pré-hybridées 1-2 heures à 65°C dans un tampon contenant: 6X SSC, 5X Denhardt's et 1 % SDS. L'hybridation a été effectuée pendant la nuit à 65°C dans un tampon frais contenant en plus 10mg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué et la totalité de la sonde dénaturée. Les blots sont lavés deux fois avec 0,1 x SSC, 1% SDS à 65°C et exposés sur un écran phosphore.

b. Méthylation du promoteur Xist

L'état de méthylation du promoteur Xist a été mesuré par Southern-blot quantitatif par le biais des sites de restriction SacII et MluI, situés dans la région I du promoteur de Xist. 10 µg d'ADN génomique ont été digérés par EcoRI puis par l'une des deux enzymes de restriction sensible à la méthylation SacII ou MluI. Le témoin (C) a seulement été digéré par EcoRI.

L'ADN ainsi digéré a été séparé par électrophorèse puis transféré sur membrane de nylon comme décrit précédemment.
La matrice de 810 pb utilisée pour le radio-marquage de la sonde située en amont du promoteur entre les sites EcoRI et MluI a été amplifiée par PCR en utilsant les amorces : 5'-TGGCTTGCATAATCTGTGACC-3' et 5'-GGAACCTGGTGACTCCATACC-3'; puis clonée dans un vecteur pGEMTeasy (*Promega*).

c. Méthylation d'une région soumise à l'empreinte

La méthylation de la région a de H19 DMR a été analysée par la méthode de séquençage après traitement au bisulfite. 2µg d'ADN génomique ont été digérés par BamH1, puis traité au bisulfite en utilisant le kit "*EZ DNA Methylation Kit*" (*Zymo research*). L'amplification par PCR a été effectuée en utilisant les amorces décrites dans (Warnecke *et coll.*, 1998). Les amplicons ont ensuite été clonés dans le vecteur pGEMTeasy puis séquencés.

II.2.1.7. Northern-blot

Les ARN totaux ont été isolés de différents tissus avec du *Trizol* (*Invitrogen*) selon le protocole fourni par *Invitrogen*. 10µg d'ARN totaux ont été séparés par électrophorèse sur gel contenant 2,2M formaldéhyde, 1% agarose,1X de tampon MOPS, et enfin transférés sur membrane de nylon (*Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech*) par la méthode classique de northern-blot (Sambrook, 1989).
La sonde LINE1 a été clonée en utilisant les amorces décrites dans (Tsumura *et coll.*, 2006). La sonde IAP nous a été donnée par Dr Claire Chazaud, elle est décrite dans (Svoboda *et coll.*, 2004). La sonde GAPDH de 908 pb a été amplifiée à partir d'une banque de cDNA en utilisant les amorces: 5'-GCACAGTCAAGGCCGAGAATGG-3' et 5'-TGGGGGCCGAGTTGGGATAGG-3'.
Les conditions d'hybridation et de lavage sont identiques à celles utilisées pour les Southern-blots.

II.2.1.8. Anatomopathologie

Huit animaux issus de même portée de 10 – 12 semaines ont été étudiés : 3 femelles KO, 1 femelle WT; 3 mâles KO, 1 mâle WT. Les organes suivant ont été prélevés et pesés : cœur, foie, rate, reins. Les organes prélevés ont été fixés 24 heures dans 10 % formaline, puis

inclus dans des blocs de paraffine. À partir des blocks, des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été effectuées, puis colorées avec hématoxyline, éosine et saffron (HES). L'analyse a été réalisée à la clinique de la souris (Illkirch). Les lames ont été réinterprétées par Dr Catherine Thirion.

II.2.1.9. Expérience d'irradiation

Les animaux de 7 à 8 semaines immobilisés ont subi une irradiation γ totale (tout le corps) correspondant à 6,5 Gy. L'irradiation a été réalisée avec une source ^{137}Cs à un débit de dose de 0,68 $Gy.min^{-1}$. 7 animaux *Wild type* et 5 animaux macroH2A$^{-/-}$ issus de même portée ont été irradiés. Un animal *Wild type* et un animal macroH2A$^{-/-}$ ont été sacrifiés 4 jours après irradiation afin de réaliser des coupes histologiques d'intestin. Les animaux irradiés ont été observés quotidiennement.

Le protocole d'irradiation à été validé par le comité régional pour l'expérimentation animale Rhône-Alpes.

II.2.2. Résultats

II.2.2.1. *Knock out* de macroH2A1

Nous avons généré une lignée de souris déficientes pour macroH2A1.1 et macroH2A1.2 en substituant l'exon 2 contenant le codon initiateur de la traduction et codant pour la moitié de *l'histone fold* , par recombinaison homologue (figure 20). Pour ce faire nous avons utilisé la technique de recombinaison homologue dans des cellules ES. Les clones recombinants ont été injectés dans des blastocystes qui ont été réintroduits dans une mère porteuse. Les progénitures mosaïques ainsi obtenues ont été croisées avec des femmelles WT. Les décendants de ces croisements ont été croisés entre eux ce qui nous a permis d'obtenir des animaux hétérozygotes. Tous les animaux utilisés dans cette étude proviennent de l'accouplement d'un mâle hétérozygote avec une femelle hétérozygote, permettant d'obtenir des souris *wild type*, dans la même portée, utilisées comme contrôle dans les expériences.

L'expérience de western-blot réalisée à partir de noyaux extraits de différents tissus de souris, montre que macroH2A1.2 est absent dans les noyaux des souris macroH2A1$^{-/-}$ (figure 21.a.).

De façon surprenante, les souris *knock out* sont viables, sans aucun défaut apparent de morphologie ou de taille, et se développent normalement.

Aussi bien les mâles macroH2A1$^{-/-}$ que les femelles macroH2A1$^{-/-}$ sont fertiles accouplés avec un animal *Wild type* ; les souris *knock out* sont également fertiles lorsqu'elles sont accouplées entre elles.

La fertilité des mâles est un résultat inattendu compte tenu que macroH2A1.2 semble jouer un rôle particulier dans l'organisation de la chromatine pendant la méiose. En effet, il a été rapporté que macroH2A1.2 se localise spécifiquement sur l'hétérochromatine centromérique pendant les phases pachytène et diplotène de la méiose, suggérant une fonction dans la recombinaison homologue (Turner *et coll.*, 2001). De plus, MacroH2A maintient sa localisation centromérique dans les spermatides rondes, et peut être détecté par western-blot jusque dans les spermatozoïdes matures, indiquant un rôle potentiel dans la fertilisation (Hoyer-Fender *et coll.*, 2000).

La fertilité des mâles mutants suggère que macroH2A1 ne joue pas un rôle prépondérant dans la méiose ou la spermatogenèse, bien que ces questions n'aient pas été directement adressées.

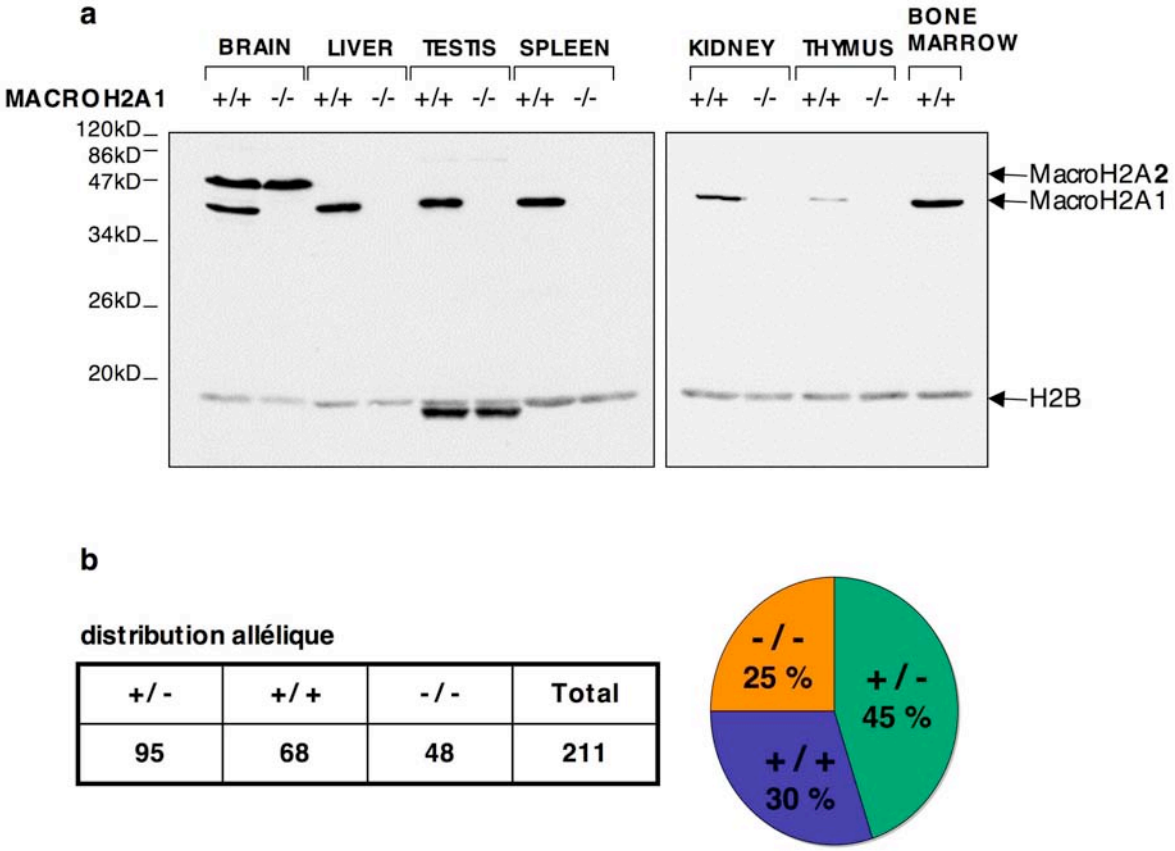


Figure 21 : Absence de la protéine macroH2A dans les KO, transmission mendélienne

a. Western-blot réalisé avec des noyaux isolés à partir de différents tissus. L'anticorps dirigé contre macroH2A1.2 produit au laboratoire permet de vérifier que la protéine macroH2A1 est totalement absente dans tous les tissus testés des animaux macroH2A1$^{-/-}$. L'anticorps anti-macroH2A2 provient de la compagnie *abcam*, il permet la détection d'une bande unique à 45 kDa correspondant à macroH2A2 comme décrit précédemment. MacroH2A2 a été détecté exclusivement dans le cerveau et nous n'observons pas de surexpression pouvant aboutir à une compensation dans les souris KO. La détection de l'histone H2B permet de contrôler que les quantités de protéines déposées sont bien égalisées.
b. Distribution allélique de la mutation entre générations.
Les accouplements réalisés entre femelles hétérozygotes et mâle hétérozygotes ont donné naissance à 211 animaux, se répartissant ainsi 45 % macroH2A1$^{+/-}$, 25% macroH2A1$^{-/-}$, 30 % macroH2A1$^{+/+}$. Ces ratios correspondent aux lois de Mendel, ce qui permet d'exclure toute mortalité prénatale de certains mutants.

Les croisements réalisés entre hétérozygotes permettent de conclure que la mutation ségrège selon un ratio mendélien (figure 21.b.).

La viabilité et l'absence de défaut des souris macroH2A1$^{-/-}$ sont surprenantes compte tenu de la fonction de répresseur transcriptionnel attribuée à macroH2A.

Nous avons testé une éventuelle compensation de l'autre isoforme : macroH2A2. Pour cela, un western-blot a été réalisé grâce un anticorps anti–macroH2A2. L'anticorps utilisé détecte une protéine d'environ 45 KDa (figure 21.a.) dont la taille correspond à celle qui a été décrite pour macroH2A2 (Chadwick and Willard, 2001b). Cependant nous n'avons pas testé la spécificité de l'anticorps (soit en détectant la protéine purifiée, soit en réalisant un siRNA contre macroH2A2) et une mauvaise spécificité de l'anticorps commercial utilisé ne peut être exclue.

D'après cette expérience macroH2A2 n'est pas sur-exprimé (ou exprimé ectopiquement) dans les souris *knock out* ; indiquant qu'une complémentation de fonction par macroH2A2 est peu probable.

II.2.2.2. Influence sur la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN comme la présence de variant d'histone constituent deux types d'informations épigénétiques régulant la transcription ainsi que d'autres processus biologiques. Ces deux couches d'information épigénétique sont susceptibles d'interagir entre elles.

En effet, il a été montré que l'incorporation de macroH2A est dépendante de la méthylation de l'ADN: dans les cellules où la méthylation de l'ADN est abolie, macroH2A est mal localisé (Damelin and Bestor, 2007; Ma *et coll.*, 2005). Toutefois la relation liant le positionnement de macroH2A à la méthylation des séquences qui lui sont associées n'a pas été formellement établie et aucune étude à grande échelle n'a pu montrer une association spécifique de macroH2A aux régions du génome où les dinucléotides CpG sont méthylés.

La méthylation *de novo* de l'ADN se produisant dans un contexte chromatinien, il est envisageable que la présence de macroH2A puisse influencer le pattern de méthylation de l'ADN.

Sans que le mécanisme n'en soit compris, l'invalidation de trois isoformes de l'histone de liaison H1 équivalent a une réduction de moitié de la quantité de H1 dans les cellules ES conduit à une hypo–méthylation des séquences soumises à l'empreinte génomique parentale (Fan *et coll.*, 2005).

De récentes études montrent que la composition en histones du nucléosome est un signal ciblant la méthylation *de novo* de l'ADN sur certaines séquences.
Ainsi, Dnmt3L enzymatiquement inactive, impliquée dans l'établissement de la méthylation dans les cellules germinales, reconnaît spécifiquement la lysine 4 non méthylés de l'histone H3 et active Dnmt3a2 responsable de la méthylation (chapitre I.3.4) (Ooi *et coll.*, 2007).
MacroH2A1 étant localisé sur certaines séquences connues pour être méthylées (Choo *et coll.*, 2006), nous posons la question : est ce que macroH2A pourrait également être un signal dirigeant la méthylation des CpG de l'ADN ?
Cette hypothèse est également supportée par le fait que l'autre protéine fortement exprimée conjointement avec macroH2A1 dans les cellules souches hématopoïétiques fœtales se trouve être la *5'cytosine DNA methyltransferase* Dnmt3b impliquée dans la méthylation *de novo* (chapitre I.3.1.) (Phillips *et coll.*, 2000).

Afin d'investiguer les interactions potentielles entre méthylation de l'ADN et macroH2A, nous proposons d'étudier l'état de méthylation du génome dans les souris macroH2A1$^{-/-}$. Nous avons choisi de nous intéresser à la méthylation de l'ADN isolé de splénocytes, pour plusieurs raisons: L'abondance significativement plus importante de macroH2A1 dans ces cellules par rapport aux autres tissus (figure 22.a.), laisse penser que la fonction de macroH2A est exacerbée dans les cellules de la rate, justifiant notre choix. L'état particulier de la chromatine de certains précurseurs hématopoïétiques vis-à-vis du phénomène d'inactivation du X suggère que l'absence de macroH2A pourrait avoir des conséquences importantes sur le développement et le renouvellement de certaines populations de cellules immunitaires (Phillips *et coll.*, 2000; Savarese *et coll.*, 2006).

Nous nous sommes d'abord intéressés à la méthylation des satellites mineurs et majeurs qui reflète l'état de méthylation global du génome. Pour ce faire, l'ADN génomique total a d'abord été digéré par MspI et son isoschizomère HpaII, qui reconnaissent le site CCGG.
La visualisation de l'ADN total coloré au BET (figure 22.a.) permet de conclure qu'il n'y a pas de différence de méthylation globale entre KO et WT.
La digestion par une autre enzyme sensible à la méthylation, MaeII, qui reconnaît la séquence ACGT, ne montre pas de différence non plus après coloration au BET (figure 22.a.).
Le Southern-blot réalisé avec le produit de la digestion par MspI ou HpaII et hybridé avec une sonde spécifique des satellites mineurs permet de contrôler l'état de méthylation de ces séquences répétées (Lehnertz *et coll.*, 2003). Les satellites mineurs présents entre 50000 et

100000 copies localisées dans les régions centromériques (Joseph *et coll.*, 1989; Wong and Rattner, 1988), ne présentent pas de différence de méthylation entre les souris WT et KO (figure 22.a.). L'exposition plus longue de la membrane confirme l'absence de différence (figure 22.a.).

De la même façon, les satellites majeurs, présents à environ 700000 copies dans le génome, localisés dans les régions péricentromériques (Guenatri *et coll.*, 2004), ont été détectés grâce à une sonde spécifique (Lehnertz *et coll.*, 2003), après digestion par MaeII et transfert sur membrane (figure 22.a.). La méthylation des satellites majeures ne présente pas de différences importantes entre les souris macroH2A1$^{-/-}$ et les souris contrôles (figure 22.a.). Cependant, nous constatons une différence dans le profil de digestion suggérant que le pattern de méthylation pourrait être légèrement altéré sur les satellites majeurs (figure 22.a.). Le profil de digestion obtenu est difficilement interprétable en termes de changements globaux: les grands fragments sont plus digérés donc hypo-méthylés alors que les petits fragments sont moins digérés ce qui corrèle avec une hyper-méthylation. Ce résultat qui semble indiquer que ce serait plutôt le pattern de méthylation qui serait légèrement altéré sans que le niveau de méthylation globale ne soit significativement modifié, demande à être confirmé.

Nous avons ensuite étudié spécifiquement l'état de méthylation de certains *loci* avec lesquels macroH2A a été trouvé associé. Le promoteur de Xist et la région différentiellement méthylée (DMR) du gène soumis à l'empreinte génomique parentale H19, sont régulés par la méthylation des di–nucléotides CpG et sont enrichis en nucléosomes macroH2A1 (Choo *et coll.*, 2006).

