



HAL
open science

ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE CHAPERON D'HISTONES ASF1

Morgane Agez

► **To cite this version:**

Morgane Agez. ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE CHAPERON D'HISTONES ASF1. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT: . tel-00268886

HAL Id: tel-00268886

<https://theses.hal.science/tel-00268886v1>

Submitted on 1 Apr 2008

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.

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Inter//Bio

Présentée par
Morgane AGEZ

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE
DE LA PROTEINE CHAPERON D'HISTONES ASF1

Soutenue le 31 mars 2008

Devant le jury composé de :

Directrice de thèse : Dr. Françoise OCHSENBEIN

Rapporteurs : Dr. Françoise GUERLESQUIN
Dr. Céline LANDON

Examineurs : Pr. Philippe BOUVET
Pr. Olivier LEQUIN

Sommaire

Sommaire	1
Liste des abréviations	5
Chapitre 1 : Introduction générale	7
1.1. Préambule.....	9
2. La chromatine.....	11
2.1. Les histones : constituants de la chromatine	11
2.2. Le nucléosome	13
2.3. La dynamique chromatinienne.....	15
2.4. Les processus nucléaires dans le contexte de la chromatine	25
3. Biologie structurale des protéines interagissant avec les histones.....	35
3.1. Domaines de liaison de la queue N-Terminale des histones.....	35
3.2. Les protéines chaperon d'histones.....	43
4. Asf1 : une protéine chaperon d'histone (H3/H4) multifonctionnelle.....	53
4.1. Asf1 : un chaperon d'histones au statut particulier	54
4.2. Rôle de Asf1 lors de la réplication.....	54
4.3. Asf1 et la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN	56
4.4. Rôle de Asf1 dans le maintien du silencing au sein de l'hétérochromatine.....	59
4.5. Rôle d'Asf1 dans la régulation de la transcription.....	60
5. Objectif et stratégie	62
Chapitre 2 : Méthodologie RMN	65
1. Introduction.....	67
2. Cartographie de la région d'interaction.....	67
3. Stratégie d'attribution des signaux ^1H , ^{15}N et ^{13}C du squelette peptidique d'une protéine	68
4. Les déplacements chimiques en RMN et structure secondaire.....	73
5. Stratégie d'attribution des signaux ^{13}C et ^1H des chaînes latérales d'une protéine.....	74
6. Stratégie de modélisation moléculaire à partir des données RMN.....	75
6.1. Détermination de distances intra-moléculaires.....	76
6.2. Détermination de distances inter-moléculaires.....	77
6.3. Modélisation moléculaire.....	83

Chapitre 3 : Caractérisation structurale du complexe Asf1/(H3/H4)	85
1. Introduction.....	87
2. Caractérisation structurale du complexe Asf1/(H3/H4).....	87
2.1. Stratégie	87
2.2. Production du peptide H3(122-135) uniformément marqué ¹⁵ N ou ¹³ C/ ¹⁵ N.....	87
2.3. Etude du peptide H3 (122-135) seul.....	90
2.4. Optimisation des conditions expérimentales en vue de l'étude structurale du complexe Asf1/(H3/H4).....	93
2.5. Etude du peptide H3 (122-135) en interaction avec hAsf1.....	94
2.6. Détermination des distances intra- et inter-moléculaires du complexe Asf1(1-156)/H3(122-135)	98
2.7. Détermination des distances intra-moléculaires de Asf1(1-156) en interaction avec H3 (122-135)	101
2.8. Détermination des distances inter-moléculaires du complexe Asf1(1-156)/H3(122-135).....	103
2.9. Modélisation moléculaire du complexe Asf1 (1-156)/ H3(122-135).....	108
2.10. Modélisation du complexe hAsf1(1-156)/(H3/H4).....	113
3. Etude fonctionnelle de l'interaction Asf1/(H3/H4) <i>in vivo</i>	116
3.1. Conception de mutants.....	116
3.2. Validation des mutants.....	117
3.3. Rôle biologique de l'interaction Asf1/(H3/H4).....	120
4. Discussion.....	125
4.1. Aspects structuraux.....	126
4.2. Implication sur la caractérisation de la région d'interaction des chaperons d'histones avec leur cible	130
4.3. Implication sur les mécanismes d'assemblage et de désassemblage de la chromatine	132
4.4. Implication biologique de la fonction chaperon d'histone d'Asf1.....	134
Chapitre 4 : Etude du mode d'action du chaperon d'histone Asf1	137
1. Introduction.....	139
2. Stratégie.....	139
3. Mécanisme de désassemblage de nucléosomes par Asf1.....	142
4. Mécanisme d'assemblage de nucléosomes par Asf1	145
4.1. Conditions expérimentales.....	145
4.2. Etude du mécanisme d'assemblage d'octamères d'histones en présence d'Asf1.....	147
4.3. Etude de l'assemblage de tétramères d'histones sur l'ADN en présence d'Asf1	151
5. Discussion.....	154

Chapitre 5 : Conception d'inhibiteurs spécifiques de l'interaction Asf1/(H3/H4).....	157
1. Introduction.....	159
2. Etude préliminaire de faisabilité.....	159
3. Conception d'inhibiteurs peptidiques de l'interaction Asf1/(H3/H4).....	160
3.1. Stratégie	160
3.2. Augmentation de la solubilité du peptide H4.....	162
3.3. Stabilisation des éléments de structure secondaire	163
3.4. Optimisation de la boucle entre les épitopes des histones H3 et H4.....	164
4. Affinité des inhibiteurs potentiels pour la protéine Asf1.....	165
4.1. Affinité du peptide H3 seul pour Asf1	166
4.2. Affinité pour Asf1 des peptides chimères optimisés.....	168
5. Conclusion et perspectives	170
Chapitre 6 : Conclusions et perspectives	173
Chapitre 7 : Matériels et méthodes.....	179
1. Méthodologie d'obtention des protéines recombinantes	181
1.1. Introduction.....	181
1.2. Expression, purification et marquage des protéines recombinantes.....	182
2. Mesure de l'affinité pour Asf1 des peptides inhibiteurs de l'interaction Asf1-histones par microcalorimétrie (ITC- <i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)	186
3. Méthodologie utilisée pour l'étude des fonctions d' <i>hAsf1A</i>	187
3.1. Préparation des mini-cercles d'ADN marqué au ³² P (Prunell et al., 1999)	187
3.2. Méthode de reconstitution de nucléosomes et de tétrasomes : le « salt-jump »	189
3.3. Méthode de désassemblage des nucléosomes et tétrasome par <i>hAsf1A</i>	191
3.4. Méthode d'assemblage des nucléosomes et tétrasome par <i>hAsf1A</i>	191
3.5. Réaction de pontage des tétramères d'histones (H3/H4) ₂	191
Publications	193
Bibliographie.....	Erreur ! Signet non défini.