La DMR de H19 acquière sa méthylation dans la lignée germinale mâle, et se retrouve méthylée sur l'allèle paternel, et ne l'est pas sur l'allèle maternel (Ueda *et coll.*, 2000).

L'analyse par bisulfite de la méthylation de la région a de la DMR de H19 montre qu'environ la moitié des allèles sont méthylés dans les souris WT comme dans KO. Ce qui permet de conclure que la méthylation de cette DMR H19 n'est pas affectée par l'absence de macroH2A1 (figure 22.c.).

La présence de macroH2A1 sur les séquences soumises à l'empreinte génomique parentale n'est donc pas un signal dirigeant la méthylation spécifiquement sur un allèle.

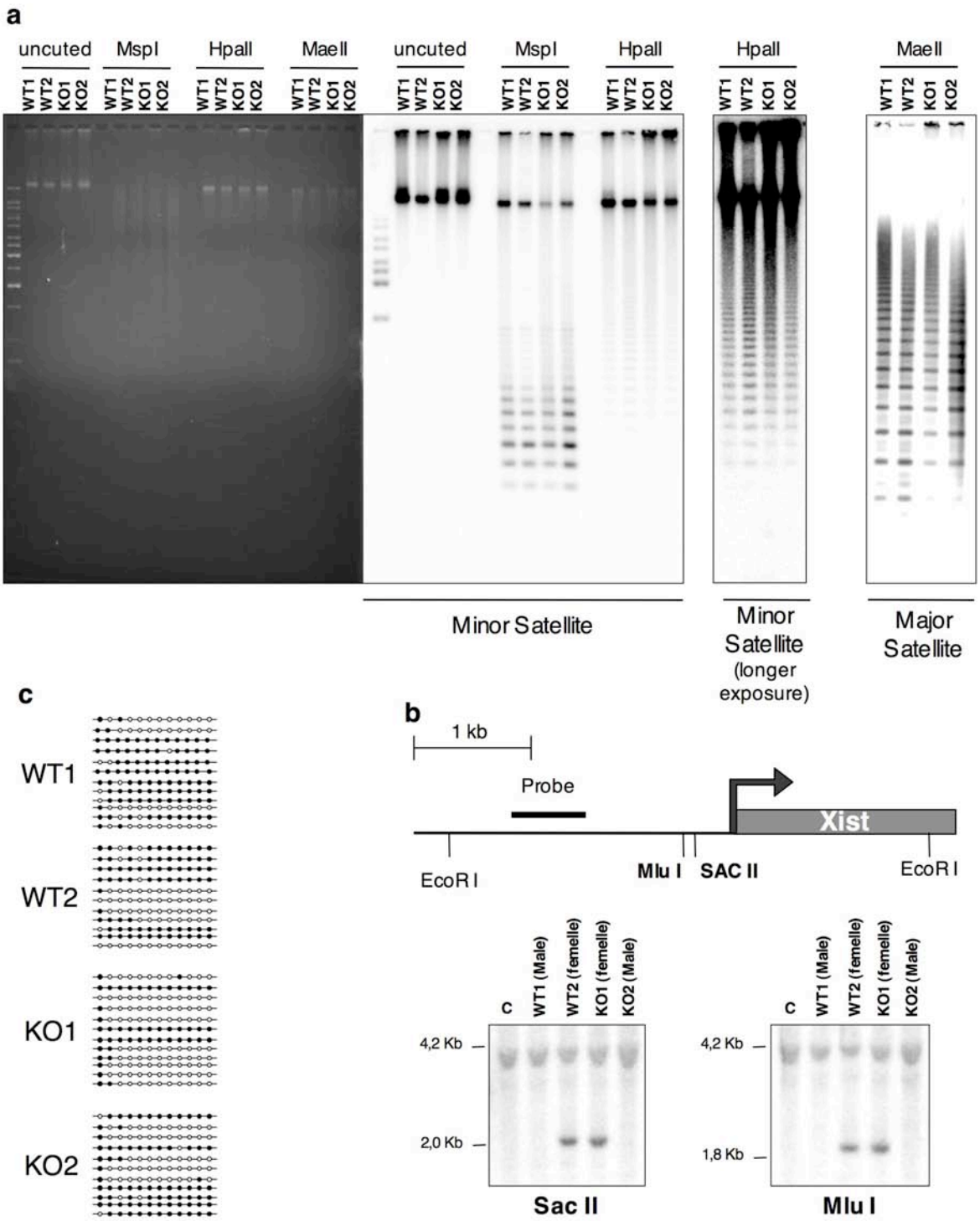


Figure 22 : Analyse de la méthylation de l'ADN génomique

L'ADN génomique analysé dans ces expériences a été extrait de rate de souris KO ou Wild type, WT1 et KO2 proviennent de mâles alors que WT2 et KO1 proviennent de femelles.

a. Méthylation globale de l'ADN génomique des souris macroH2A1$^{-/-}$

L'ADN génomique à été digéré avec MspI ou HpaII ou MaeI puis séparé par élèctrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN est visualisé par coloration au bromure d'éthidium. Le Southern-blot est analysé au moyen de sondes spécifiques des satellites mineurs ou majeurs. La répétition est visualisée par l'échelle de bandes produite à la suite de la digestion par l'enzyme non-sensible à la méthylation:

MspI. Les isochizomèrs sensibles à la méthylation Hpa II ainsi que maeII (également inhibé par la méthylation) ne digèrent que les sites non méthylés.
b. Étude par Southern-blot quantitatif de l'état de méthylation de la région I du promoteur de Xist. L'ADN génomique a été d'abord digéré par EcoRI puis par une enzyme sensible à la méthylation: soit SacII (panel de gauche), soit MluI (panel de droite). Le contrôle (C) est seulement digéré par EcoRI.
c. Analyse au bisulfite de la région A de la DMR (région différentiellement méthylée) de H19. Chaque ligne horizontale représente une séquence indépendante avec la méthylation des CpG représentée par des cercles pleins.

Nous nous sommes intéressés à la méthylation de région promotrice du locus *Xist* (figure 22.b). Dans les cellules somatiques, la région située en 5' de l'allèle *Xist* silencieux sur le chromosome X actif est complètement méthylée, alors que l'allèle transcrit localisé sur le Xi ne l'est pas (Norris *et coll.*, 1994). La méthylation du promoteur de Xist sur le Xa est nécessaire pour éteindre son expression (Panning and Jaenisch, 1996).
Pour ce faire, un Southern-blot quantitatif a été réalisé grâce à l'utilisation de deux enzymes de restriction sensibles à la méthylation (MluI et SacII) dont les sites sont localisés sur le promoteur *Xist* (figure 22.b). Lorsque l'ADN étudié provient d'un mâle, une seule bande à 4,2 kb apparaît correspondant au fragment situé entre les deux sites EcroRI. Le promoteur de *Xist* étant méthylé chez le mâle, les enzymes MluI et SacII ne peuvent pas digérer. Chez la femelle, le promoteur de Xist n'est pas méthylé sur l'allèle inactif (permettant l'expression de Xist); on observe donc l'apparition d'une bande à 2kb ou 1,8 kb correspondant à la digestion respective des enzymes SacII ou MluI (figure 22.b).
Nous ne mesurons pas de différences de méthylation entre les souris contrôles et les souris déficientes macroH2A1$^{-/-}$. Ce qui permet de conclure que macroH2A1 n'est pas impliqué dans l'établissement de la méthylation du promoteur de *Xist* (figure 22.b).

II.2.2.3. Transcription des rétrotransposons

Les éléments transposables sont des éléments génétiques mobiles à l'intérieur d'un génome, ils peuvent être définis comme "des parasites nucléaires transmis sexuellement" (Hickey, 1982).
L'activité des éléments transposables, qui occupent respectivement 45 % et 37 % des génomes humains et murins, représente une cause d'insertions mutagènes et de réarrangements chromosomiques pathologiques (Deininger *et coll.*, 2003; Gaudet *et coll.*, 2003; Gilbert *et coll.*, 2002; Symer *et coll.*, 2002). Les rétrotransposons représentent la majorité des éléments

transposables. Ce sont des éléments mobiles capables de se dupliquer et de s'insérer dans de nouveaux *loci* dans le génome de la cellule d'origine par un mécanisme de transcription, suivie d'une rétrotranscription et d'une intégration (Kazazian, 2004).
La répression transcriptionnelle de ces séquences, essentielle au maintien de la stabilité génomique, est médiée par la méthylation de l'ADN.
Il existe en effet une corrélation directe entre déméthylation de l'ADN et activation de l'expression des rétrotransposons (Bourc'his and Bestor, 2004; Walsh *et coll.*, 1998). L'invalidation des facteurs responsables, soit du maintien soit de l'établissement de la méthylation de l'ADN, respectivement Dnmt1 et Dnmt3L, aboutit à une déméthylation des rétrotransposons ainsi qu'à une consécutive augmentation de leur transcription (Bourc'his and Bestor, 2004; Walsh *et coll.*, 1998). Le mécanisme moléculaire par lequel la méthylation des rétrotransposons aboutit à leur répression n'est pas connu.

Il existe deux catégories de rétrotransposons (Kazazian, 2004):

- Les "LTR rétrotransposons" qui contiennent un LTR (*long terminal repeat*) aux deux extrémités.
- Les "non-LTR rétrotransposons" qui possèdent un signal de polyadénylation à leur extrémité 3'.

Les LTR rétrotransposons ont une structure similaire aux rétrovirus: ils contiennent les gènes *gag* et *pol* codant la protéine de structure GAG, le reverse transcriptase (RT), la ribonucléase H et l'intégrase. Contrairement aux rétrovirus, les LTR rétrotransposons ne possèdent pas le gène *env* et ne peuvent donc pas sortir de la cellule hôte (Kazazian, 2004).

Les LINE1 (*long interspersed elements*) (ou L1) sont les principaux représentants des non-LTR rétrotransposons (Brouha *et coll.*, 2003). Le séquençage du génome humain a permis de révéler que la distribution des séquences LINE1 entre chromosomes n'est pas homogène. En effet, un enrichissement important à été constaté sur le chromosome X qui est composé à 29 % de LINE1, contre 17 % seulement en moyenne sur les autosomes (Boyle *et coll.*, 1990; Ross *et coll.*, 2005). De cette observation est née l'hypothèse d'une participation des LINEs dans le processus d'inactivation du chromosome X (Bailey *et coll.*, 2000; Lyon, 1998). Bien que cette hypothèse n'ait pas été démontrée, la distribution des LINE1 à travers le génome corrèle très bien avec la localisation de macroH2A. De plus, une étude visant à

caractériser la distribution de macroH2A sur le génome a permis de mettre en évidence la présence de macroH2A1 sur les séquences LINE1 (Changolkar and Pehrson, 2006).

Les IAP (*Intracisternal A particles*) appartiennent à la famille des LTR rétrotransposons (Kazazian, 2004). Ce sont parmi les séquences parasites les plus agressives chez la souris, leur transcription est totalement réprimée dans les cellules somatiques (Kuff and Lueders, 1988). De récentes expériences de ChIP prouvent que macroH2A1 est enrichie sur les LTRs des IAP (Damelin and Bestor, 2007). Cette accumulation de macroH2A1 sur les séquences IAP est dépendante de la méthylation de l'ADN (Damelin and Bestor, 2007), suggérant un rôle dans la répression des séquences endo-parasitiques.

Nous émettons l'hypothèse que macroH2A1 pourrait être responsable la répression des rétrotransposons. Cette hypothèse est supportée par la capacité de macroH2A à réprimer la transcription démontrée *in vitro* (Angelov *et coll.*, 2003; Doyen *et coll.*, 2006a), ainsi que par sa présence sur les IAP et les LINE (Changolkar and Pehrson, 2006; Damelin and Bestor, 2007). De plus, la méthylation de l'ADN, nécessaire à la répression des IAP, est également nécessaire au recrutement de macroH2A sur ces séquences (Damelin and Bestor, 2007).

Nous proposons de tester le rôle de macroH2A dans la répression des LTR rétrotransposons (IAP) et des non LTR rétrotransposons (LINE1).

La transcription des IAP et les LINE dans les souris macroH2A$^{-/-}$ a été testée par northern-blot, réalisé à partir d'ARN totaux isolés de différents tissus (foie, rate, thymus) (figure 21.a.). Chez les souris sauvages, les IAP sont transcriptionnellement silencieux dans tous les tissus testés, à l'exception du thymus (figure 21.a.). Remarquons que le thymus est également le seul tissu dans lequel macroH2A1 est très faiblement exprimé (figure 21.a.), suggérant que macroH2A1 pourrait jouer un rôle dans la répression des IAP.

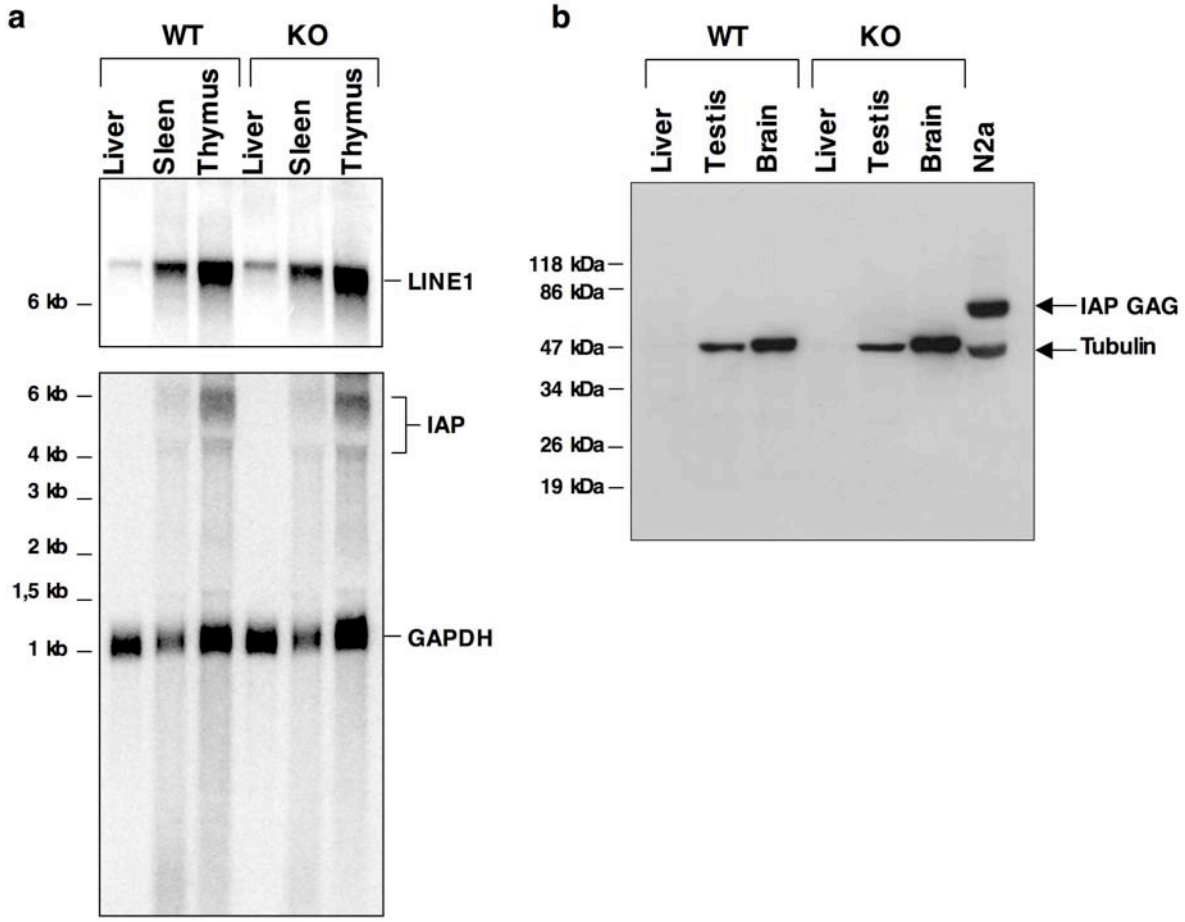


Figure 23 : Transcription des rétrotransposons

a. Détection des LINE et des IAP par northern-blot
b. Détection de la protéine GAG des IAP par western-blot .
Des extraits totaux de protéines isolés de différents tissus (foie, testicule ou cerveau) de souris WT ou KO macroH2A$^{-/-}$, ont été analysés. Des cellules murines N2a, dont les IAP sont actives ont été utilisés comme témoins positifs. La révélation de la tubuline permet de comparer la quantité de protéines déposées sur le gel entre WT et KO pour un tissu donné.

Cependant, nous n'observons pas d'augmentation de la transcription des IAP dans les souris KO (figure 23.a.), ce qui indique que la présence de macroH2A1 n'est pas requise pour réprimer leur transcription. Une expérience de western-blot démontre que la protéine GAG des IAP n'est pas détectable ni dans les souris WT ni dans les souris KO confirme que l'activité des IAP n'est pas modifiée en l'absence de macroH2A1 (figure 23.b.).

Contrairement à notre hypothèse, la présence de macroH2A n'est pas nécessaire pour le maintien de l'état silencieux des IAP.

Le niveau de transcription des LINE à également été abordé par northern-blot (figure 23.a.). La répression de la transcription des LINE n'est pas levée dans les souris déficientes en macroH2A1, ce qui prouve que macroH2A1 n'est pas indispensable à la répression des LINE (figure 23.a.).

En dépit des observations corrélant la présence de macroH2A1 à la répression des rétrotransposons (Damelin and Bestor, 2007), ces résultats permettent de conclure que la présence de macroH2A1 sur les IAP et les LINE n'est pas nécessaire au maintien de leur état silencieux.

II.2.2.4. Sensibilité des souris macroH2A1$^{-/-}$ aux radiations ionisantes

L'interaction avec PARP1 récemment décrite par trois groupes indépendants, ainsi que la capacité de macroH2A à lier l'ADP-ribose, nous a conduit à nous demander dans quelle mesure macroH2A1 est impliqué dans une des voies de signalisation liées l'ADP-ribosylation. PARP1 jouant un rôle prépondérant dans la réparation des dommages à l'ADN, nous nous sommes interrogés si macroH2A est pouvait être impliqué dans ce processus.

Afin de tester cette hypothèse nous avons soumis les souris *knock out* macroH2A1$^{-/-}$ à un stress génotoxique. Sept souris *wild type* et cinq souris mutantes ont subi une irradiation globale unique aux rayons ionisants γ correspondant à une dose de 6,5 Gy. Cette dose est sub-létale pour les souris *wild type*, mais provoque la mort des souris ayant un défaut de réparation de l'ADN tel que les mutants déficients pour ATM, H2A.X ou PARP1 (Barlow *et coll.*, 1996; Celeste *et coll.*, 2002; Masutani *et coll.*, 2000).

Les souris déficientes pour macroH2A1 ne présentent pas d'hyper-sensibilité aux radiations ionisantes et survivent à l'irradiation comme les témoins (figure 24).
Une souris témoin et une souris KO sont mortes respectivement à 9 et 17 jours post-irradiation. Cette mortalité s'explique par la différence de sensibilité individuelle aux radiations (figure 24).
Des coupes d'intestins ont été réalisées 4 jours après irradiation afin de contrôler la dégénérescence des cellules épithéliales (données non montrées). À l'instard des WT, les souris macroH2A1$^{-/-}$ ne présentent pas de dégénérescence de l'épithélium intestinal.

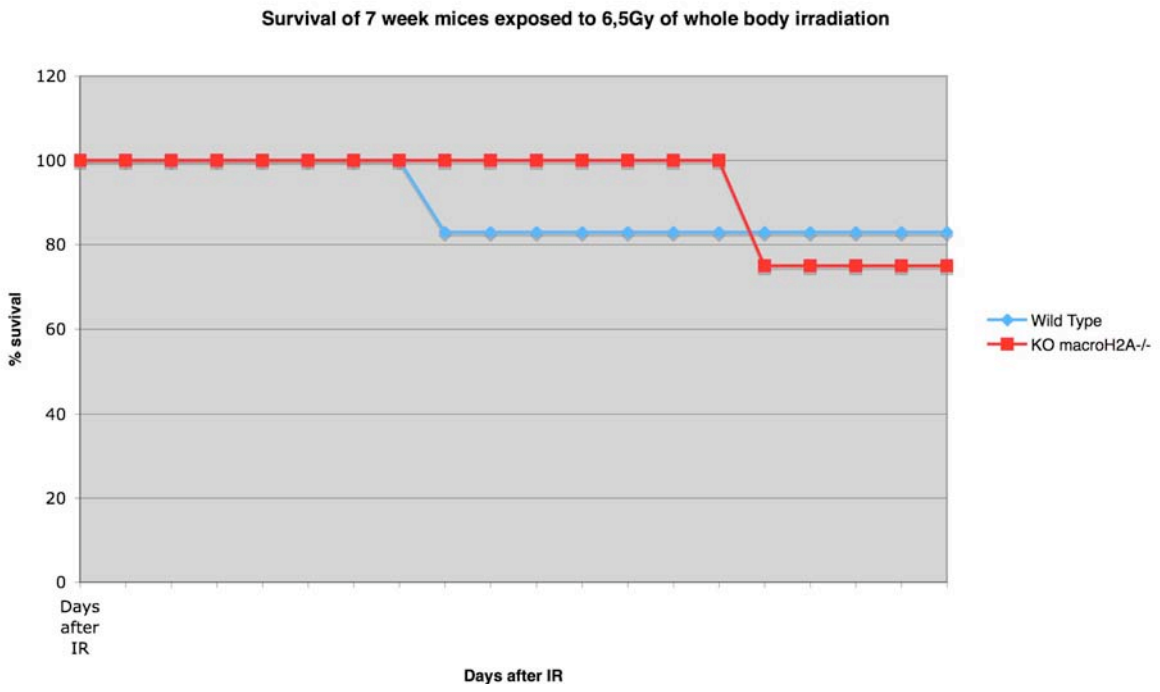


Figure 24 : Survie des souris exposées à une irradiation γ totale de 6,5 Gy

L'expérience permet de conclure que les souris macroH2A1$^{-/-}$ ne présentent pas de sensibilité accrue aux radiations ionisantes, ce qui indique que macroH2A1 n'est pas nécessaire à la réparation de ces dommages.

L'interaction de macroH2A1 avec PARP1 ne semble donc pas intervenir dans la voie de la réparation des cassures doubles brin. PARP1 est impliqué dans de nombreux processus cellulaires; la question du rôle biologique de l'inhibition de PARP1 par macroH2A1 reste entière.

II.2.2.5. Étude anatomopathologique

Quatre mâles (dont 3 KO est 1 WT) ainsi que quatre femelles (dont 3 KO est 1 WT) ont subi un examen anatomopathologique. Aucune différence morphologique ou histologique n'a été constatée, à l'exception d'une vacuolisation observée dans le foie de certains animaux macroH2A1$^{-/-}$ (figure 25, tables 3).

Deux types de vacuolisation ont été observés (figure 25, table 3):

- une microvacuolisation caractérisée par la présence de vacuoles (considérées comme étant remplies de glycogène) d'un diamètre de 5-10 µM
- une macrovacuolisation se traduisant par la présence de vacuole de 15-20 µm de diamètre reflétant des gouttelettes lipidiques

Tandis que la microvacuolisation diffuse constatée chez les mâles (WT et KO) et la femelle WT, n'est pas considérée comme pathologique, la macrovacuolisation périportale observée chez les femelles KO traduit une accumulation de triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes, caractéristique de la stéatose hépatique dont la cause peut être un trouble du métabolisme lipidique.

Les mâles KO étudiés ne présentent pas de troubles hépatiques, alors que deux femelles macroH2A1$^{-/-}$ sur trois présentent les signes stéatose hépatique (table 3).

Ce résultat, qui demande à être confirmé sur un nombre d'animaux plus important, indique d'une part que macroH2A1 est impliqué dans le contrôle du métabolisme lipidique, et d'autre part que son mode d'action est dépendant du sexe.

L'apparition d'un trouble exclusivement chez les femelles suggère une fonction liée à l'inactivation du chromosome X. MacroH2A étant potentiellement impliqué dans la régulation de la transcription, on peut supposer que son action sur le métabolisme lipidique s'effectue vraisemblablement via le contrôle de l'expression de certains gènes participant au métabolisme des lipides. L'identification de ces gènes reste à effectuer, ainsi que le contrôle de la présence de macroH2A1 sur leur promoteur.

L'exploration de la fonction hépatique des souris macroH2A1$^{-/-}$ par le biais du dosage biochimique de divers paramètres sanguins est actuellement en cours d'étude. L'identification d'une éventuelle déficience en certaines enzymes du métabolisme nous permettra d'en déduire les probables cibles de macroH2A1.

Notons qu'une femelle KO ne présente pas de signes stéatose hépatique, ce qui signifie que la pénétrance du phénotype n'est pas totale. Ceci peut s'expliquer par le fond génétique hétérogène utilisé pour cette étude.

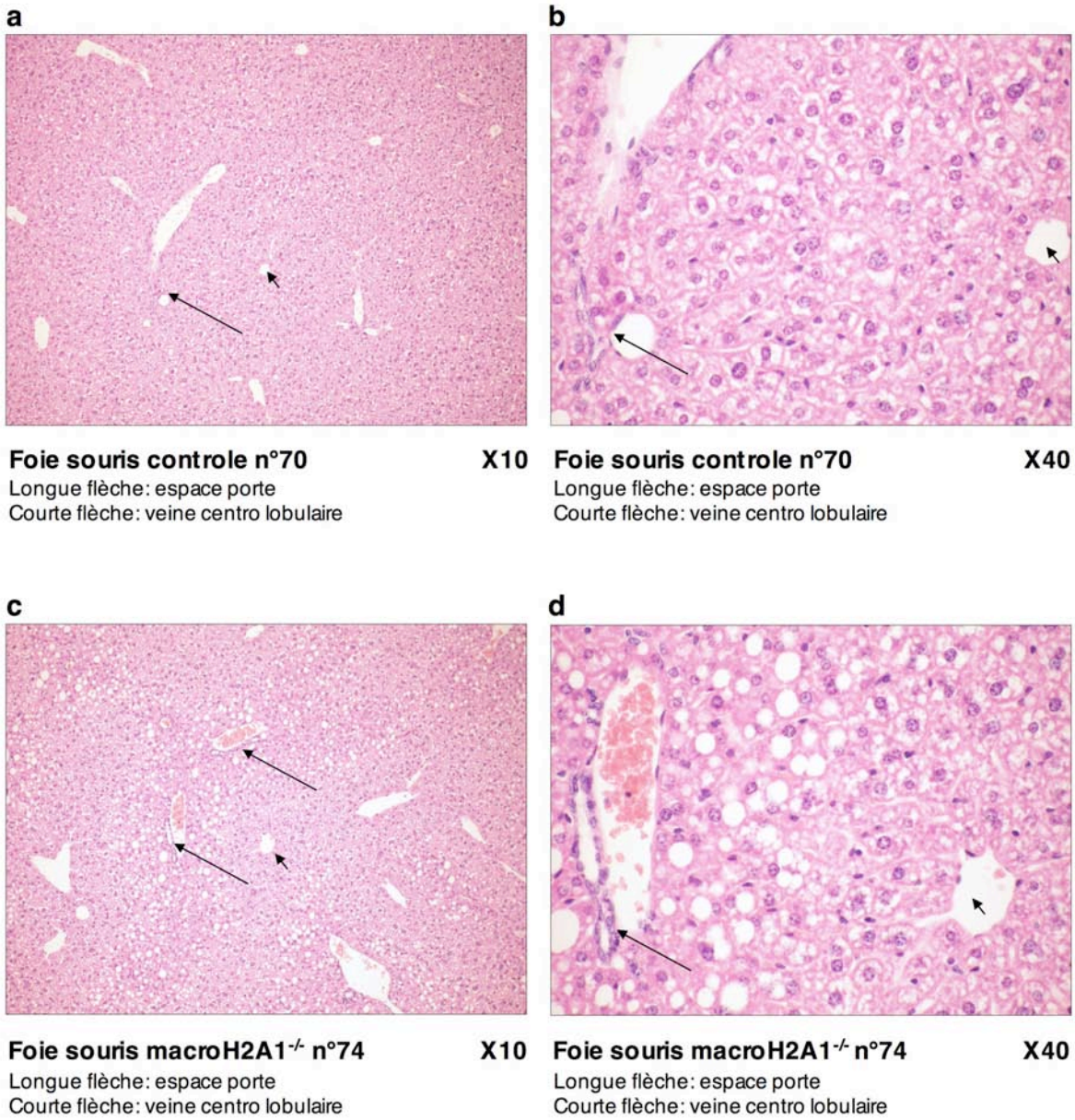


Figure 25 : Examen histopathologique du foie

Les coupes réalisées à partir de foie de souris femelle macroH2A1$^{-/-}$ (c et d) présentent une macrovacuolisation avec une topographie périportale et microvacuolisation diffuse. Alors que l'on observe chez les contrôles (a et b) qu'une microvacuolisation diffuse. La macrovacuolisation périportale des hépatocytes des femelles macroH2A1$^{-/-}$ (c et d) traduit une stéatose périportale dont la cause est un disfonctionnement du métabolisme lipidique.

	Identifiant / génotype	Observations histopathologiques	Niveau*
Mâles	59 / **WT**	Agrégats de cellules mononuclées/ Hématopoïèse extramédullaire	**1**
		Microvacuolisation diffuse mais prédominante dans les hépatocytes centrilobulaires et méso-zonales	**2**
		Macrovacuolisation des hépatocytes centrilobulaires	**1**
	85 / **KO**	Agrégats de cellules mononuclées/ Hématopoïèse extramédullaire	**1**
		Microvacuolisation diffuse mais prédominante dans les hépatocytes centrilobulaires et méso-zonales	**1**
	66 / **KO**	Agrégats de cellules mononuclées/ Hématopoïèse extramédullaire	**1**
		Microvacuolisation diffuse mais prédominante dans les hépatocytes centrilobulaires et méso-zonales	**2**
		Macrovacuolisation centriglobulaire principalement, et occasionnellement méso-zonales	**3**
	58 / **KO**	Agrégats de cellules mononuclées/ Hématopoïèse extramédullaire	**1**
		Foie mal fixé	**-**
Femelles	70 / **WT**	Agrégats de cellules mononuclées/ Hématopoïèse extramédullaire	**1**
		Hepatocellular cytoplasmic microvesicular vacuolation, diffuse	**3**
	74 / **KO**	Agrégats de cellules mononuclées/ Hématopoïèse extramédullaire	**1**
		Microvacuolisation diffuse	**3**
		Macrovacuolisation méso-zonales et périportale	**3**
		Tension lipidosis, focal	**1**
	73 / **KO**	Agrégats de cellules mononuclées/ Hématopoïèse extramédullaire	**1**
		Microvacuolisation diffuse	**3**
		Macrovacuolisation diffuse	**1**
	57 / **KO**	Agrégats de cellules mononuclées/ Hématopoïèse extramédullaire	**1**
		Microvacuolisation diffuse	**3**
		Macrovacuolisation méso-zonales et périportale	**3**

* niveau: 1 = minimal; 2 = f aible; 3 = modéré; 4 = important; 5 = sévère; - = non appréciable

Table 3 : Observations histopathologiques

III. Chapitre III : Discussions

III.1. Structure et fonction du nucléosome variant H2BFWT

Nous avons montré qu'en dépit de sa grande divergence avec l'histone somatique H2BFWT ne modifie ni la structure, ni les propriétés fonctionnelles du nucléosome (Boulard *et coll.*, 2006). Ces caractéristiques suggèrent que H2BFWT n'intervient pas dans le contrôle épigénétique de l'expression des gènes pendant la fertilisation ou le rétablissement de la totipotence. Les expériences de FRAP et de dilution de nucléosomes réalisées ont mis en évidence que la présence de H2BFWT ne modifie pas la stabilité du dimère indiquant que l'incorporation de H2BFWT au cours de la spermiogenèse ne participe pas à la transition histone-protamine (Boulard *et coll.*, 2006). Cette hypothèse est également supportée par le fait que H2BFWT reste associé à la chromatine jusqu'au dernier stade de maturation: le spermatozoïde (Churikov *et coll.*, 2004a).

Nos données permettent de conclure que contrairement à l'histone canonique, H2BFWT n'est pas requis pour l'assemblage du chromosome mitotique (Boulard *et coll.*, 2006). Cette propriété apporte la possibilité que ce variant de H2B soit impliqué dans un autre type d'assemblage d'ordre supérieur de la chromatine que la condensation du chromosome. De ce fait, le rôle de H2BFWT serait d'ordre structural. En outre, la divergence de séquence de l'hélice αC supporte l'idée que HBFWT soit impliqué dans des assemblages d'architectures différentes.

Etant donné que H2BFWT est présent dans les noyaux de sperme (Churikov *et coll.*, 2004a), il est probable que H2BFWT soit le variant l'histone H2B non identifié appartenant au complexe télomérique du sperme humain (Churikov *et coll.*, 2004a; Zalensky *et coll.*, 2002). L'identification de se variant spécifique du télomère des spermatozoïdes est crucial, et permettra vraisemblablement de comprendre la fonction biologique de H2BFWT. Nos résultats sont en accord avec l'hypothèse d'un rôle de H2BFWT dans la formation du complexe télomérique. La caractérisation de H2BFWT comme composant du télomère permettrait d'expliquer les propriétés particulières du télomère dans la lignée germinale mâle chez l'homme (Bekaert *et coll.*, 2004).

Chez les mammifères, la nature des composants du complexe télomérique diffère entre cellules somatiques et cellules germinales mâles (Bekaert *et coll.*, 2004; Gineitis *et coll.*, 2000). Dans les spermatozoïdes humains, les télomères s'associent en dimères et tétramères et se relocalisent au niveau de la membrane nucléaire (Meyer-Ficca *et coll.*, 1998; Zalensky *et coll.*, 1997). Les mécanismes aboutissant à cette localisation des télomères dans les cellules germinales mâles ne sont pas connus. Ce recrutement des télomères à la membrane pourrait être médié par la longue extension amino-terminale de H2BFWT. L'identification des ligands de la queue de H2BFWT est importante pour de mieux comprendre ce phénomène, elle permettrait également de mettre en évidence d'autres éléments du télomère particulier du sperme.

L'architecture spécifique du télomère des spermatozoïdes humains potentiellement assistée par la présence de H2BFWT est vraisemblablement cruciale pour les étapes de fertilisation et de développement précoce.
Par conséquent, la caractérisation de la structure du télomère du spermatozoïde via l'étude de la possible implication du variant H2BFWT est importante pour la compréhension des mécanismes de la fertilisation chez l'homme.

III.2. Étude in vivo du variant macroH2A1

Les souris macroH2A1$^{-/-}$ sont viables et ne présentent pas, ou très peu de défauts macroscopiques et histologiques. Cette observation est surprenante compte tenu du fait que macroH2A1 est considéré comme un répresseur transcriptionnel (Henikoff and Ahmad, 2005).