Liste des abréviations

ADN	=	Acide Désoxyribonucléique
ARIA	=	Ambiguous Restraints
Asf1	=	Anti-silencing function 1
ATP	=	Adénosine Tri-Phosphate
BET	=	Bromure d'Ethidium
CAF-1	=	Chromatin Assembly Factor 1
CPM	=	Coup Par Minute
CPT	=	CamPTothésine
dNTP	=	deoxy-Nucleotide Tri-Phosphate
DSB	=	Double Strand Break
DTNB	=	acide 5-5'-dithiobis(2-nitro)benzoïque
DTT	=	DiThioThréitol
EDTA	=	Ethylen Diamine Tetra-Acetic acid
GFP	=	Green Fluorescent Protein
GST	=	Glutathion S-Tranférase
GSH	=	Glutathion réduit
HIRA	=	Histone Independent Replication Assembly
HU	=	Hydroxyurée
IPTG	=	IsoPropylThioGalactopyranoside
MCM	=	MiniChromosome Maintenance
MMS	=	Méthyl Méthane Sulfonate
NAP-1	=	Nucleosome Assembly Protein 1
NOESY	=	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RMSD	=	Root Mean Square Deviation
PDB	=	Protein Data Bank
PCNA	=	Proliferating Cell Nuclear Antigen
RMN	=	Resonance Magnétique Nucléaire

SDS-PAGE	=	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SHL	=	Super Helix Location
TE	=	Tris-EDTA
UV	=	Ultra-Violet
WT	=	Wild-Type

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1. Préambule

Pour stocker environ 1m d'ADN dans 10µm de noyau, les cellules eucaryotes ont leur ADN compacté sous la forme de chromatine. Cette structure protège l'ADN des agressions oxydantes et a un rôle essentiel dans la régulation des processus nucléaires. Elle se caractérise par deux domaines visibles au microscope : l'euchromatine et l'hétérochromatine (Figure 1-1). Alors que l'euchromatine est une chromatine transcriptionnellement active, l'hétérochromatine, plus compacte, est une chromatine transcriptionnellement inactive.

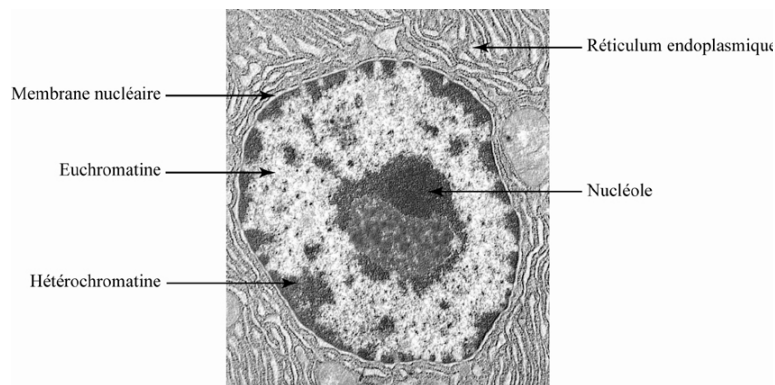


Figure 1-1 : Noyau d'une cellule à l'interphase du cycle cellulaire.

Image obtenue par cryo-microscopie. Lors de l'interphase, les chromosomes sont sous forme de chromatine. La chromatine est répartie en deux structures distinctes visibles sur cette image. Les zones sombres sont constituées d'hétérochromatine, chromatine extrêmement compacte et non transcrite, et les zones claires sont constituées d'euchromatine, chromatine moins dense et transcriptionnellement active. Les différents domaines sont indiqués sur la figure.

Ces structures chromatiniennes sont constituées pour 1/3 d'ADN, 1/3 de protéines appelées histones et 1/3 de protéines autres que les histones. L'ensemble de ces protéines sert d'aide et de support à l'ADN pour qu'il puisse passer d'états extrêmement condensés, comme par exemple le chromosome mitotique, à des états plus ouverts tel que l'euchromatine.

Les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment avec l'ADN un complexe ADN-protéine appelé nucléosome, il s'agit du premier état de compaction de l'ADN. Une cinquième histone, l'histone H1 permet le passage à un deuxième niveau de compaction, appelé fibre de 30nm. Cette fibre peut alors former des boucles de 300nm qui, sous forme extrêmement condensée, vont former le chromosome mitotique (**Figure 1-2**)

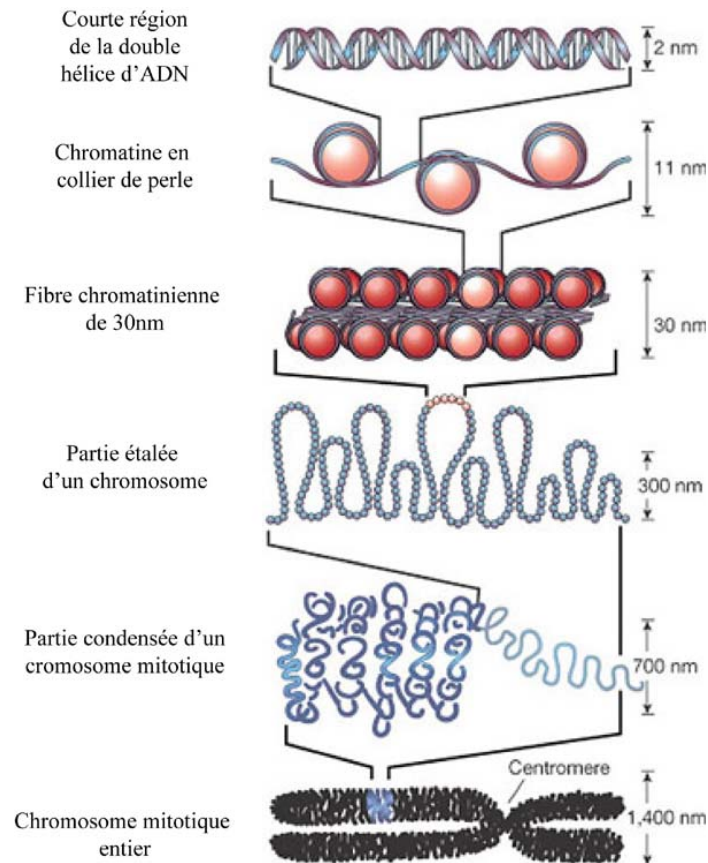


Figure 1-2 : Les différents niveaux d'organisation de la chromatine.

Bien que la chromatine et les nucléosomes soient connus depuis un certain nombre d'années, ce n'est que récemment que des informations sur leurs modes de régulation et sur leurs fonctions biologiques ont été obtenues. La chromatine fait actuellement l'objet de nombreuses recherches et, régulièrement, des découvertes importantes apportent de nouvelles données sur sa dynamique et son rôle biologique.

Le travail de thèse présenté ici s'intéresse plus particulièrement aux mécanismes moléculaires de formation de la chromatine et à ses implications biologiques. Le point de départ de cette étude est la caractérisation structurale d'un complexe protéique intervenant dans l'assemblage des nucléosomes. Deux aspects sont présents dans ce travail, l'un structural et l'autre fonctionnel.

L'introduction s'attache à éclairer ces deux aspects. La première partie décrit les différents composants de la chromatine et présente les modes de régulation de celle-ci. La deuxième partie décrit en quoi la détermination structurale de protéines associées à la chromatine apporte des informations essentielles dans la compréhension de ces mécanismes. Enfin, la troisième partie introduit en détail la protéine au cœur de l'assemblage du nucléosome et au centre de cette étude : Asf1.

2. La chromatine

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Celui-ci est constitué d'un cœur d'histones autour desquelles s'enroule l'ADN. Dans ce chapitre, nous nous attacherons tout d'abord à décrire les caractéristiques des histones. Nous décrirons ensuite la structure du nucléosome. Puis, nous nous intéresserons aux aspects dynamiques de la chromatine et en particulier aux modes de régulation de la structure chromatinienne dans les processus nucléaires tels que la réplication, la transcription et la réparation. Enfin, nous évoquerons les dysfonctionnements de la chromatine qui peuvent aboutir au développement de cellules cancéreuses.

2.1. Les histones : constituants de la chromatine

Les histones sont des protéines très conservées dans tous les organismes eucaryotes et sont composées d'environ 120 résidus. Les histones, représentées sur la Figure 1-3, contiennent deux domaines distincts : une région représentant un repliement globulaire et une extrémité N-terminale non structurée en solution et contenant majoritairement des résidus basiques. Le domaine globulaire, appelé « histone fold », présente un repliement caractéristique que l'on retrouve également dans d'autres protéines et certains facteurs de transcription (Gangloff, et al., 2000). Il est formé de trois hélices α reliées par deux boucles. Ce domaine globulaire, impliqué dans les interactions histone-histone et histone-ADN, garantit la stabilité de la particule nucléosomale.

Selon les espèces, il existe plusieurs isoformes des histones. Par exemple, chez l'homme, on retrouve trois isoformes de l'histone H3 (H3.1, H3.3 et CENP-A) et quatre isoformes de l'histone H2A (H2A, H2AX, H2AZ, Macro-H2A) (Figure 1-3-B et C). Alors que les séquences des histones H3.1 (H3) et H3.3 ne se distinguent que par quatre résidus différents situés sur la queue N-Terminale et au niveau de l'hélice α_2 , celle du variant CENP-A (CENtromeric Protein A) présente une plus grande divergence. En effet, sa queue est N-terminale

spécifique à chaque espèce et son domaine « histone fold » ne partage que 60% d'identité de séquence avec l'histone H3.1 (Malik and Henikoff, 2003).