L'analyse du phénotype permet de conclure que macroH2A1 n'est pas nécessaire pour:

- La maturation et la différenciation des cellules germinales
- Le développement embryonnaire
- Ni pour l'établissement ni pour le maintien du pattern de méthylation de l'ADN
- La répression transcriptionnelle des rétrotransposons
- La réparation des cassures doubles brins de l'ADN induites par les rayons γ

L'étude histologique révèle un trouble du métabolisme lipidique chez les femelles macroH2A$^{-/-}$, ce qui suggère que macroH2A1 serait impliqué dans le contrôle du métabolisme des acides gras.

L'absence de phénotype a également été récemment décrite par un autre groupe ayant réalisé une autre lignée *knock out* pour macroH2A1 en utilisant la même stratégie que celle que nous avions employée (Changolkar *et coll.*, 2007). En accord avec nos résultats, les souris déficientes macroH2A1$^{-/-}$ générées de manière indépendante sont également viables, fertiles et naissent sans défauts (Changolkar *et coll.*, 2007). Les auteurs de cette étude ont également vérifié que le second gène macroH2A2 n'est pas surexprimé dans les souris macroH2A1$^{-/-}$.
Cette seconde étude sur des souris déficientes macroH2A1$^{-/-}$ s'intéresse au rôle de macroH2A1 dans la répression de la transcription des gènes. Pour cela le profil de transcription des souris déficientes macroH2A1$^{-/-}$ a été comparé avec celui de souris sauvages (Changolkar *et coll.*, 2007). L'expression de 34000 gènes a été ainsi analysée, par hybridation sur des "*microarrays*" de cDNA différentiellement marqués, rétrotranscrits à partir d'ARN isolés de foie. La première conclusion de cette étude est que le chromosome X inactif ne se réactive pas en l'absence de macroH2A1 (Changolkar *et coll.*, 2007). Ce résultat confirme les conclusions d'études antérieures ayant montrées la non-nécessité de macroH2A pour le

maintien de l'inactivation du chromosome X (Csankovszki *et coll.*, 1999; Hernandez-Munoz *et coll.*, 2005).
Le deuxième résultat important issu de ce travail et que sept gènes seulement sont significativement sur-exprimés en l'absence de macroH2A1 (Changolkar *et coll.*, 2007).
Étant donné que la densité moyenne en nucléosomes contenant macroH2A1 est estimée à environ 1 sur 30 – 200 (Pehrson and Fried, 1992) (communication personnelle S. Dimitrov), ce résultat implique que la présence de macroH2A1 n'est pas requise pour l'inactivation de la transcription des gènes qu'il occupe.
Le mécanisme moléculaire par lequel macroH2A contrôle l'expression de ces sept gènes reste à déterminer.
Il pourrait s'agir d'un effet indirect compte tenu du ratio entre le faible nombre de gènes concernés et le nombre important de séquences cibles de macroH2A1.

Remarquons que l'identité des gènes dérégulés dans les souris macroH2A1$^{-/-}$ corrèle parfaitement avec le phénotype de stéatose hépatique que nous observons.
En effet, sur les 7 gènes dont la transcription est augmentée en l'absence de macroH2A1, quatre sont directement impliqués dans le métabolisme des acides gras: Lpl, Scd2, CD36 et Thrsp (Changolkar *et coll.*, 2007). La dérégulation de ces quatre gènes dans les souris macroH2A$^{-/-}$ pourrait être à l'origine de la stéatose hépatique observée dans les foies de nos souris macroH2A$^{-/-}$. Cette hypothèse demande à être vérifiée, du fait que les deux études ont été réalisées sur des animaux de fond génétiques différents. De plus, Changolkar et ses collaborateurs n'ont pas décrit de macrovacuolisation hépatique (soit parce que le fond génétique utilisé ne donne pas ce phénotype, soit parce que les auteurs ne se sont pas focalisés sur cet aspect histologique).
L'analyse de niveau de transcription de ces quatre gènes est en cours d'étude dans notre lignée de souris macroH2A$^{-/-}$.

Notre étude a permis de démontrer que macroH2A1 n'est pas nécessaire à la répression des rétrotransposons: ni les IAP ni les LINE1 ne sont transcrits en l'absence de macroH2A1. Ce qui prouve que la présence de macroH2A1 sur ces séquences n'est pas requise pour les inactiver.
Ces données associées aux résultats de transcriptome obtenu par Changolkar *et coll.* indiquent que la présence de macroH2A1 à elle seule n'est pas suffisante *in vivo* pour réprimer la transcription.

Cependant, restons prudents quant à l'interprétation de l'analyse de souris invalidées ne présentant pas de phénotype. Afin d'éviter toute surinterprétation des résultats obtenus, il convient de discuter des causes de l'absence phénotype chez un mutant nul.

Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de phénotype d'une lignée de souris *knock out* :

LA MUTATION INDUITE CREE-T-ELLE UN ALLELE NUL ?

Une première hypothèse permettant d'expliquer l'absence apparente de phénotype chez les souris macroH2A$^{-/-}$ est que la mutation touche un domaine non essentiel à sa fonction.
La délétion de l'exon 2 codant pour la moitié du domaine *histone fold* induit la perte de fonction "histone". Ainsi, la protéine éventuellement traduite en l'absence de l'exon 2, n'a pas la capacité de former un dimère fonctionnel est par conséquent d'être incorporé au nucléosome. Donc notre souris invalidée est obligatoirement un mutant "perte de fonction".
Toutefois, si nous nous focalisons sur la fonction portée par le domaine non-histone (le macrodomaine), nous nous demandons quelle pourrait être la conséquence de la présence dans le noyau d'une protéine portant uniquement le domaine NHR: ce qui revient à créer un dominant négatif.

La délétion de l'exon 2 n'altère pas la séquence codante pour le domaine macro. En outre, nous avons constaté qu'en dépit de la conservation du site accepteur d'épissage sur l'exon 2, l'épissage de l'exon 1 s'effectue directement sur l'exon 3, donnant naissance à un ARNm codant pour le macro domaine. Étant donné, qu'il n'est pas possible de prédire les conséquences biologiques de la présence du NHR s'exerce en dehors de la chromatine, nous devons nous interroger sur la possibilité de créer un dominant négatif.
Malgré l'épissage d'un ARN codant pour le NHR dans notre lignée de souris KO, la traduction de cet ARNm n'est pas possible, et l'absence de protéine a été vérifiée par western-blot.
En effet, compte tenu du fait que le premier codon initiateur ATG en phase avec le cadre de lecture ne permet la traduction que des 30 derniers acides aminés; le court peptide résultant de cette traduction potentielle ne contiendrait pas le domaine HXTX essentiel à sa fonction (Allen *et coll.*, 2003; Ouararhni *et coll.*, 2006). Nous pouvons donc exclure la possibilité de l'existence du NHR dans notre lignée.

L'ABSENCE DE PHENOTYPE PROVIENT-ELLE D'UNE REDONDANCE GENIQUE ?

La deuxième hypothèse permettant d'expliquer l'absence de phénotype chez les souris macroH2A1$^{-/-}$ est que la perte de fonction est compensée par la présence d'autres gènes fonctionnellement redondants.

MacroH2A2 identique à 80% (Chadwick and Willard, 2001b; Costanzi and Pehrson, 2001) serait susceptible de complémenter la perte de fonction de macroH2A1.
Cependant, l'expression différentielle des deux isoformes entre plusieurs types cellulaires toutefois cette hypothèse peu vraisemblable.
Dans le but d'évaluer la probabilité d'une compensation de fonction par macorH2A2, nous avons quantifié l'expression de macroH2A2 dans les tissus des souris macroH2A1$^{-/-}$.
Dans nos conditions expérimentales, macroH2A2 n'est détecté que dans le cerveau, alors que Changolkar *et coll.* détectent la protéine macroH2A2 également dans les noyaux de foie (Changolkar *et coll.*, 2007). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les anticorps utilisés sont différents. Cette hétérogénéité de résultat remet en cause l'affinité de l'anticorps anti-macroH2A2 que nous avons utilisé, bien que l'expression de macroH2A2 dans le cerveau est cohérente avec le profil d'expression fourni par les EST. La spécificité de notre anticorps anti-macroH2A2 étant manifestement faible, il est probable que nous n'ayons pas été en mesure de détecter des différences d'expression à un niveau faible.

Dans nos expériences, comme dans celles menées par le groupe de John R. Pehrson, l'expression physiologiquement très faible de macroH2A2 n'est pas augmentée en l'absence de macroH2A1 (Changolkar *et coll.*, 2007). Ces résultats obtenus par deux groupes indépendants indiquent qu'une compensation de fonction par macroH2A2 est peu probable.

Toutefois cette compensation est peut-être sous estimée du fait de la difficulté de mesure de l'expression de macroH2A2.

Afin, d'exclure totalement le risque d'une complémentation par macroH2A2, l'invalidation génique du second allèle macroH2A2 est actuellement en cours de réalisation.

Si macroH2A2 ne paraît pas être présent en quantité suffisante dans les cellules macroH2A1$^{-/-}$ pour compenser la déficience de macroH2A1, il est envisageable que la

fonction soit complémentée par d'autres mécanismes aboutissants aux mêmes effets. Il semblerait en effet que le maintien de l'hétérochromatine et de l'inactivation du chromosome X soient assurés par des processus redondants (Csankovszki *et coll.*, 2001; Csankovszki *et coll.*, 1999; Grewal and Elgin, 2007; Hernandez-Munoz *et coll.*, 2005). Cette redondance a été notamment mise en évidence par l'association de plusieurs perturbations de nature différentes de l'hétérochromatine : le *knock-down* de macroH2A1 par siRNA n'induit pas de réactivation du X (Hernandez-Munoz *et coll.*, 2005). En revanche lorsque la diminution de l'expression de macroH2A1 est associée à une inhibition de la méthylation de l'ADN (par la 5-Aza-dC) et à une inhibition des histones déacétylases (par la TSA), une faible réactivation du Xi est mesurée (Hernandez-Munoz *et coll.*, 2005). Cette expérience suggère que plusieurs modifications de la chromatine dont la présence de macroH2A, la méthylation de l'ADN et des modifications d'histones, participent de manière redondante au maintien de l'inactivation. L'induction de la réactivation du Xi nécessiterait l'inactivation simultanée de plusieurs de ces couches répressives.

QUELLES AUTRES MODIFICATIONS DE LA CHROMATINE POURRAIENT COMPENSER LA PERTE DE MACROH2A1?

La tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 est la marque du Xi dont la localisation et le *timing* d'établissement corrèle le mieux avec macroH2A1.

Les modifications formant l'hétérochromatine ne sont pas distribuées de façon homogène sur le chromosome X inactif ; au contraire, elles forment des territoires (Chadwick, 2007). En métaphase la distribution de macroH2A1 et de H3K27me3 se superpose totalement (95% des cellules observé présentent un recouvrement total des deux marques) (Chadwick, 2007; Chadwick and Willard, 2004). Cette corrélation spatiale suggère que ces macroH2A1 et H3K27me3 pourraient agir conjointement pour maintenir l'état répressif. Le retrait de H3K27me3 par invalidation de Eed/Enx1 n'entraîne qu'une réactivation sporadique du Xi (Silva *et coll.*, 2003), suggérant que les fonctions de H3K27me3 et macroH2A1 pourraient être redondantes.

Afin de tester quelles peuvent être les conséquences de la déficience cumulée de macroH2A1 et de Eed/Enx1 (donc de H3K27me3) vis à vis de la réactivation du Xi et des rétrotransposons, la prochaine étape de notre étude consistera à éliminer dans les MEF macroH2A$^{-/-}$, la HMT Eed/Enx1 responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (chapitre I.2.3.4).

La méthylation de l'ADN est une marque héritable appartenant à une autre catégorie de modification de la chromatine dont le rôle semble être lié à macroH2A1.
Le lien fonctionnel entre ces deux couches de marques épigénétiques distinctes à été abordé dans les chapitres I.3.4. (Choo *et coll.*, 2006; Damelin and Bestor, 2007; Ma *et coll.*, 2005; Morey *et coll.*, 2004).
La déméthylation des dinucléotides est suffisante pour induire la réactivation des rétrotransposons (Bourc'his and Bestor, 2004; Walsh *et coll.*, 1998). L'analyse des embryons Dnmt1$^{-/-}$ a révélé que l'hypo-méthylation de l'ADN induit une réactivation du Xp soumis à l'empreinte, alors que l'inactivation aléatoire du Xi n'est que faiblement affectée (Sado *et coll.*, 2000). Ce qui démontre que le maintien de l'inactivation aléatoire peut tolérer une déméthylation extrême de l'ADN, suggérant l'existence d'autres mécanismes redondants assurant la répression.
La complémentation entre macroH2A1 et méthylation de l'ADN sera évaluée en traitant les MEF macroH2A$^{-/-}$ par la 5-Aza-dC (qui induit une déméthylation de l'ADN), dans le but d'évaluer la réactivation de gènes liés au X par FISH.

Ces expériences permettront de conclure quant à une redondance aboutissant au maintien de la répression transcriptionnelle via d'autres voies faisant intervenir la tri-méthylation de H3K27 ou la méthylation de l'ADN.

Cependant une redondance totale de ces mécanismes est très improbable. D'un point de vue évolutif, un gène est conservé parce qu'il apporte un avantage sélectif. Par conséquent, la délétion d'une région conservée du génome par *knock out* devrait théoriquement provoquer un phénotype visible.

MacroH2A1 étant très conservé entre les vertébrés et les oiseaux (Pehrson and Fried, 1992), on devrait s'attendre à ce que son invalidation génique induise un phénotype.

L'ABSENCE DE PHENOTYPE APPARENT D'UNE LIGNEE DE SOURIS KNOCK OUT EST UN PHENOMENE FREQUENT (PEARSON, 2002).

Plusieurs raisons peuvent l'expliquer:

L'interférence du reste du génome sur l'expérience de *knock out* constitue un facteur potentiellement responsable de l'apparente absence de phénotype. En effet, une mutation peut être létale au niveau embryonnaire sur un fond génétique déterminé et ne pas provoquer de phénotype visible sur un autre fond génétique (Threadgill *et coll.*, 1995). Cette contrainte implique qu'il est nécessaire de réaliser le *back cross* de la lignée macroH2A1$^{-/-}$ sur un fond génétique homogène. Compte tenu que l'autre lignée macroH2A1$^{-/-}$ ne présente pas de défauts hépatiques ni de réactivation du X est fixée sur un fond génétique C57Bl6 (Changolkar *et coll.*, 2007), il est préférable de fixer notre lignée sur un autre fond génétique (comme 129/Ola) afin de favoriser l'émergence d'un phénotype.

Il est probable que les souris macroH2A1$^{-/-}$ aient un phénotype que nous n'avons pas détecté. Deux raisons peuvent expliquer que nous n'ayons pas pu démasquer le phénotype:

La première explication met en avant les moyens d'investigations. L'analyse du phénotype réalisée s'est limitée à l'étude de quelques processus cellulaires suspectés de faire intervenir macroH2A1 et il serait naïf de penser que macroH2A1 ne soit pas impliqué dans des voies encore inconnues aujourd'hui.
Nous n'avons donc peut-être pas identifié le phénotype des souris macroH2A1$^{-/-}$ parce que nous n'avons pas étudié les aspects moléculaires et cellulaires en causes. Les effets d'une mutation peuvent êtres subtils et demander une analyse minutieuse ainsi qu' une expertise particulière pour être démasqués (Pearson, 2002).

Une autre raison pourrait être que les souris invalidées macroH2A1$^{-/-}$ n'ont peut-être pas été étudiées dans les conditions permettant au phénotype de s'exprimer. Dans certain cas, le phénotype devient apparent uniquement lorsque les mutants sont placés dans des conditions environnementales particulières (Pearson, 2002).

De par sa liaison avec PARP1, il est vraisemblable que la présence de macroH2A soit importante pour la stabilité de régions particulières du génome dans certaines conditions de

stress. En effet, PARP est recruté lors de l'induction des gènes de réponse aux hormones stéroïdes ou au stress, tel que *hsp70* (Tulin *et coll.*, 2002). L'ADP-ribosylation qui s'en suit provoque un relâchement local de la chromatine nécessaire à l'expression des gènes (Tulin *et coll.*, 2002). Chez la Drosophile, les mutants déficients pour PARP ne voient pas leur chromatine s'ouvrir en réponse au stress et ne sont pas capables d'induire l'expression d'HSP70 ni des gènes de la réponse immunitaire (Tulin *et coll.*, 2002).

L'incorporation de macroH2A1 sur des régions d'hétérochromatine facultative pourrait alors avoir pour fonction l'inhibition de l'ouverture de la chromatine engendrée par l'action de PARP1 sur les séquences réprimées (Nusinow *et coll.*, 2007a; Ouararhni *et coll.*, 2006).
L'inhibition de PARP-1 permettrait ainsi d'éviter que les régions d'hétérochromatine transcriptionnellement silencieuses ne s'activent de manière non spécifique lors d'un stress. Cette hypothèse implique que macroH2A1 aurait un rôle passif, et ne jouerait son rôle d'inhibiteur de PARP1 exclusivement dans certaines conditions de stress.
Une telle fonction biologique est compatible avec le phénotype des mutants déficients pour macroH2A1.

III.3. Conclusion générale

L'ensemble des données présentées dans ce manuscrit illustre la diversité des mécanismes cellulaires auxquels les variants d'histones sont associés: maintenance de l'intégrité du génome, transmission de l'information épigénétique, formation de structures chromatiniennes…

L'association de différents variants au sein d'un unique nucléosome, de même que les structures récemment identifiées faisant intervenir des variants ainsi que des protéines non-histones, sont à l'origine d'une grande diversité de types différents de nucléosomes. Ces nucléosomes dotés de fonctions particulières adoptent des structures parfois très éloignées de celle du nucléosome conventionnel.