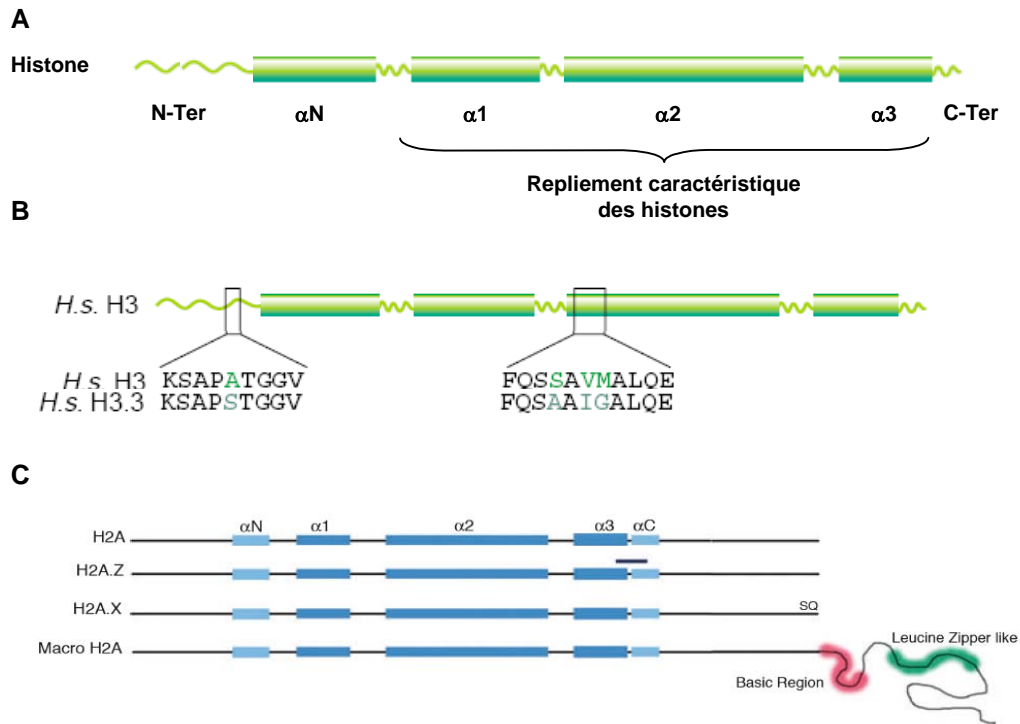


Figure 1-3 Représentation schématique de la structure secondaire des histones.

A) Le repliement caractéristique des histones, ou « histone fold » se compose des trois hélices α (α 1, α 2, α 3) reliées entre elles par des boucles. Le domaine globulaire des histones est impliqué dans de nombreuses interactions histone-histone et histone-ADN qui garantissent la stabilité de la particule nucléosomale. La partie N-terminale des histones est dépliée en solution et majoritairement constituée de résidus basiques pouvant présenter de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces modifications covalentes ont un rôle très important dans la régulation de la flexibilité de la chromatine. Les traits fins et ondulés représentent les parties ne contenant aucun élément de structure secondaire, les rectangles représentent les hélices α . B) Alignement des régions de séquence des deux isoformes H3.1 et H3.3 au niveau de leur divergence. Ces deux histones ne se distinguent que par quatre résidus différents situés sur la queue N-Terminale et au niveau de l'hélice α 2. L'alignement de séquence avec le variant CENP-A n'est pas représenté puisque son domaine « histone fold » ne partage que 60% d'identité de séquence avec l'isoforme H3.1. C) Alignement des isoformes des histones H2A. Le variant d'histone qui possède la séquence la plus éloignée de la forme canonique est macro-H2A. Ce variant possède une queue C-terminale prolongée par une région basique et un domaine « leucine zipper » supposé. Le variant H2A.X possède sur sa partie C-terminale une sérine qui peut être phosphorylée lorsqu'elle se trouve à proximité d'un dommage de l'ADN. Le variant H2A.Z possède quant-à lui un patch acide qui stabilise le nucléosome et se retrouve souvent au niveau des promoteurs des gènes.

Les variants de l'histone H2A présentent une plus grande diversité que ceux de l'histone H3. Le variant d'histone qui possède la séquence la plus éloignée de la forme canonique est macro-H2A. Ce variant possède une queue C-terminale prolongée par une région basique et un domaine prédit pour former « leucine zipper ». Le variant H2A.X possède sur sa partie C-terminale une sérine qui peut être phosphorylée lorsqu'elle se trouve à proximité d'un dommage de l'ADN. Le variant H2A.Z possède quant-à lui un patch acide qui stabilise le nucléosome et se retrouve souvent au niveau des promoteurs des gènes.

De façon générale, deux classes d'histones peuvent alors être distinguées : les histones canoniques, synthétisées et assemblées en nucléosome lors de la réplication (H3.1, H4, H2A, H2B) et les variants d'histones, synthétisés et déposés sur l'ADN indépendamment de la réplication (H3.3, CENPA, H2AZ, H2AX, macro-H2A).

2.2. Le nucléosome

La Figure 1-4 représente la structure haute résolution d'un nucléosome déterminé par radiocristallographie en 1997 à une résolution de 2,8Å (Luger, et al., 1997). La particule nucléosomale se compose de 146 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un cœur de 8 histones soit deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. Il s'agit de l'octamère d'histones. Au sein du nucléosome, l'octamère d'histones peut se décomposer en deux sous-complexes formés d'un tétramère d'histones (H3/H4)₂ et de deux dimères d'histones (H2A/H2B), illustrés sur la Figure 1-5. Les deux dimères (H3/H4) interagissent entre eux par un faisceau d'hélices impliquant les histones H3-H3' pour former le tétramère (H3/H4)₂. Chaque dimère (H2A/H2B) interagit avec le tétramère (H3/H4)₂ par l'intermédiaire d'un autre faisceau d'hélices impliquant les histones H2B et H4. Le tétramère (H3/H4)₂ forme la région centrale du nucléosome alors que les dimères (H2A/H2B) se trouvent vers l'extérieur du nucléosome. Le nucléosome peut être verrouillé par l'addition de l'histone H1 non présente dans la structure cristallographique du nucléosome.

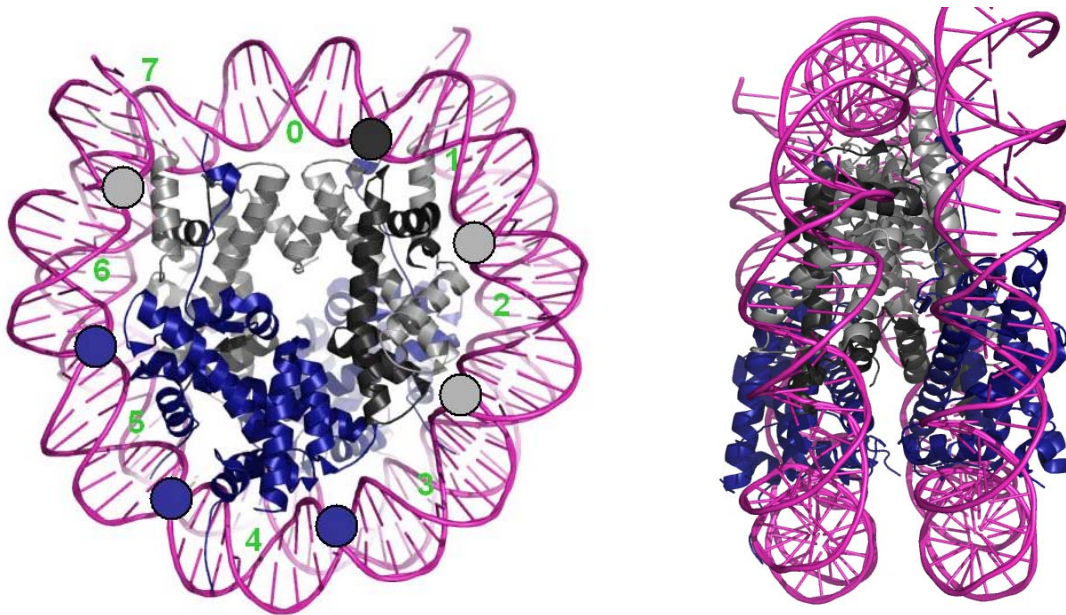


Figure 1-4 : Structure du nucléosome de face et de côté.

La particule nucléosomale est constituée de 146 paires de bases d'ADN, représentées en magenta, qui forment deux tours d'hélice autour de l'octamère d'histones. Les 8 histones sont représentées par des rubans en gris clair et gris foncé respectivement pour H3 et H4 et en bleu foncé pour H2A et H2B. La numérotation de 1 à 7 indique les grands sillons de l'ADN qui font face aux histones. Les cercles indiquent la localisation des résidus basiques des histones qui interagissent avec l'ADN au niveau des petits sillons de la double hélice. La couleur de chaque cercle correspond à celle de l'histone impliquée dans l'interaction avec l'ADN. A gauche le nucléosome est représenté de face, à droite, le nucléosome est représenté de profil.

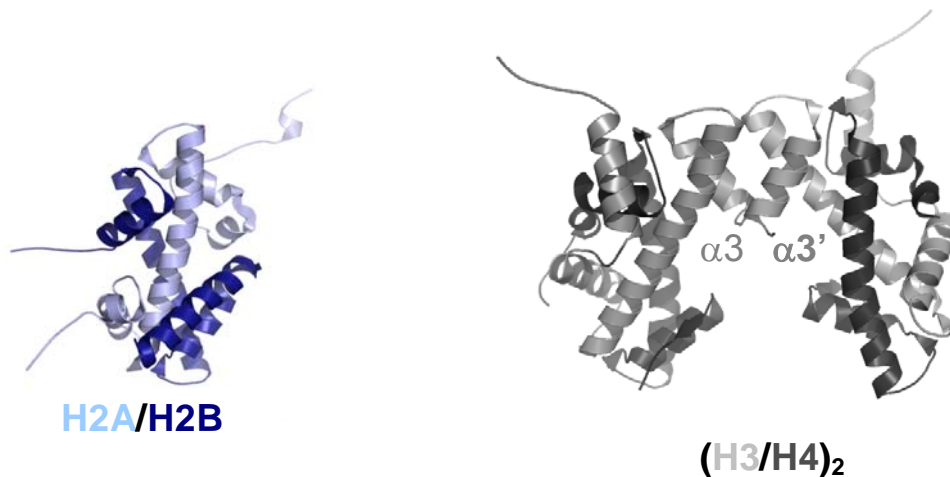


Figure 1-5 : Structures du dimère (H2A/H2B) et du tétramère (H3/H4)₂

Représentation schématique d'un dimère d'histones (H2A/H2B) et d'un tétramère (H3/H4)₂ respectivement en bleu clair/bleu foncé et en gris clair/ gris foncé. Les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 3'$, des histones respectives H3 et H3', impliquées dans la formation du tétramère sont indiquées.

Les points de contact histones-ADN impliquent des arginines qui s'intercalent dans le petit sillon de l'ADN tous les 10 paires de bases environ. Ces points de contact privilégiés sont appelés « Super Helix Location » (SHL) et sont numérotés de -6,5 à +6,5. Les sept SHLs des positions 0.5 à 6.5 sont représentés par des ronds sur la Figure 1-4. Les SHLs -6,5 et +6,5 occupent une position particulière car ils se situent aux points d'entrée et de sortie de l'ADN qui forment le nucléosome. Les histones n'interagissent pas avec les nucléotides de l'ADN mais avec le squelette phosphodiester de celui-ci. Cette spécificité permet au nucléosome de se positionner indépendamment de la séquence de l'ADN. Pourtant, si l'on regarde plus en détail la structure du nucléosome (Figure 1-4), on constate que la présence d'un nucléosome induit une certaine courbure au niveau des bases de l'ADN que seules certaines séquences peuvent adopter. Il existe donc une certaine sélectivité des nucléosomes pour des séquences d'ADN. Cette particularité peut être mise à profit pour construire des séquences d'ADN avec un nombre déterminé de sites favorables à la formation de nucléosomes. Ces séquences sont dites « positionnantes » et ont été utilisées pour l'étude de nombreuses caractérisations des nucléosomes *in vitro* (Pina, et al., 1990; Thastrom, et al., 1999).

Contrairement au domaine globulaire de chaque histone, impliqué dans des interactions qui stabilisent le nucléosome, les extrémités N-terminales des histones sont situées à l'extérieur de la particule nucléosomale et sont les sites principaux de modifications post-traductionnelles impliquées dans la régulation de la flexibilité de la chromatine

2.3. La dynamique chromatinienne

La formation de la chromatine peut se découper en deux étapes principales (illustrées sur la Figure 1-6) : L'assemblage du nucléosome, processus qui ne nécessite pas l'hydrolyse de l'ATP (ATP-indépendant), puis son organisation en structure de plus en plus compacte par des processus qui mettent en jeu l'hydrolyse de l'ATP (ATP-dépendant), il s'agit du remodelage de la chromatine.