Compte tenu du fait que les unités de transcription n'occupent que 3% du génome humain, et que beaucoup de variants d'histones sont enrichis sur les régions transcrites, on peut estimer qu'un nombre important de *loci* est empaqueté sous une forme "nucléosomale" alternative.

Par conséquent, on peut se demander dans quelle mesure le "nucléosome canonique" tel qu'il a été cristallisé, existe-t-il sur les régions régulatrices du génome ?

De plus, le fait que l'histone "variant" puisse être la forme majoritaire dans certains types cellulaires et que certaines espèces ne soient dotées que du variant pour certaines histones, pose la question de savoir s'il existe vraiment une forme dite "canonique" ?

Les histones étant avant tout des protéines architecturales, l'évolution de leur structure est limitée par la nécessité d'une compatibilité avec l'intégration dans le nucléosome et avec l'organisation des structures supérieures de la chromatine. Cette forte pression de sélection freine l'évolution des histones qui sont très conservées chez tous les eucaryotes (Malik and Henikoff, 2003).

L'histone H4 porte des fonctions uniques (Kayne *et coll.*, 1988). Par exemple, contrairement aux autres histones, la queue N-terminale de H4 est essentielle pour la formation de la fibre de 30 nm (Dorigo *et coll.*, 2003) et pour la répression des *loci* qui définissent le type sexuel chez la levure (Kayne *et coll.*, 1988). Du fait que les fonctions portées par H4 ne sont pas redondantes avec celles des autres histones (Kayne *et coll.*, 1988), il se trouve phylogéniquement figé, aucun variant de H4 n'a été rapporté (Malik and Henikoff, 2003).

La même pression sélective s'exerce sur les variants de l'histone H3, l'autre constituant du tétramère, dont on remarquera la conservation presque totale du domaine *histone fold.* L'histone centromérique CENP-A a pour fonction la formation des kinétochores. Quant à H3.3, il remplace l'histone canonique lors de l'assemblage de la chromatine hors de la réplication. L'incorporation de H3.3 a comme conséquence la réduction la stabilité du nucléosome; il a été proposé que le remplacement de H3 par H3.3 pourrait être un moyen d'effacer toutes les modifications portées par l'histone H3 (Ahmad and Henikoff, 2002; Hake and Allis, 2006).

L'histone H2B qui est importante pour l'élaboration de structures supérieures est également peu divergente. Les variants de H2B jouant un rôle pendant la spermatogenèse, ont vraisemblablement pour fonction l'établissement de structures alternatives facilitant l'échange des histones par les protamines et/ou sont nécessaires à la fertilisation.

H2A est l'histone qui est le plus dégénéré et compte de nombreux variants de fonction différentes. L'énigmatique variant H2ABbd, phylogénétiquement dégénéré, illustre la singularité de l'histone H2A qui supporte des variations de séquences importantes.

Certains variants de H2A peuvent représenter l'unique forme de l'histone H2A comme H2A.X chez *S. cerevisiae*; d'autres peuvent combiner la fonction de différents histones comme H2AV chez la Drosophile, l'homologue de H2A.Z comportant le motif SQ(E/D)Φ (Φ = aa hydrophobe) de H2A.X. Selon les espèces ou les types cellulaires étudiés, l'histone majoritaire peut donc être un variant. Les variants de H2A peuvent être considérés comme des fonctions alternativement portées par le nucléosome. L'incorporation de H2A.X apporte le motif SQ(E/D)Φ, dont la phosphorylation est un élément régulateur de la réparation de l'ADN et de la compaction de la fibre. Les conséquences de la substitution de H2A par H2A.Z sont multiples. Elle est importante pour modifier la structure de la chromatine en changeant la stabilité du dimère ainsi que la structure de la chromatine. La présence de deux nucléosomes contenant H2A.Z sur un nombre important de promoteurs, semble cruciale pour générer la région sans nucléosome. Les variants sont également susceptibles d'êtres impliqués dans la formation de l'hétérochromatine facultative comme macroH2A.

D'une manière générale, le rôle biologique des variants d'histones est fortement lié à leur spécificité d'incorporation dans la chromatine indépendamment de la réplication. Cette particularité est particulièrement importante pendant les étapes de remodelage massif de la chromatine caractéristiques de la spermiogenèse et de la fertilisation. Les variants jouent un rôle déterminant dans ces deux processus.

L'influence exercée par les variants sur la structure locale de la chromatine est sous la dépendance des chaperonnes et complexes de remodelage dirigeant leur incorporation sur des *loci* spécifiques. La compréhension des voies dans lesquelles sont impliquées ces chaperonnes et remodeleurs est capitale pour améliorer la connaissance du rôle biologique des variants d'histone.

Les travaux réalisés sur deux variants entrants dans la composition du dimère, ont permis de préciser leur fonction vis-à-vis de l'assemblage du chromosome mitotique, de la répression de séquences répétées ou encore de la méthylation de l'ADN.

Cependant de nombreuses questions restent à élucider pour comprendre leur rôle biologique.

Parmi ces questions se pose celle de l'identification des séquences d'ADN associées à ces variants. En effet, la position des nucléosomes contenant macroH2A1 ou H2BFWT sur le génome n'est pas connue.

Deux facteurs peuvent potentiellement cibler l'incorporation de variants d'histone: la séquence et les modifications de la chromatine.

Un positionnement dirigé par la séquence peut être exclu dans le cas de macroH2A puisque ce variant se localise dynamiquement sur le chromosome X en cours d'inactivation.

L'incorporation de macroH2A semble donc dépendre d'autres facteurs épigénétiques. L'identification de ces facteurs serait importante pour mieux comprendre la fonction biologique de macroH2A ainsi que le mécanisme d'inactivation du chromosome X.

La compréhension de l'interaction entre les différentes modifications de la chromatine s'inscrit dans le projet global d'étude de l'épigénome. Ce projet qualifié de post génomique, à pour vocation de caractériser les marques épigénétiques associées à la séquence génomique. Cependant, le profil épigénétique n'étant pas fixe (celui-ci évolue au cours du développement et présente des différences entre chaque type cellulaire), il sera donc nécessaire d'établir la carte épigénétique de chaque type cellulaire.

La localisation des modifications de la chromatine sur la séquence d'ADN ne constitue qu'une première étape dans la compréhension des processus épigénétiques à l'origine de la différenciation et de l'identité cellulaire. L'établissement du lien entre le génotype est le phénotype suppose en outre de mettre en évidence les voies de signalisation reliant les diverses informations épigénétiques entres-elles.

La découverte des liens entre différentes couches d'informations épigénétiques sera le passionnant défit scientifique de ces prochaines années.

IV. Références

Abbott, D.W., Ivanova, V.S., Wang, X., Bonner, W.M. and Ausio, J. (2001) Characterization of the stability and folding of H2A.Z chromatin particles: implications for transcriptional activation. *J Biol Chem*, **276**, 41945-41949.

Agelopoulos, M. and Thanos, D. (2006) Epigenetic determination of a cell-specific gene expression program by ATF-2 and the histone variant macroH2A. *Embo J*, **25**, 4843-4853.

Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell*, **9**, 1191-1200.

Albert, I., Mavrich, T.N., Tomsho, L.P., Qi, J., Zanton, S.J., Schuster, S.C. and Pugh, B.F. (2007) Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the Saccharomyces cerevisiae genome. *Nature*, **446**, 572-576.

Allegra, P., Sterner, R., Clayton, D.F. and Allfrey, V.G. (1987) Affinity chromatographic purification of nucleosomes containing transcriptionally active DNA sequences. *J Mol Biol*, **196**, 379-388.

Allen, M.D., Buckle, A.M., Cordell, S.C., Lowe, J. and Bycroft, M. (2003) The crystal structure of AF1521 a protein from Archaeoglobus fulgidus with homology to the non-histone domain of macroH2A. *J Mol Biol*, **330**, 503-511.

Allis, C.D., Glover, C.V., Bowen, J.K. and Gorovsky, M.A. (1980) Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, Tetrahymena thermophila. *Cell*, **20**, 609-617.

Almouzni, G., Clark, D.J., Mechali, M. and Wolffe, A.P. (1990) Chromatin assembly on replicating DNA in vitro. *Nucleic Acids Res*, **18**, 5767-5774.

Alsford, S. and Horn, D. (2004) Trypanosomatid histones. *Mol Microbiol*, **53**, 365-372.

Angelov, D., Molla, A., Perche, P.Y., Hans, F., Cote, J., Khochbin, S., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2003) The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell*, **11**, 1033-1041.

Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C.M., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2004) SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *Embo J*, **23**, 3815-3824.

Aravind, L. (2001) The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem Sci*, **26**, 273-275.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10148-10152.

Armstrong, J.A., Papoulas, O., Daubresse, G., Sperling, A.S., Lis, J.T., Scott, M.P. and Tamkun, J.W. (2002) The Drosophila BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *Embo J*, **21**, 5245-5254.

Avner, P. and Heard, E. (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, **2**, 59-67.

Bacher, C.P., Guggiari, M., Brors, B., Augui, S., Clerc, P., Avner, P., Eils, R. and Heard, E. (2006) Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat Cell Biol*, **8**, 293-299.

Baetz, K.K., Krogan, N.J., Emili, A., Greenblatt, J. and Hieter, P. (2004) The ctf13-30/CTF13 genomic haploinsufficiency modifier screen identifies the yeast chromatin remodeling complex RSC, which is required for the establishment of sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol*, **24**, 1232-1244.

Bailey, J.A., Carrel, L., Chakravarti, A. and Eichler, E.E. (2000) Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6634-6639.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.

Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J. and Luger, K. (2004) Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *Embo J*, **23**, 3314-3324.

Barbera, A.J., Chodaparambil, J.V., Kelley-Clarke, B., Joukov, V., Walter, J.C., Luger, K. and Kaye, K.M. (2006) The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science*, **311**, 856-861.

Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D. and Wynshaw-Boris, A. (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*, **86**, 159-171.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, **129**, 823-837.

Bassing, C.H., Chua, K.F., Sekiguchi, J., Suh, H., Whitlow, S.R., Fleming, J.C., Monroe, B.C., Ciccone, D.N., Yan, C., Vlasakova, K., Livingston, D.M., Ferguson, D.O., Scully, R. and Alt, F.W. (2002) Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8173-8178.

Bassing, C.H., Suh, H., Ferguson, D.O., Chua, K.F., Manis, J., Eckersdorff, M., Gleason, M., Bronson, R., Lee, C. and Alt, F.W. (2003) Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell*, **114**, 359-370.

Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J. and Woodcock, C.L. (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**, 14173-14178.

Bekaert, S., Derradji, H. and Baatout, S. (2004) Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev Biol*, **274**, 15-30.

Beletskii, A., Hong, Y.K., Pehrson, J., Egholm, M. and Strauss, W.M. (2001) PNA interference mapping demonstrates functional domains in the noncoding RNA Xist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9215-9220.

Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P. and Allshire, R.C. (2001) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science*, **294**, 2539-2542.

Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L. and Lander, E.S. (2005) Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, **120**, 169-181.

Bertocci, B., De Smet, A., Flatter, E., Dahan, A., Bories, J.C., Landreau, C., Weill, J.C. and Reynaud, C.A. (2002) Cutting edge: DNA polymerases mu and lambda are dispensable for Ig gene hypermutation. *J Immunol*, **168**, 3702-3706.

Bestor, T.H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, **9**, 2395-2402.

Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **16**, 6-21.

Black, B.E., Foltz, D.R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V.L., Jr. and Cleveland, D.W. (2004) Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature*, **430**, 578-582.

Blander, G. and Guarente, L. (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*, **73**, 417-435.

Blower, M.D. and Karpen, G.H. (2001) The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol*, **3**, 730-739.

Boggs, B.A., Cheung, P., Heard, E., Spector, D.L., Chinault, A.C. and Allis, C.D. (2002) Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet*, **30**, 73-76.

Bonenfant, D., Coulot, M., Towbin, H., Schindler, P. and van Oostrum, J. (2006) Characterization of histone H2A and H2B variants and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **5**, 541-552.

Bosch, A. and Suau, P. (1995) Changes in core histone variant composition in differentiating neurons: the roles of differential turnover and synthesis rates. *Eur J Cell Biol*, **68**, 220-225.

Bottomley, M.J. (2004) Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO Rep*, **5**, 464-469.

Boulard, M., Gautier, T., Mbele, G.O., Gerson, V., Hamiche, A., Angelov, D., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2006) The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol Cell Biol*, **26**, 1518-1526.

Bourc'his, D. and Bestor, T.H. (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, **431**, 96-99.

Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B. and Bestor, T.H. (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, **294**, 2536-2539.

Boyer, L.A., Latek, R.R. and Peterson, C.L. (2004) The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 158-163.

Boyle, A.L., Ballard, S.G. and Ward, D.C. (1990) Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome: chromosome karyotyping by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7757-7761.

Brouha, B., Schustak, J., Badge, R.M., Lutz-Prigge, S., Farley, A.H., Moran, J.V. and Kazazian, H.H., Jr. (2003) Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5280-5285.

Brown, C.J. and Willard, H.F. (1994) The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature*, **368**, 154-156.

Buchwitz, B.J., Ahmad, K., Moore, L.L., Roth, M.B. and Henikoff, S. (1999) A histone-H3-like protein in C. elegans. *Nature*, **401**, 547-548.

Bultman, S.J., Gebuhr, T.C. and Magnuson, T. (2005) A Brg1 mutation that uncouples ATPase activity from chromatin remodeling reveals an essential role for SWI/SNF-related complexes in beta-globin expression and erythroid development. *Genes Dev*, **19**, 2849-2861.

Burlingame, R.W., Love, W.E., Wang, B.C., Hamlin, R., Nguyen, H.X. and Moudrianakis, E.N. (1985) Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 A. *Science*, **228**, 546-553.

Camahort, R., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P. and Gerton, J.L. (2007) Scm3 is essential to recruit the histone h3 variant cse4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore. *Mol Cell*, **26**, 853-865.

Campisi, J. (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, **120**, 513-522.

Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S. and Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, **298**, 1039-1043.

Carr, A.M., Dorrington, S.M., Hindley, J., Phear, G.A., Aves, S.J. and Nurse, P. (1994) Analysis of a histone H2A variant from fission yeast: evidence for a role in chromosome stability. *Mol Gen Genet*, **245**, 628-635.

Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S.K., Lee, K.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P. and Workman, J.L. (2005) Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell*, **123**, 581-592.

Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M. and Nussenzweig, A. (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*, **5**, 675-679.

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., Redon, C., Pilch, D.R., Olaru, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R.D*., et coll.* (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, **296**, 922-927.

Chadwick, B.P. (2007) Variation in Xi chromatin organization and correlation of the H3K27me3 chromatin territories to transcribed sequences by microarray analysis. *Chromosoma*, **116**, 147-157.

Chadwick, B.P., Valley, C.M. and Willard, H.F. (2001) Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2699-2705.

Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2001a) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol*, **152**, 375-384.

Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2001b) Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Hum Mol Genet*, **10**, 1101-1113.

Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2003) Chromatin of the Barr body: histone and non-histone proteins associated with or excluded from the inactive X chromosome. *Hum Mol Genet*, **12**, 2167-2178.

Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2004) Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 17450-17455.

Chai, B., Huang, J., Cairns, B.R. and Laurent, B.C. (2005) Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev*, **19**, 1656-1661.

Chakravarthy, S., Gundimella, S.K., Caron, C., Perche, P.Y., Pehrson, J.R., Khochbin, S. and Luger, K. (2005a) Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol*, **25**, 7616-7624.

Chakravarthy, S., Park, Y.J., Chodaparambil, J., Edayathumangalam, R.S. and Luger, K. (2005b) Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS Lett*, **579**, 895-898.

Changolkar, L.N., Costanzi, C., Leu, N.A., Chen, D., McLaughlin, K.J. and Pehrson, J.R. (2007) Developmental changes in histone macroH2A1-mediated gene regulation. *Mol Cell Biol*, **27**, 2758-2764.

Changolkar, L.N. and Pehrson, J.R. (2006) macroH2A1 histone variants are depleted on active genes but concentrated on the inactive X chromosome. *Mol Cell Biol*, **26**, 4410-4420.

Chi, T.H., Wan, M., Zhao, K., Taniuchi, I., Chen, L., Littman, D.R. and Crabtree, G.R. (2002) Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature*, **418**, 195-199.

Chiu, M.L. and Irvin, J.L. (1984) Isolation of rat testis histone TH2B-x, and interaction of TH2B-x antiserum with histones and mononucleosomes. *Arch Biochem Biophys*, **229**, 295-303.

Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B. and Eddy, E.M. (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet*, **28**, 82-86.

Choo, J.H., Kim, J.D., Chung, J.H., Stubbs, L. and Kim, J. (2006) Allele-specific deposition of macroH2A1 in imprinting control regions. *Hum Mol Genet*, **15**, 717-724.

Churikov, D., Siino, J., Svetlova, M., Zhang, K., Gineitis, A., Morton Bradbury, E. and Zalensky, A. (2004a) Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics*, **84**, 745-756.

Churikov, D., Zalenskaya, I.A. and Zalensky, A.O. (2004b) Male germline-specific histones in mouse and man. *Cytogenet Genome Res*, **105**, 203-214.

Clemson, C.M., McNeil, J.A., Willard, H.F. and Lawrence, J.B. (1996) XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol*, **132**, 259-275.

Clerc, P. and Avner, P. (1998) Role of the region 3' to Xist exon 6 in the counting process of X-chromosome inactivation. *Nat Genet*, **19**, 249-253.

Collins, K.A., Castillo, A.R., Tatsutani, S.Y. and Biggins, S. (2005) De novo kinetochore assembly requires the centromeric histone H3 variant. *Mol Biol Cell*, **16**, 5649-5660.