L'assemblage et le remodelage de la chromatine sont finement régulés par de nombreux facteurs. L'assemblage des nucléosomes est gouverné par les protéines chaperon d'histones. Le remodelage de la chromatine est quant-à lui assuré par des facteurs de remodelage qui utilisent l'ATP et qui sont capables de reconnaître des modifications post-traductionnelles

spécifiques sur les queues N-terminales des histones. Ces points sont abordés dans la suite de cette section.

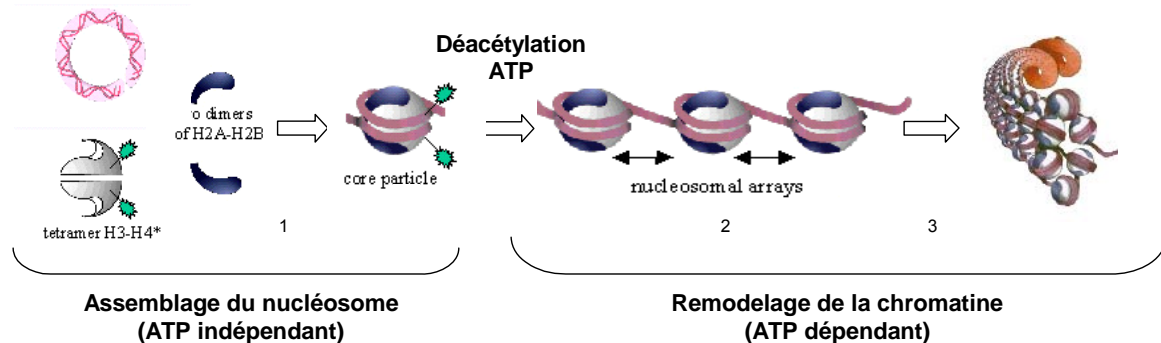


Figure1-6 : Etapes de remodelage de la chromatine.

L'ADN est en rose, le tétramère d'histone H3-H4 en gris, le dimère H2A-H2B en bleu. Le groupement acétyle est représenté en vert. (1) assemblage du nucléosome, (2) et (3) remodelage de la chromatine.

2.3.1. Les chaperons d'histones essentiels à l'assemblage du nucléosome

Les histones sont des protéines très chargées positivement, elles ont donc fortement tendance à interagir de façon non spécifique avec des molécules chargées négativement. Pour éviter cela *in vivo*, lorsque les histones ne sont pas associées à l'ADN, elles interagissent avec des protéines appelées chaperons d'histones. Ils ont la capacité d'assembler et/ou de désassembler le nucléosome mais n'appartiennent pas au complexe final, c'est pourquoi la terminologie de chaperon est utilisée. Ils empêchent le mauvais repliement des histones ainsi que leurs interactions non souhaitées avec d'autres facteurs. De part leur interaction spécifique avec les histones, les protéines chaperons sont impliquées dans le stockage, le transport et le transfert des histones d'un complexe à l'autre selon les besoins cellulaires. Les chaperons d'histones jouent donc un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN.

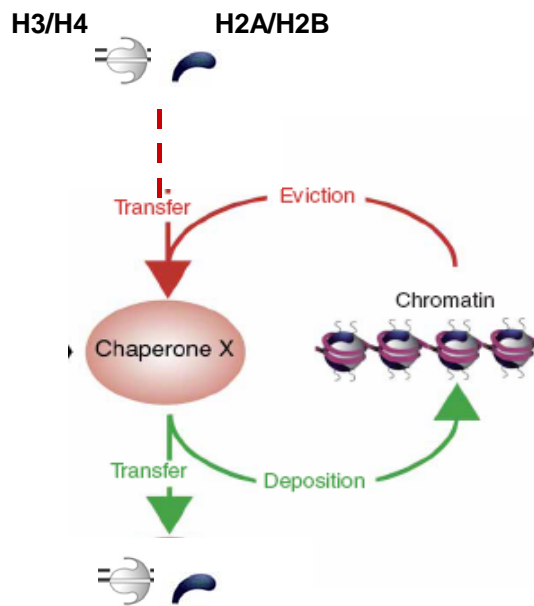


Figure 1-7 : Fonctions des chaperons d'histones dans le noyau cellulaire.

Représentation schématique de la prise en charge des histones par les chaperons d'histones. Ceux-ci favorisent le transfert des histones d'un complexe protéique vers l'autre en fonction des besoins cellulaires. Cette fonction est représentée par des flèches rouges lorsque les histones sont prises en charge par les chaperons d'histones et par des flèches vertes lorsque les histones sont transférées par les chaperons à un autre complexe protéique. Les chaperons d'histones permettent également le dépôt et l'éviction des histones des nucléosomes. La chromatine est représentée ici en « collier de perle », l'ADN est représenté par un ruban rose, les dimères d'histones (H2A/H2B) en bleu et les tétramères d'histones (H3/H4)₂ en gris clair.

Un ensemble d'approches menées *in vitro* et *in vivo* a permis d'établir un modèle pour l'assemblage des nucléosomes par les protéines chaperons lors de la réplication (Nakagawa, et al., 2001) (Figure 1-8). La formation de la particule nucléosomale procède en deux étapes. Dans une première étape, les histones H3 et H4 associées en tétramère sont déposées sur l'ADN pour former un tétrasome. Deux chaperons d'histones participent à cette étape, le complexe CAF-1 (Chromatine Assembly Factor 1) et la protéine Asf1 (Anti-Silencing Factor 1) (Mello, et al., 2002; Smith and Stillman, 1989; Tyler, et al., 1999). Dans une deuxième étape, les dimères d'histones (H2A/H2B) sont déposés sur l'ADN par le chaperon NAP-1 (Nucleosome Assembly Protein 1) (Ito, et al., 1996; Park and Luger, 2006).

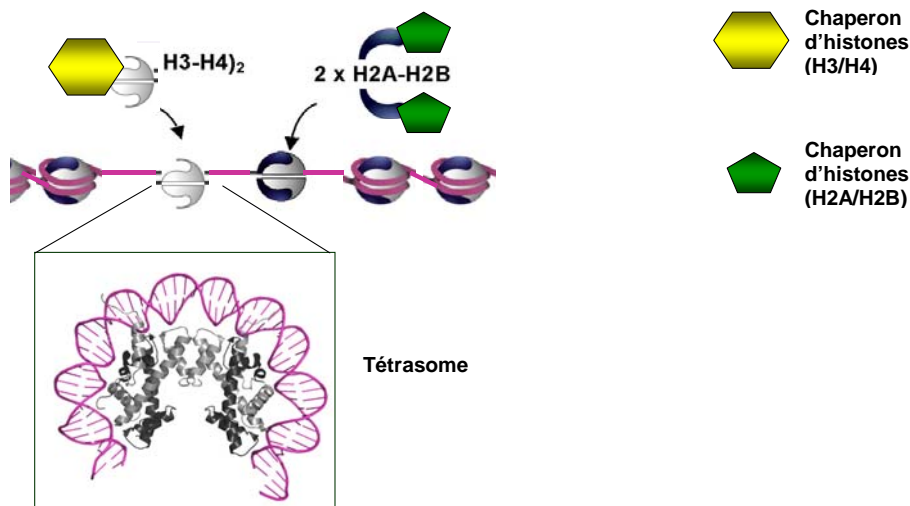


Figure 1-8 : Mécanisme d'assemblage des histones sur l'ADN par les chaperons d'histones.

Dans un premier temps, les chaperons d'histones spécifiques des histones H3/H4 déposent celles-ci sur l'ADN. Cette première étape aboutit à la formation d'un tétrasome constitué uniquement d'un tétramère d'histones (H3/H4)₂ autour duquel sont enroulées environ 55 paires de bases. Dans un deuxième temps, les deux dimères d'histones (H2A/H2B) sont déposés par des chaperons d'histones spécifiques des histones (H2A/H2B). L'ADN est représenté par un ruban rose, les dimères d'histones (H2A/H2B) sont colorés en bleu et les tétramères d'histones (H3/H4)₂ en gris clair.

D'autres chaperons d'histones peuvent intervenir dans des processus indépendants de la réplication (Lorain, et al., 1998; Ray-Gallet, et al., 2002). Par exemple, le chaperon d'histones FACT assemble les histones H2A/H2B lors de la transcription et le chaperon d'histones Hir est connu pour assembler les histones H3/H4 indépendamment de la réplication (Belotserkovskaya and Reinberg, 2004; Formosa, et al., 2002). Il a aussi été montré que Hir se lie à Asf1 pour permettre l'assemblage du nucléosome en dehors de la réplication chez la levure et chez les mammifères (Sharp, et al., 2001; Sharp, et al., 2005). Ainsi, le chaperon d'histone Asf1 intervient dans deux processus d'assemblage du nucléosome, un processus indépendant de la réplication, en synergie avec Hir, et un processus dépendant de la réplication de l'ADN, en synergie avec CAF-1. Notons cependant que dans la levure, Hir et CAF-1 ont une fonction partiellement redondante pour l'assemblage du nucléosome dans ces deux processus (Krawitz, et al., 2002). Ce phénomène n'est pas unique, il semble en effet que si un chaperon est manquant, l'assemblage peut être pris en charge par un autre chaperon.

Comme l'illustre le mécanisme d'assemblage des nucléosomes lors de la réplication, certains chaperons d'histones interagissent préférentiellement avec les histones (H3/H4), d'autres avec (H2A/H2B). En plus de cette spécificité, les chaperons d'histones sont également capables de discriminer entre les différents isoformes d'histones. Cette discrimination pourrait expliquer l'assemblage de variants d'histones sur l'ADN dans des contextes spécifiques. Jusqu'à aujourd'hui, seul le chaperon NAP-1 a été découvert comme participant à l'échange de variants de H2A. Les chaperons d'histones CAF-1 et HIRA interagissent, pour leur part, de façon spécifique respectivement avec les variants d'histones H3.1 et H3.3. Ainsi, le variant H3.3 est déposé sur l'ADN indépendamment de la réplication alors que le variant d'histone H3.1 est assemblé en nucléosome lors de la réplication (Kim, et al., 2007; Krogan, et al., 2003; Kusch, et al., 2004; Loppin, et al., 2005; Mizuguchi, et al., 2004; Sarma and Reinberg, 2005; Tagami, et al., 2004).

Il n'est pourtant pas si simple de déterminer la sélectivité d'un chaperon d'histone pour l'un ou l'autre des couples d'histones. En effet, les expériences menées *in vitro* et *in vivo* apportent parfois des résultats contradictoires. Citons par exemple les travaux de McBryant publiés en 2003 montrant que NAP-1, bien que spécifique des histones H2A/H2B *in vivo*, peut se lier *in vitro* avec le tétramère (H3/H4)₂ (McBryant, et al., 2003).

Les protéines chaperons connues à ce jour sont référencées dans le Tableau 1-1 ainsi que leur sélectivité, leur conservation et leurs principales fonctions biologiques.