Collins, N., Poot, R.A., Kukimoto, I., Garcia-Jimenez, C., Dellaire, G. and Varga-Weisz, P.D. (2002) An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet*, **32**, 627-632.

Cosgrove, M.S., Boeke, J.D. and Wolberger, C. (2004) Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1037-1043.

Costanzi, C. and Pehrson, J.R. (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, **393**, 599-601.

Costanzi, C. and Pehrson, J.R. (2001) MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family. *J Biol Chem*, **276**, 21776-21784.

Costanzi, C., Stein, P., Worrad, D.M., Schultz, R.M. and Pehrson, J.R. (2000) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female preimplantation mouse embryos. *Development*, **127**, 2283-2289.

Csankovszki, G., Nagy, A. and Jaenisch, R. (2001) Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol*, **153**, 773-784.

Csankovszki, G., Panning, B., Bates, B., Pehrson, J.R. and Jaenisch, R. (1999) Conditional deletion of Xist disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation. *Nat Genet*, **22**, 323-324.

Cui, B., Liu, Y. and Gorovsky, M.A. (2006) Deposition and function of histone H3 variants in Tetrahymena thermophila. *Mol Cell Biol*, **26**, 7719-7730.

Dalal, Y., Wang, H., Lindsay, S. and Henikoff, S. (2007) Tetrameric Structure of Centromeric Nucleosomes in Interphase Drosophila Cells. *PLoS Biol*, **5**, e218.

Damelin, M. and Bestor, T.H. (2007) The Biological Functions of DNA Methyltransferase-1 (DNMT1) Require its Methyltransferase Activity. *Mol Cell Biol*.

Daury, L., Chailleux, C., Bonvallet, J. and Trouche, D. (2006) Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription. *EMBO Rep*, **7**, 66-71.

de la Barre, A.E., Angelov, D., Molla, A. and Dimitrov, S. (2001) The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *Embo J*, **20**, 6383-6393.

de la Barre, A.E., Gerson, V., Gout, S., Creaven, M., Allis, C.D. and Dimitrov, S. (2000) Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *Embo J*, **19**, 379-391.

de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., Walztinger, C., Chambon, P. and de Murcia, G. (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7303-7307.

de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., Koseki, H. and Brockdorff, N. (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell*, **7**, 663-676.

Deininger, P.L., Moran, J.V., Batzer, M.A. and Kazazian, H.H., Jr. (2003) Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 651-658.

Deuring, R., Fanti, L., Armstrong, J.A., Sarte, M., Papoulas, O., Prestel, M., Daubresse, G., Verardo, M., Moseley, S.L., Berloco, M., Tsukiyama, T., Wu, C., Pimpinelli, S. and Tamkun, J.W. (2000) The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell*, **5**, 355-365.

Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K. and Richmond, T.J. (2003) Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol*, **327**, 85-96.

Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R.R. and Richmond, T.J. (2004) Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science*, **306**, 1571-1573.

Doyen, C.M., An, W., Angelov, D., Bondarenko, V., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2006a) Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol*, **26**, 1156-1164.

Doyen, C.M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Bouvet, P. and Dimitrov, S. (2006b) Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *Embo J*, **25**, 4234-4244.

Ebbert, R., Birkmann, A. and Schuller, H.J. (1999) The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of Saccharomyces cerevisiae required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Mol Microbiol*, **32**, 741-751.

Eberharter, A. and Becker, P.B. (2004) ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J Cell Sci*, **117**, 3707-3711.

Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A. and Gehrke, C. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, **10**, 2709-2721.

Eickbush, T.H. and Moudrianakis, E.N. (1978) The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry*, **17**, 4955-4964.

Eirin-Lopez, J.M., Ishibashi, T. and Ausio, J. (2007) H2A.Bbd: a quickly evolving hypervariable mammalian histone that destabilizes nucleosomes in an acetylation-independent way. *Faseb J.*

Eisen, J.A., Sweder, K.S. and Hanawalt, P.C. (1995) Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res*, **23**, 2715-2723.

Ellegren, H. (2002) Dosage compensation: do birds do it as well? *Trends Genet*, **18**, 25-28.

Enomoto, S. and Berman, J. (1998) Chromatin assembly factor I contributes to the maintenance, but not the re-establishment, of silencing at the yeast silent mating loci. *Genes Dev*, **12**, 219-232.

Esteve, P.O., Chin, H.G., Smallwood, A., Feehery, G.R., Gangisetty, O., Karpf, A.R., Carey, M.F. and Pradhan, S. (2006) Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev*, **20**, 3089-3103.

Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J. and Lyons, I. (2001) Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol*, **11**, 1183-1187.

Fan, J.Y., Gordon, F., Luger, K., Hansen, J.C. and Tremethick, D.J. (2002) The essential histone variant H2A.Z regulates the equilibrium between different chromatin conformational states. *Nat Struct Biol*, **9**, 172-176.

Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T.J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E.E., Stein, A., Woodcock, C.L. and Skoultchi, A.I. (2005) Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell*, **123**, 1199-1212.

Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P. and Nussenzweig, A. (2003) H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell*, **4**, 497-508.

Finch, J.T. and Klug, A. (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1897-1901.

Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F. and Khorasanizadeh, S. (2005) Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*, **438**, 1181-1185.

Flaus, A., Martin, D.M., Barton, G.J. and Owen-Hughes, T. (2006) Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res*, **34**, 2887-2905.

Frank, D., Doenecke, D. and Albig, W. (2003) Differential expression of human replacement and cell cycle dependent H3 histone genes. *Gene*, **312**, 135-143.

Freitag, M., Hickey, P.C., Khlafallah, T.K., Read, N.D. and Selker, E.U. (2004) HP1 is essential for DNA methylation in neurospora. *Mol Cell*, **13**, 427-434.

Freitas, M.A., Sklenar, A.R. and Parthun, M.R. (2004) Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications. *J Cell Biochem*, **92**, 691-700.

Furuyama, T., Dalal, Y. and Henikoff, S. (2006) Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6172-6177.

Garcia-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A.H., Jenuwein, T. and Blasco, M.A. (2004) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet*, **36**, 94-99.

Gardiner-Garden, M., Ballesteros, M., Gordon, M. and Tam, P.P. (1998) Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol*, **18**, 3350-3356.

Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Bradbury, E.M. and Schmid, C.W. (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*, **236**, 962-964.

Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Schmid, C.W. and Bradbury, E.M. (1990) Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem*, **265**, 20662-20666.

Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H. and Jaenisch, R. (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, **300**, 489-492.

Gautier, T., Abbott, D.W., Molla, A., Verdel, A., Ausio, J. and Dimitrov, S. (2004) Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep*, **5**, 715-720.

Gilbert, N., Lutz-Prigge, S. and Moran, J.V. (2002) Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*, **110**, 315-325.

Gilbert, S.L., Pehrson, J.R. and Sharp, P.A. (2000) XIST RNA associates with specific regions of the inactive X chromatin. *J Biol Chem*, **275**, 36491-36494.

Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Yau, P.M., Bradbury, E.M. and Zalensky, A.O. (2000) Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol*, **151**, 1591-1598.

Goldberg, A.D., Allis, C.D. and Bernstein, E. (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, **128**, 635-638.

Gorman, J.R., van der Stoep, N., Monroe, R., Cogne, M., Davidson, L. and Alt, F.W. (1996) The Ig(kappa) enhancer influences the ratio of Ig(kappa) versus Ig(lambda) B lymphocytes. *Immunity*, **5**, 241-252.

Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S. and Caron, C. (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol*, **176**, 283-294.

Green, E.M., Antczak, A.J., Bailey, A.O., Franco, A.A., Wu, K.J., Yates, J.R., 3rd and Kaufman, P.D. (2005) Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Curr Biol*, **15**, 2044-2049.

Gregoretti, I.V., Lee, Y.M. and Goodson, H.V. (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*, **338**, 17-31.

Gresh, L., Bourachot, B., Reimann, A., Guigas, B., Fiette, L., Garbay, S., Muchardt, C., Hue, L., Pontoglio, M., Yaniv, M. and Klochendler-Yeivin, A. (2005) The SWI/SNF chromatin-remodeling complex subunit SNF5 is essential for hepatocyte differentiation. *Embo J*, **24**, 3313-3324.

Grewal, S.I. and Elgin, S.C. (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, **447**, 399-406.

Grigoryev, S.A., Nikitina, T., Pehrson, J.R., Singh, P.B. and Woodcock, C.L. (2004) Dynamic relocation of epigenetic chromatin markers reveals an active role of constitutive heterochromatin in the transition from proliferation to quiescence. *J Cell Sci*, **117**, 6153-6162.

Groth, A., Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Lukas, J., Bartek, J. and Almouzni, G. (2005) Human Asf1 regulates the flow of S phase histones during replicational stress. *Mol Cell*, **17**, 301-311.

Grune, T., Brzeski, J., Eberharter, A., Clapier, C.R., Corona, D.F., Becker, P.B. and Muller, C.W. (2003) Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell*, **12**, 449-460.

Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**, 349-352.

Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C. and Almouzni, G. (2004) Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol*, **166**, 493-505.

Guillemette, B., Bataille, A.R., Gevry, N., Adam, M., Blanchette, M., Robert, F. and Gaudreau, L. (2005) Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol*, **3**, e384.

Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E. and Bird, A. (2001) A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*, **27**, 322-326.

Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J. and Surani, M.A. (2002) Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*, **117**, 15-23.

Hake, S.B. and Allis, C.D. (2006) Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6428-6435.

Hake, S.B., Garcia, B.A., Kauer, M., Baker, S.P., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Allis, C.D. (2005) Serine 31 phosphorylation of histone variant H3.3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6344-6349.

Hakimi, M.A., Bochar, D.A., Schmiesing, J.A., Dong, Y., Barak, O.G., Speicher, D.W., Yokomori, K. and Shiekhattar, R. (2002) A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature*, **418**, 994-998.

Hansen, R.S., Stoger, R., Wijmenga, C., Stanek, A.M., Canfield, T.K., Luo, P., Matarazzo, M.R., D'Esposito, M., Feil, R., Gimelli, G., Weemaes, C.M., Laird, C.D. and Gartler, S.M. (2000) Escape from gene silencing in ICF syndrome: evidence for advanced replication time as a major determinant. *Hum Mol Genet*, **9**, 2575-2587.

Hassan, A.H., Awad, S. and Prochasson, P. (2006) The Swi2/Snf2 bromodomain is required for the displacement of SAGA and the octamer transfer of SAGA-acetylated nucleosomes. *J Biol Chem*, **281**, 18126-18134.

Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J. and Workman, J.L. (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*, **111**, 369-379.

Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.K., Usson, Y., Pelletier, R., Sele, B., Khochbin, S. and Rousseaux, S. (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol*, **79**, 950-960.

Heard, E., Rougeulle, C., Arnaud, D., Avner, P., Allis, C.D. and Spector, D.L. (2001) Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. *Cell*, **107**, 727-738.

Hellman, A. and Chess, A. (2007) Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*, **315**, 1141-1143.

Hendrich, B. and Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 6538-6547.

Henikoff, S. (1990) Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet*, **6**, 422-426.

Henikoff, S. and Ahmad, K. (2005) Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 133-153.

Henikoff, S. and Dalal, Y. (2005) Centromeric chromatin: what makes it unique? *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 177-184.

Hernandez-Munoz, I., Lund, A.H., van der Stoop, P., Boutsma, E., Muijrers, I., Verhoeven, E., Nusinow, D.A., Panning, B., Marahrens, Y. and van Lohuizen, M. (2005) Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7635-7640.

Hickey, D.A. (1982) Selfish DNA: a sexually-transmitted nuclear parasite. *Genetics*, **101**, 519-531.

Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D. and Winston, F. (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev*, **6**, 2288-2298.

Holbert, M.A. and Marmorstein, R. (2005) Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 673-680.

Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. and Young, R.A. (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, **95**, 717-728.

Howell, C.Y., Bestor, T.H., Ding, F., Latham, K.E., Mertineit, C., Trasler, J.M. and Chaillet, J.R. (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, **104**, 829-838.

Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P. and Choo, K.H. (2000) Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1148-1153.

Hoyer-Fender, S., Costanzi, C. and Pehrson, J.R. (2000) Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp Cell Res*, **258**, 254-260.

Hsu, J.M., Huang, J., Meluh, P.B. and Laurent, B.C. (2003) The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation. *Mol Cell Biol*, **23**, 3202-3215.

Huang, Y., Fang, J., Bedford, M.T., Zhang, Y. and Xu, R.M. (2006) Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science*, **312**, 748-751.

Hunter, N., Borner, G.V., Lichten, M. and Kleckner, N. (2001) Gamma-H2AX illuminates meiosis. *Nat Genet*, **27**, 236-238.

Huynh, K.D. and Lee, J.T. (2003) Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature*, **426**, 857-862.

Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, **403**, 795-800.

Ishimi, Y., Hirosumi, J., Sato, W., Sugasawa, K., Yokota, S., Hanaoka, F. and Yamada, M. (1984) Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells. *Eur J Biochem*, **142**, 431-439.

Ishimi, Y., Kojima, M., Yamada, M. and Hanaoka, F. (1987) Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-I) and histones. *Eur J Biochem*, **162**, 19-24.

Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R. and Kadonaga, J.T. (1996) Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol Cell Biol*, **16**, 3112-3124.

Izban, M.G. and Luse, D.S. (1991) Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing. *Genes Dev*, **5**, 683-696.

Jackson, J.D. and Gorovsky, M.A. (2000) Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3811-3816.

Jackson, V. (1990) In vivo studies on the dynamics of histone-DNA interaction: evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and a low level of dissolution independent of both. *Biochemistry*, **29**, 719-731.

Jair, K.W., Bachman, K.E., Suzuki, H., Ting, A.H., Rhee, I., Yen, R.W., Baylin, S.B. and Schuebel, K.E. (2006) De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res*, **66**, 682-692.

Janicki, S.M., Tsukamoto, T., Salghetti, S.E., Tansey, W.P., Sachidanandam, R., Prasanth, K.V., Ried, T., Shav-Tal, Y., Bertrand, E., Singer, R.H. and Spector, D.L. (2004) From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell*, **116**, 683-698.

Jeppesen, P. and Turner, B.M. (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, **74**, 281-289.

Jin, C. and Felsenfeld, G. (2007) Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev*, **21**, 1519-1529.

Jin, J., Cai, Y., Li, B., Conaway, R.C., Workman, J.L., Conaway, J.W. and Kusch, T. (2005) In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci*, **30**, 680-687.

Joseph, A., Mitchell, A.R. and Miller, O.J. (1989) The organization of the mouse satellite DNA at centromeres. *Exp Cell Res*, **183**, 494-500.

Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E. and Sasaki, H. (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, **429**, 900-903.

Karpen, G.H. and Allshire, R.C. (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet*, **13**, 489-496.

Karras, G.I., Kustatscher, G., Buhecha, H.R., Allen, M.D., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M. and Ladurner, A.G. (2005) The macro domain is an ADP-ribose binding module. *Embo J*, **24**, 1911-1920.

Kaufman, P.D., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1997) Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in Saccharomyces cerevisiae cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes Dev*, **11**, 345-357.

Kayne, P.S., Kim, U.J., Han, M., Mullen, J.R., Yoshizaki, F. and Grunstein, M. (1988) Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell*, **55**, 27-39.

Kazazian, H.H., Jr. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, **303**, 1626-1632.

Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J.A., Bienz, M. and Muller, J. (1998) dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science*, **282**, 1897-1900.

Keogh, M.C., Kurdistani, S.K., Morris, S.A., Ahn, S.H., Podolny, V., Collins, S.R., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, N.J., Boone, C., Emili, A., Weissman, J.S., Hughes, T.R., Strahl, B.D*., et coll.* (2005) Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell*, **123**, 593-605.

Khorasanizadeh, S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, **116**, 259-272.

Kim, S.M., Dubey, D.D. and Huberman, J.A. (2003) Early-replicating heterochromatin. *Genes Dev*, **17**, 330-335.

Kim, U.J., Han, M., Kayne, P. and Grunstein, M. (1988) Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of Saccharomyces cerevisiae. *Embo J*, **7**, 2211-2219.

Kimmins, S. and Sassone-Corsi, P. (2005) Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, **434**, 583-589.

Kimura, H. and Cook, P.R. (2001) Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol*, **153**, 1341-1353.

Klose, R.J. and Zhang, Y. (2007) Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 307-318.

Knezetic, J.A. and Luse, D.S. (1986) The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell*, **45**, 95-104.

Kobor, M.S., Venkatasubrahmanyam, S., Meneghini, M.D., Gin, J.W., Jennings, J.L., Link, A.J., Madhani, H.D. and Rine, J. (2004) A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol*, **2**, E131.

Kohlmaier, A., Savarese, F., Lachner, M., Martens, J., Jenuwein, T. and Wutz, A. (2004) A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS Biol*, **2**, E171.

Konev, A.Y., Tribus, M., Park, S.Y., Podhraski, V., Lim, C.Y., Emelyanov, A.V., Vershilova, E., Pirrotta, V., Kadonaga, J.T., Lusser, A. and Fyodorov, D.V. (2007) CHD1 motor protein is required for deposition of histone variant H3.3 into chromatin in vivo. *Science*, **317**, 1087-1090.

Kornberg, R.D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, **184**, 868-871.

Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.

Krogan, N.J., Baetz, K., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T.C., Thompson, N.J., Davey, M.G., Pootoolal, J., Hughes, T.R., Emili, A., Buratowski, S., Hieter, P. and Greenblatt, J.F. (2004) Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 13513-13518.

Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., Richards, D.P., Wu, X., Emili, A., Hughes, T.R., Buratowski, S.*, et coll.* (2003a) A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell*, **12**, 1565-1576.

Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S. and Greenblatt, J. (2003b) Methylation of histone H3 by Set2 in Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **23**, 4207-4218.

Kuff, E.L. and Lueders, K.K. (1988) The intracisternal A-particle gene family: structure and functional aspects. *Adv Cancer Res*, **51**, 183-276.

Kuhn, R., Rajewsky, K. and Muller, W. (1991) Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, **254**, 707-710.

Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugieux, C., Scheffzek, K. and Ladurner, A.G. (2005) Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 624-625.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.

Ladurner, A.G. (2003) Inactivating chromosomes: a macro domain that minimizes transcription. *Mol Cell*, **12**, 1-3.

Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J. and Reik, W. (2003) Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*, **35**, 88-93.

Langst, G. and Becker, P.B. (2001) ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA. *Mol Cell*, **8**, 1085-1092.

Lee, J., Inoue, K., Ono, R., Ogonuki, N., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., Ogura, A. and Ishino, F. (2002) Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, **129**, 1807-1817.

Lee, J.T. and Jaenisch, R. (1997) Long-range cis effects of ectopic X-inactivation centres on a mouse autosome. *Nature*, **386**, 275-279.

Lee, J.T., Strauss, W.M., Dausman, J.A. and Jaenisch, R. (1996) A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. *Cell*, **86**, 83-94.

Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T. and Peters, A.H. (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol*, **13**, 1192-1200.

Lewis, J.D., Abbott, D.W. and Ausio, J. (2003) A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol*, **81**, 131-140.

Li, A., Maffey, A.H., Abbott, W.D., Conde e Silva, N., Prunell, A., Siino, J., Churikov, D., Zalensky, A.O. and Ausio, J. (2005a) Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry*, **44**, 2529-2535.

Li, B., Gogol, M., Carey, M., Lee, D., Seidel, C. and Workman, J.L. (2007) Combined action of PHD and chromo domains directs the Rpd3S HDAC to transcribed chromatin. *Science*, **316**, 1050-1054.

Li, B., Pattenden, S.G., Lee, D., Gutierrez, J., Chen, J., Seidel, C., Gerton, J. and Workman, J.L. (2005b) Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 18385-18390.

Li, E., Beard, C. and Jaenisch, R. (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, **366**, 362-365.

Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, **69**, 915-926.

Lickert, H., Takeuchi, J.K., Von Both, I., Walls, J.R., McAuliffe, F., Adamson, S.L., Henkelman, R.M., Wrana, J.L., Rossant, J. and Bruneau, B.G. (2004) Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature*, **432**, 107-112.

Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D. and Felsenfeld, G. (2001) Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science*, **293**, 2453-2455.

Liu, X., Li, B. and GorovskyMa. (1996) Essential and nonessential histone H2A variants in Tetrahymena thermophila. *Mol Cell Biol*, **16**, 4305-4311.

Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurencon, A., Karr, T.L. and Couble, P. (2005) The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature*, **437**, 1386-1390.

Lorch, Y., LaPointe, J.W. and Kornberg, R.D. (1987) Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell*, **49**, 203-210.

Lorch, Y., Maier-Davis, B. and Kornberg, R.D. (2006) Chromatin remodeling by nucleosome disassembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3090-3093.

Lorch, Y., Zhang, M. and Kornberg, R.D. (2001) RSC unravels the nucleosome. *Mol Cell*, **7**, 89-95.

Lowell, J.E., Kaiser, F., Janzen, C.J. and Cross, G.A. (2005) Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in Trypanosoma brucei. *J Cell Sci*, **118**, 5721-5730.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature*, **389**, 251-260.

Luk, E., Vu, N.D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W.H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y. and Wu, C. (2007) Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Mol Cell*, **25**, 357-368.

Lyon, M.F. (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). *Nature*, **190**, 372-373.

Lyon, M.F. (1998) X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet*, **80**, 133-137.

Ma, Y., Jacobs, S.B., Jackson-Grusby, L., Mastrangelo, M.A., Torres-Betancourt, J.A., Jaenisch, R. and Rasmussen, T.P. (2005) DNA CpG hypomethylation induces heterochromatin reorganization involving the histone variant macroH2A. *J Cell Sci*, **118**, 1607-1616.

Mak, W., Nesterova, T.B., de Napoles, M., Appanah, R., Yamanaka, S., Otte, A.P. and Brockdorff, N. (2004) Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*, **303**, 666-669.

Malik, H.S. and Henikoff, S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol*, **10**, 882-891.

Martin, C. and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 838-849.

Masutani, M., Nozaki, T., Nakamoto, K., Nakagama, H., Suzuki, H., Kusuoka, O., Tsutsumi, M. and Sugimura, T. (2000) The response of Parp knockout mice against DNA damaging agents. *Mutat Res*, **462**, 159-166.

Matangkasombut, O. and Buratowski, S. (2003) Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol Cell*, **11**, 353-363.

McBryant, S.J., Park, Y.J., Abernathy, S.M., Laybourn, P.J., Nyborg, J.K. and Luger, K. (2003) Preferential binding of the histone (H3-H4)2 tetramer by NAP1 is mediated by the amino-terminal histone tails. *J Biol Chem*, **278**, 44574-44583.

Meetei, A.R., Ullas, K.S., Vasupradha, V. and Rao, M.R. (2002) Involvement of protein kinase A in the phosphorylation of spermatidal protein TP2 and its effect on DNA condensation. *Biochemistry*, **41**, 185-195.

Meistrich, M.L., Bucci, L.R., Trostle-Weige, P.K. and Brock, W.A. (1985) Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Dev Biol*, **112**, 230-240.

Menoni, H., Gasparutto, D., Hamiche, A., Cadet, J., Dimitrov, S., Bouvet, P. and Angelov, D. (2007) ATP dependent chromatin remodelling is required for Base Excision Repair in conventional but not in variant H2A.Bbd nucleosomes. *Mol Cell Biol.*

Mermoud, J.E., Costanzi, C., Pehrson, J.R. and Brockdorff, N. (1999) Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. *J Cell Biol*, **147**, 1399-1408.

Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Gunther, T., Buettner, R. and Schule, R. (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, **437**, 436-439.

Meyer-Ficca, M., Muller-Navia, J. and Scherthan, H. (1998) Clustering of pericentromeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (Rattus norvegicus) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. *J Cell Sci*, **111 (Pt 10)**, 1363-1370.

Millar, C.B., Xu, F., Zhang, K. and Grunstein, M. (2006) Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev*, **20**, 711-722.

Mito, Y., Henikoff, J.G. and Henikoff, S. (2005) Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat Genet*, **37**, 1090-1097.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S. and Wu, C. (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*, **303**, 343-348.

Mizuguchi, G., Xiao, H., Wisniewski, J., Smith, M.M. and Wu, C. (2007) Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell*, **129**, 1153-1164.

Mohandas, T., Sparkes, R.S. and Shapiro, L.J. (1981) Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science*, **211**, 393-396.

Monni, O. and Knuutila, S. (2001) 11q deletions in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*, **40**, 259-266.

Moore, S.C., Jason, L. and Ausio, J. (2002) The elusive structural role of ubiquitinated histones. *Biochem Cell Biol*, **80**, 311-319.

Morey, C., Navarro, P., Debrand, E., Avner, P., Rougeulle, C. and Clerc, P. (2004) The region 3' to Xist mediates X chromosome counting and H3 Lys-4 dimethylation within the Xist gene. *Embo J*, **23**, 594-604.

Morrison, A.J., Highland, J., Krogan, N.J., Arbel-Eden, A., Greenblatt, J.F., Haber, J.E. and Shen, X. (2004) INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell*, **119**, 767-775.

Mosammaparast, N., Ewart, C.S. and Pemberton, L.F. (2002) A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *Embo J*, **21**, 6527-6538.

Moss, S.B., Challoner, P.B. and Groudine, M. (1989) Expression of a novel histone 2B during mouse spermiogenesis. *Dev Biol*, **133**, 83-92.

Muller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E. and Simon, J.A. (2002) Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell*, **111**, 197-208.

Munakata, T., Adachi, N., Yokoyama, N., Kuzuhara, T. and Horikoshi, M. (2000) A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity. *Genes Cells*, **5**, 221-233.

Nagaki, K., Cheng, Z., Ouyang, S., Talbert, P.B., Kim, M., Jones, K.M., Henikoff, S., Buell, C.R. and Jiang, J. (2004) Sequencing of a rice centromere uncovers active genes. *Nat Genet*, **36**, 138-145.

Nakayama, J., Klar, A.J. and Grewal, S.I. (2000) A chromodomain protein, Swi6, performs imprinting functions in fission yeast during mitosis and meiosis. *Cell*, **101**, 307-317.

Nan, X., Campoy, F.J. and Bird, A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, **88**, 471-481.

Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J. and Lowe, S.W. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, **113**, 703-716.

Natsume, R., Eitoku, M., Akai, Y., Sano, N., Horikoshi, M. and Senda, T. (2007) Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature*, **446**, 338-341.

Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. and Struhl, K. (2002) Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev*, **16**, 806-819.

Norris, D.P., Patel, D., Kay, G.F., Penny, G.D., Brockdorff, N., Sheardown, S.A. and Rastan, S. (1994) Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation. *Cell*, **77**, 41-51.

Nusinow, D.A., Hernandez-Munoz, I., Fazzio, T.G., Shah, G.M., Kraus, W.L. and Panning, B. (2007a) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is inhibited by a histone H2A variant,

MacroH2A, and contributes to silencing of the inactive X chromosome. *J Biol Chem*, **282**, 12851-12859.
Nusinow, D.A., Sharp, J.A., Morris, A., Salas, S., Plath, K. and Panning, B. (2007b) The Histone Domain of macroH2A1 Contains Several Dispersed Elements that Are Each Sufficient to Direct Enrichment on the Inactive X Chromosome. *J Mol Biol*.
O'Neill, L.P. and Turner, B.M. (2003) Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. *Methods*, **31**, 76-82.
Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D. and Heard, E. (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, **303**, 644-649.
Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**, 247-257.
Olins, A.L. and Olins, D.E. (1974) Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*, **183**, 330-332.
Oliva, R. and Dixon, G.H. (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **40**, 25-94.
Ooi, S.K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.P., Allis, C.D., Cheng, X. and Bestor, T.H. (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, **448**, 714-717.
Ouararhni, K., Hadj-Slimane, R., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Mietton, F., Harel-Bellan, A., Dimitrov, S. and Hamiche, A. (2006) The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes Dev*, **20**, 3324-3336.
Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, **4**, 281-300.
Palmer, D.K., O'Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S. and Margolis, R.L. (1987) A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol*, **104**, 805-815.
Pandey, N.B. and Marzluff, W.F. (1987) The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability. *Mol Cell Biol*, **7**, 4557-4559.
Panning, B. and Jaenisch, R. (1996) DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes. *Genes Dev*, **10**, 1991-2002.
Park, Y.J., Dyer, P.N., Tremethick, D.J. and Luger, K. (2004) A new fluorescence resonance energy transfer approach demonstrates that the histone variant H2AZ stabilizes the histone octamer within the nucleosome. *J Biol Chem*, **279**, 24274-24282.
Park, Y.J. and Luger, K. (2006) Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem Cell Biol*, **84**, 549-558.
Pearson, H. (2002) Surviving a knockout blow. *Nature*, **415**, 8-9.
Pehrson, J.R., Costanzi, C. and Dharia, C. (1997) Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *J Cell Biochem*, **65**, 107-113.
Pehrson, J.R. and Fried, V.A. (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science*, **257**, 1398-1400.
Penny, G.D., Kay, G.F., Sheardown, S.A., Rastan, S. and Brockdorff, N. (1996) Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, **379**, 131-137.
Perche, P.Y., Vourc'h, C., Konecny, L., Souchier, C., Robert-Nicoud, M., Dimitrov, S. and Khochbin, S. (2000) Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr Biol*, **10**, 1531-1534.

Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H. and Jenuwein, T. (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell*, **12**, 1577-1589.

Peterson, C.L. and Laniel, M.A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr Biol*, **14**, R546-551.

Peterson, C.L. and Tamkun, J.W. (1995) The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci*, **20**, 143-146.

Phillips, R.L., Ernst, R.E., Brunk, B., Ivanova, N., Mahan, M.A., Deanehan, J.K., Moore, K.A., Overton, G.C. and Lemischka, I.R. (2000) The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science*, **288**, 1635-1640.

Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., de la Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B. and Zhang, Y. (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, **300**, 131-135.

Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K. and Young, R.A. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, **122**, 517-527.

Poot, R.A., Bozhenok, L., van den Berg, D.L., Steffensen, S., Ferreira, F., Grimaldi, M., Gilbert, N., Ferreira, J. and Varga-Weisz, P.D. (2004) The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nat Cell Biol*, **6**, 1236-1244.

Popova, B.C., Tada, T., Takagi, N., Brockdorff, N. and Nesterova, T.B. (2006) Attenuated spread of X-inactivation in an X;autosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7706-7711.

Prochasson, P., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P. and Workman, J.L. (2005) The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes Dev*, **19**, 2534-2539.

Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J. and Madhani, H.D. (2005) Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell*, **123**, 233-248.

Rangasamy, D., Berven, L., Ridgway, P. and Tremethick, D.J. (2003) Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *Embo J*, **22**, 1599-1607.

Rangasamy, D., Greaves, I. and Tremethick, D.J. (2004) RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 650-655.

Rao, B.J., Brahmachari, S.K. and Rao, M.R. (1983) Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J Biol Chem*, **258**, 13478-13485.

Rasmussen, T.P., Mastrangelo, M.A., Eden, A., Pehrson, J.R. and Jaenisch, R. (2000) Dynamic relocalization of histone MacroH2A1 from centrosomes to inactive X chromosomes during X inactivation. *J Cell Biol*, **150**, 1189-1198.

Rasmussen, T.P., Wutz, A.P., Pehrson, J.R. and Jaenisch, R.R. (2001) Expression of Xist RNA is sufficient to initiate macrochromatin body formation. *Chromosoma*, **110**, 411-420.

Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. and Bonner, W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 162-169.

Reinke, H. and Horz, W. (2003) Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell*, **11**, 1599-1607.

Rhee, I., Jair, K.W., Yen, R.W., Lengauer, C., Herman, J.G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Baylin, S.B. and Schuebel, K.E. (2000) CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature*, **404**, 1003-1007.

Richmond, T.J. and Davey, C.A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, **423**, 145-150.

Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D. and Klug, A. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 A resolution. *Nature*, **311**, 532-537.

Robinson, P.J., Fairall, L., Huynh, V.A. and Rhodes, D. (2006) EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6506-6511.

Robinson, P.J. and Rhodes, D. (2006) Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol*, **16**, 336-343.

Roest, H.P., van Klaveren, J., de Wit, J., van Gurp, C.G., Koken, M.H., Vermey, M., van Roijen, J.H., Hoogerbrugge, J.W., Vreeburg, J.T., Baarends, W.M., Bootsma, D., Grootegoed, J.A. and Hoeijmakers, J.H. (1996) Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell*, **86**, 799-810.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, **273**, 5858-5868.

Ross, M.T., Grafham, D.V., Coffey, A.J., Scherer, S., McLay, K., Muzny, D., Platzer, M., Howell, G.R., Burrows, C., Bird, C.P., Frankish, A., Lovell, F.L., Howe, K.L., Ashurst, J.L., Fulton, R.S.*, et coll.* (2005) The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, **434**, 325-337.

Russo, V.E.A., Martienssen, R. A. & Riggs, A. D. (1996) Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury*.

Sado, T., Fenner, M.H., Tan, S.S., Tam, P., Shioda, T. and Li, E. (2000) X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol*, **225**, 294-303.

Saha, A., Wittmeyer, J. and Cairns, B.R. (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 437-447.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edn. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

Sandman, K., Pereira, S.L. and Reeve, J.N. (1998) Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 1350-1364.

Sanematsu, F., Takami, Y., Barman, H.K., Fukagawa, T., Ono, T., Shibahara, K. and Nakayama, T. (2006) Asf1 is required for viability and chromatin assembly during DNA replication in vertebrate cells. *J Biol Chem*, **281**, 13817-13827.

Santisteban, M.S., Kalashnikova, T. and Smith, M.M. (2000) Histone H2A.Z regulats transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell*, **103**, 411-422.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, **419**, 407-411.

Sassone-Corsi, P. (2002) Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*, **296**, 2176-2178.

Savarese, F., Flahndorfer, K., Jaenisch, R., Busslinger, M. and Wutz, A. (2006) Hematopoietic precursor cells transiently reestablish permissiveness for X inactivation. *Mol Cell Biol*, **26**, 7167-7177.

Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (2005) X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*, **436**, 138-141.
Schoeftner, S., Sengupta, A.K., Kubicek, S., Mechtler, K., Spahn, L., Koseki, H., Jenuwein, T. and Wutz, A. (2006) Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *Embo J*, **25**, 3110-3122.
Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C. and de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 517-528.
Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and Cavalli, G. (2007) Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, **128**, 735-745.
Schwartz, B.E. and Ahmad, K. (2005) Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev*, **19**, 804-814.
Scott, R.J. and Spielman, M. (2006) Genomic imprinting in plants and mammals: how life history constrains convergence. *Cytogenet Genome Res*, **113**, 53-67.
Shao, Z. (1999) Probing Nanometer Structures with Atomic Force Microscopy. *News Physiol Sci*, **14**, 142-149.
Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. and Wu, C. (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature*, **406**, 541-544.
Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A. and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-953.
Shibahara, K. and Stillman, B. (1999) Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell*, **96**, 575-585.
Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M. and et al. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, **68**, 855-867.
Shirley, C.R., Hayashi, S., Mounsey, S., Yanagimachi, R. and Meistrich, M.L. (2004) Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod*, **71**, 1220-1229.
Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R. and Peterson, C.L. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, **311**, 844-847.
Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E. and Lichten, M. (2004) Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr Biol*, **14**, 1703-1711.
Silva, J., Mak, W., Zvetkova, I., Appanah, R., Nesterova, T.B., Webster, Z., Peters, A.H., Jenuwein, T., Otte, A.P. and Brockdorff, N. (2003) Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell*, **4**, 481-495.
Smallwood, A., Esteve, P.O., Pradhan, S. and Carey, M. (2007) Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev*, **21**, 1169-1178.
Smith, S. and Stillman, B. (1991) Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro. *Embo J*, **10**, 971-980.
Sogo, J.M., Stahl, H., Koller, T. and Knippers, R. (1986) Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J Mol Biol*, **189**, 189-204.
Sondermann, H., Soisson, S.M., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J. (2003) Tandem histone folds in the structure of the N-terminal segment of the ras activator Son of Sevenless. *Structure*, **11**, 1583-1593.
Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 435-459.

Stoler, S., Keith, K.C., Curnick, K.E. and Fitzgerald-Hayes, M. (1995) A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev*, **9**, 573-586.

Stopka, T. and Skoultchi, A.I. (2003) The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14097-14102.

Strahl, B.D., Briggs, S.D., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Koh, S.S., Ma, H., Cook, R.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Stallcup, M.R. and Allis, C.D. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr Biol*, **11**, 996-1000.

Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J. and Jackson, S.P. (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, **123**, 1213-1226.

Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O. and Winston, F. (2000) Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3364-3369.

Sun, Z.W. and Allis, C.D. (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, **418**, 104-108.

Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J. and Luger, K. (2000) Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat Struct Biol*, **7**, 1121-1124.

Svoboda, P., Stein, P., Anger, M., Bernstein, E., Hannon, G.J. and Schultz, R.M. (2004) RNAi and expression of retrotransposons MuERV-L and IAP in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, **269**, 276-285.

Symer, D.E., Connelly, C., Szak, S.T., Caputo, E.M., Cost, G.J., Parmigiani, G. and Boeke, J.D. (2002) Human l1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell*, **110**, 327-338.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, **116**, 51-61.

Tanphaichitr, N., Sobhon, P., Taluppeth, N. and Chalermisarachai, P. (1978) Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res*, **117**, 347-356.

Taverna, S.D., Coyne, R.S. and Allis, C.D. (2002) Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell*, **110**, 701-711.

Thoma, F., Koller, T. and Klug, A. (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*, **83**, 403-427.

Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C. and et al. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, **269**, 230-234.

Torres, R., Kühn, R. (1997) Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting. *Oxford Univ. Press., Oxford.*

Toth, K.F., Mazurkiewicz, J. and Rippe, K. (2005) Association states of nucleosome assembly protein 1 and its complexes with histones. *J Biol Chem*, **280**, 15690-15699.

Trewick, S.C., McLaughlin, P.J. and Allshire, R.C. (2005) Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep*, **6**, 315-320.

Trostle-Weige, P.K., Meistrich, M.L., Brock, W.A., Nishioka, K. and Bremer, J.W. (1982) Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis. *J Biol Chem*, **257**, 5560-5567.

Tsanev, R. and Tsaneva, I. (1986) Molecular organization of chromatin as revealed by electron microscopy. *Methods Achiev Exp Pathol*, **12**, 63-104.

Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P. and Hansen, J.C. (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol*, **18**, 4629-4638.

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, **439**, 811-816.

Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A. and Osley, M.A. (2005) Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in Saccharomyces cerevisiae. *Nature*, **438**, 379-383.

Tsumura, A., Hayakawa, T., Kumaki, Y., Takebayashi, S., Sakaue, M., Matsuoka, C., Shimotohno, K., Ishikawa, F., Li, E., Ueda, H.R., Nakayama, J. and Okano, M. (2006) Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells*, **11**, 805-814.

Tulin, A., Stewart, D. and Spradling, A.C. (2002) The Drosophila heterochromatic gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development. *Genes Dev*, **16**, 2108-2119.

Turner, J.M., Aprelikova, O., Xu, X., Wang, R., Kim, S., Chandramouli, G.V., Barrett, J.C., Burgoyne, P.S. and Deng, C.X. (2004) BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol*, **14**, 2135-2142.

Turner, J.M., Burgoyne, P.S. and Singh, P.B. (2001) M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *J Cell Sci*, **114**, 3367-3375.

Ueda, T., Abe, K., Miura, A., Yuzuriha, M., Zubair, M., Noguchi, M., Niwa, K., Kawase, Y., Kono, T., Matsuda, Y., Fujimoto, H., Shibata, H., Hayashizaki, Y. and Sasaki, H. (2000) The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells*, **5**, 649-659.

van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B. and Gasser, S.M. (2004) Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell*, **119**, 777-788.

van Daal, A. and Elgin, S.C. (1992) A histone variant, H2AvD, is essential in Drosophila melanogaster. *Mol Biol Cell*, **3**, 593-602.

Van Hooser, A.A., Ouspenski, II, Gregson, H.C., Starr, D.A., Yen, T.J., Goldberg, M.L., Yokomori, K., Earnshaw, W.C., Sullivan, K.F. and Brinkley, B.R. (2001) Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J Cell Sci*, **114**, 3529-3542.

van Roijen, H.J., Ooms, M.P., Spaargaren, M.C., Baarends, W.M., Weber, R.F., Grootegoed, J.A. and Vreeburg, J.T. (1998) Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum Reprod*, **13**, 1559-1566.

Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell*, **87**, 95-104.

Waddington, C.H. (1942) The epigenotype. *Endeavour*, **1**, 18-20.

Walsh, C.P., Chaillet, J.R. and Bestor, T.H. (1998) Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*, **20**, 116-117.

Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R.G. and Zhang, Y. (2003) mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell*, **12**, 475-487.

Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P. and Zhang, Y. (2001a) Methylation of histone

H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, **293**, 853-857.

Wang, J., Mager, J., Chen, Y., Schneider, E., Cross, J.C., Nagy, A. and Magnuson, T. (2001b) Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. *Nat Genet*, **28**, 371-375.

Wang, Z., Zhai, W., Richardson, J.A., Olson, E.N., Meneses, J.J., Firpo, M.T., Kang, C., Skarnes, W.C. and Tjian, R. (2004) Polybromo protein BAF180 functions in mammalian cardiac chamber maturation. *Genes Dev*, **18**, 3106-3116.

Wang, Z.Q., Stingl, L., Morrison, C., Jantsch, M., Los, M., Schulze-Osthoff, K. and Wagner, E.F. (1997) PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev*, **11**, 2347-2358.

Warnecke, P.M., Mann, J.R., Frommer, M. and Clark, S.J. (1998) Bisulfite sequencing in preimplantation embryos: DNA methylation profile of the upstream region of the mouse imprinted H19 gene. *Genomics*, **51**, 182-190.

Wattanaseree, J. and Svasti, J. (1983) Human testis-specific histone TH2B: fractionation and peptide mapping. *Arch Biochem Biophys*, **225**, 892-897.

Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haase, M., Lam, W.L. and Schubeler, D. (2005) Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*, **37**, 853-862.

Whetstine, J.R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., Colaiacovo, M. and Shi, Y. (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*, **125**, 467-481.

Wigler, M., Levy, D. and Perucho, M. (1981) The somatic replication of DNA methylation. *Cell*, **24**, 33-40.

Winston, F. and Carlson, M. (1992) Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet*, **8**, 387-391.

Wirbelauer, C., Bell, O. and Schubeler, D. (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**, 1761-1766.

Wolffe, A.P., Khochbin, S. and Dimitrov, S. (1997) What do linker histones do in chromatin? *Bioessays*, **19**, 249-255.

Wong, A.K. and Rattner, J.B. (1988) Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucleic Acids Res*, **16**, 11645-11661.

Woodcock, C.L. (2006) Chromatin architecture. *Curr Opin Struct Biol*, **16**, 213-220.

Worcel, A., Han, S. and Wong, M.L. (1978) Assembly of newly replicated chromatin. *Cell*, **15**, 969-977.

Wu, R.S. and Bonner, W.M. (1981) Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell*, **27**, 321-330.

Wu, R.S., Tsai, S. and Bonner, W.M. (1982) Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell*, **31**, 367-374.

Wutz, A. and Jaenisch, R. (2000) A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell*, **5**, 695-705.

Wutz, A., Rasmussen, T.P. and Jaenisch, R. (2002) Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA. *Nat Genet*, **30**, 167-174.

Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., Wu, C. and Allis, C.D. (2006) A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, **442**, 86-90.

Xu, N., Tsai, C.L. and Lee, J.T. (2006) Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science*, **311**, 1149-1152.

Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J. and Wang, W. (1998) NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*, **2**, 851-861.

Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319-324.

Ye, J., Ai, X., Eugeni, E.E., Zhang, L., Carpenter, L.R., Jelinek, M.A., Freitas, M.A. and Parthun, M.R. (2005) Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly. *Mol Cell*, **18**, 123-130.

Yoder, J.A., Soman, N.S., Verdine, G.L. and Bestor, T.H. (1997) DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol*, **270**, 385-395.

Yoshii, T., Kuji, N., Komatsu, S., Iwahashi, K., Tanaka, Y., Yoshida, H., Wada, A. and Yoshimura, Y. (2005) Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol Hum Reprod*, **11**, 677-681.

Yu, M.C., Lamming, D.W., Eskin, J.A., Sinclair, D.A. and Silver, P.A. (2006) The role of protein arginine methylation in the formation of silent chromatin. *Genes Dev*, **20**, 3249-3254.

Yu, Y.E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C.R., Deng, J.M., Russell, L.D., Weil, M.M., Behringer, R.R. and Meistrich, M.L. (2000) Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4683-4688.

Zalensky, A.O., Siino, J.S., Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Tomilin, N.V., Yau, P. and Bradbury, E.M. (2002) Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem*, **277**, 43474-43480.

Zalensky, A.O., Tomilin, N.V., Zalenskaya, I.A., Teplitz, R.L. and Bradbury, E.M. (1997) Telomere-telomere interactions and candidate telomere binding protein(s) in mammalian sperm cells. *Exp Cell Res*, **232**, 29-41.

Zhang, H., Roberts, D.N. and Cairns, B.R. (2005a) Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, **123**, 219-231.

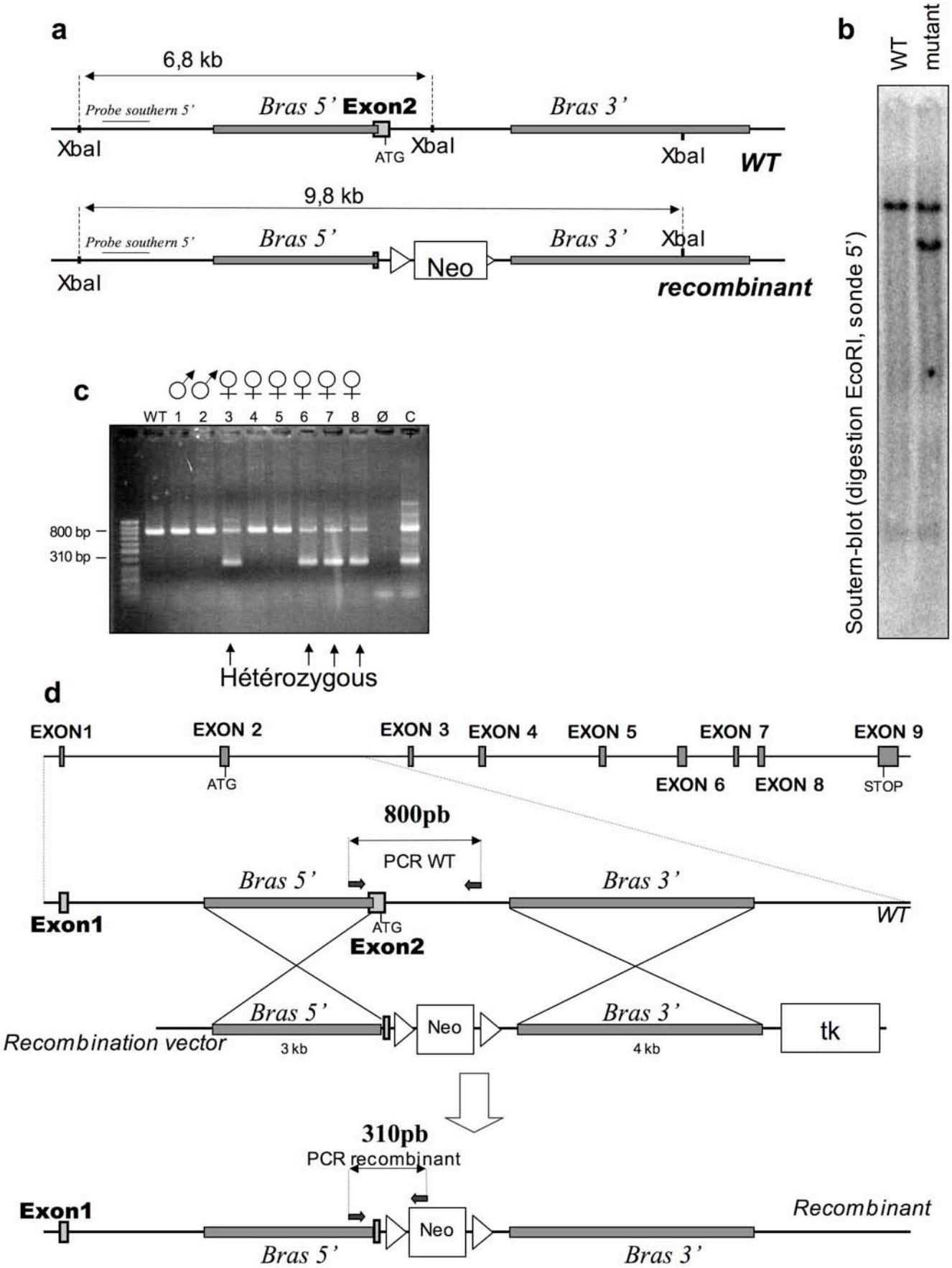
Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., Pehrson, J.R., Berger, J.M., Kaufman, P.D. and Adams, P.D. (2005b) Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell*, **8**, 19-30.

Zhao, M., Shirley, C.R., Mounsey, S. and Meistrich, M.L. (2004) Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol Reprod*, **71**, 1016-1025.

Zhao, M., Shirley, C.R., Yu, Y.E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., Deng, J.M., Arango, N.A., Terry, N.H., Weil, M.M., Russell, L.D., Behringer, R.R. and Meistrich, M.L. (2001) Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol*, **21**, 7243-7255.

Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., Travers, A. and Muyldermans, S. (1998) Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature*, **395**, 402-405.

V. Annexe


a
6,8 kb
Probe southern 5'
Bras 5' Exon2
Bras 3'
XbaI
ATG
XbaI
XbaI
WT
9,8 kb
Probe southern 5'
Bras 5'
Neo
Bras 3'
XbaI
XbaI
recombinant
b
WT
mutant
Soutern-blot (digestion EcoRI, sonde 5')
c
WT 1 2 3 4 5 6 7 8 Ø C
800 bp
310 bp
Hétérozygous
d
EXON1
EXON 2
EXON 3
EXON 4
EXON 5
EXON 7
EXON 9
ATG
EXON 6
EXON 8
STOP
800pb
PCR WT
Bras 5'
Bras 3'
Exon1
ATG
Exon2
WT
Bras 5'
Neo
Bras 3'
tk
Recombination vector
3 kb
4 kb
310pb
PCR recombinant
Exon1
Neo
Recombinant
Bras 5'
Bras 3'

ANNEXE : STRATEGIES DE *SCREENING*

a. Stratégie du Southern-blot

Le remplacement d'une partie de l'exon 2 par la casette Neo, entraine la supression du site de restriction XbaI en aval de l'exon 2. Suite à la digestion par l'enzyme XbaI, l'utilisation d'une sonde située en amont du bras de recombinaison 5', permet la détection d'un fragment de 6,8 kb pour l'allèle WT. Alors que l'allèle recombiné produit un fragment de 9,8 kb après digestion par XbaI.

b. Southern-blot

10 µg d'ADN génomique total ont été digérés par XbaI, puis sépérés sur un gel d'agarose 0,8 %. Après transfert par capillarité, la détection a été réalisée au moyen d'une sonde d'ADN radiomarquée située en amont de l'exon 2.

c. PCR de génotypage

Le génotype des progénitures issues de croisement entre animaux hétérozygotes a été déterminé grâce à la PCR dont la stratégie est décrite en d.. Après amplification, le produit de la PCR a été séparé sur un gel d'agarose à 2 %. La détctection a été réalisée en traitant le gel au bromure d' éthidium.

d. Stratégie de la PCR de génotypage

La réaction de PCR est effectuée en présence de trois oligonucléotides simultanément.

L'oligonucléotide sens situé dans le bras de recombinaisont 5' associé à l'oligonucléotide anti-sens situé dans la partie recombinée de l'intron 2-3 premet l'amplification d'un fragment de 800 pb. La séquence sur laquelle s'aparie l'oligonucléotide anti-sens étant absente de l'allèle recombiné, ce couple d'oligonucléotides permet exclusivement la détection de l'allèle WT.

L'oligonucléotide sens, associé à un oligonucléotide anti-sens situé dans la séquence neo abouti à l'amplification d'un fragment de 310 pb. La séquence néo n'étant présente que sur l'allèle recombiné, ces deux oligonucléotides amplifie seulement l'allèle recombiné.

Lorsque l'ADN provient d'un animal de génotype WT, la PCR avec les trois oligonucléotides aboutie à l'amplification d'un unique fragment de 800pb. Un animal de génotype hétérozygote donnera un ragment de 800 pb et un fragment de 310 pb. Un animal de génotype homozygote donnera l'amplifaication d'un fragment unique de 310 pb.