Classification of chaperones		Histone chaperones in species of function identification	Histone selectivity	Conservation	Main functions	
Class I: single chaperone	H3-H4	Asf1 (<i>D.m.</i>) ¹²⁶	Both H3.1-H4 & H3.3-H4	<i>S.c.</i> , Asf1; <i>S.p.</i> , Cia1 <i>A.t.</i> , Sga1 & Sga2; <i>D.m.</i> , Asf1; <i>X.l.</i> , Asf1; <i>M.m.</i> , Asf1a & Asf1b; <i>H.s.</i> , Asf1a & Asf1b	Histone donor for CAF-1 and HIRA	
		Fkbp39p (<i>S.p.</i>) ¹²⁷	H3-H4	<i>S.c.</i> , Fpr; <i>S.p.</i> , Fkbp39p	rDNA silencing	
		HIRA (<i>X.l.</i>) ¹¹	H3.3-H4	<i>S.c.</i> , HIR1/HIR2; <i>S.p.</i> , Hip1, Sim2 <i>A.t.</i> , HIRA; <i>D.m.</i> , HIRA; <i>X.l.</i> , HIRA; <i>M.m.</i> , HIRA; <i>H.s.</i> , HIRA	Deposition factor independent of DNA synthesis	
		N1/N2 (<i>X.l.</i>) ¹²⁸	H3-H4 ^b	<i>X.l.</i> , N1/N2; <i>M.m.</i> , tNasp & sNasp; <i>H.s.</i> , tNasp & sNasp	H3-H4 storage in <i>X. laevis</i> oocytes	
		Spt6 (<i>S.c.</i>) ¹²⁹	H3-H4	<i>S.c.</i> , Spt6; <i>S.p.</i> , Spt6 <i>D.m.</i> , Spt6; <i>X.l.</i> , Spt6; <i>M.m.</i> , Spt6; <i>H.s.</i> , Spt6	Transcription initiation & elongation	
	Rtt106 (<i>S.c.</i>) ¹³⁰	H3-H4	<i>S.c.</i> , Rtt106; <i>S.p.</i> , SPAC6G9.03c	Heterochromatic silencing		
	H2A-H2B	Nucleoplasmin (<i>X.l.</i>) ¹³¹ / Nucleophosmin (NPM1) (<i>H.s.</i>) ¹³²	H2A-H2B	<i>D.m.</i> , Nip; <i>X.l.</i> , Nucleoplasmin; <i>M.m.</i> , NMP1, NPM2 & NPM3; <i>H.s.</i> , NMP1; NPM2 & NPM3	Storage in <i>X. laevis</i> oocytes, cytosolic-nuclear transport, replication, transcription	
		Chz1 (<i>S.c.</i>) ¹⁶	H2AZ-H2B	<i>S.c.</i> , Chz1; <i>H.s.</i> , HIRIP3?	Chz1: H2AZ incorporation by SWR1	
		Nap1 (<i>X.l.</i>) ¹³¹ Nap1-related proteins: Nap1L2 (<i>M.m.</i>) ¹³³ , SET/TAF1b (<i>H.s.</i>) ¹³⁴ , CINAP (<i>H.s.</i> , <i>M.m.</i>) ¹³⁵ and Vps75 (<i>S.c.</i>) ¹³⁶	H2A-H2B ^b	<i>S.c.</i> , Nap1; <i>S.p.</i> , Nap1 & Nap1.2 <i>A.t.</i> , NRP1 & NRP2; <i>D.m.</i> , Nap1 <i>X.l.</i> , Nap1; <i>M.m.</i> , Nap1; <i>H.s.</i> , Nap1	Cytosolic-nuclear transport Transcription Replication	
		Nucleolin (<i>H.s.</i>) ²⁵	H2A-H2B ^c	<i>S.c.</i> , NSR1 <i>A.t.</i> , Nucleoli; <i>X.l.</i> , Nucleolin <i>M.m.</i> , Nucleolin; <i>H.s.</i> , Nucleolin	Transcription elongation; assist chromatin remodelling	
Class II: multi-chaperone complex	H3-H4	CAF-1 complex (<i>H.s.</i>) ⁸	p150	H3.1-H4	<i>S.c.</i> , Rlf2/Cac1; <i>S.p.</i> , SPBC29A10.03C <i>A.t.</i> , Fas1; <i>D.m.</i> , p180; <i>X.l.</i> , p150; <i>M.m.</i> , p150; <i>H.s.</i> , p150	Deposition factor coupled to DNA synthesis: -Replication -Repair
			p60	H3.1-H4	<i>S.c.</i> , Cac2; <i>S.p.</i> , SPAC26H5.03 <i>A.t.</i> , Fas2; <i>D.m.</i> , p150; <i>X.l.</i> , p60; <i>M.m.</i> , p60; <i>H.s.</i> , p60	
			RbAp48 ^a	H3-H4	<i>S.c.</i> , Msi1/Cac3; <i>S.p.</i> , Msi16 <i>A.t.</i> , Msi1; <i>D.m.</i> , p55; <i>X.l.</i> , p48; <i>M.m.</i> , RbAp48; <i>H.s.</i> , RbAp48	
	H2A-H2B	FACT complex (<i>H.s.</i>) ²⁴	Spt16	H2A-H2B	<i>S.c.</i> , Spt16; <i>S.p.</i> , Spt16 <i>A.t.</i> , Spt16; <i>D.m.</i> , Spt16; <i>X.l.</i> , Spt16; <i>M.m.</i> , Spt16; <i>H.s.</i> , Spt16	Transcription elongation
SSRP1	H3-H4 ^d		<i>S.c.</i> , Pob3; <i>S.p.</i> , Pob3 <i>A.t.</i> , SSRP; <i>D.m.</i> , SSRP1; <i>X.l.</i> , SSRP1; <i>M.m.</i> , SSRP1; <i>H.s.</i> , SSRP1			
Class III: within enzymatic complexes	H3-H4	Chaperone	Enzymatic complex			
		Hif1 (<i>S.c.</i>) ¹³⁷	Hat1p/Hat2 (<i>S.c.</i>)	H3-H4	<i>S.c.</i> , Hif1	Assist HAT
	Rsf-1 (<i>H.s.</i>) ¹³⁸	RSF (<i>H.s.</i>)	H3-H4	<i>H.s.</i> , Rsf-1; <i>M.m.</i> , Rsf-1	Assist RC	
	ND/ multiple	Arp4 (<i>S.c.</i>) ¹⁵	RC INO80 (<i>S.c.</i> , <i>D.m.</i> , <i>M.m.</i> , <i>H.s.</i>) RC SWR1 (<i>S.c.</i>) HAT NuA4 (<i>S.c.</i>) RC+HAT Tip60 (<i>D.m.</i> , <i>M.m.</i> , <i>H.s.</i>)	ND	<i>S.c.</i> , Arp4; <i>S.p.</i> , Alp5 <i>A.t.</i> , Arp4; <i>D.m.</i> , BAP55; <i>M.m.</i> , BAF53; <i>H.s.</i> , BAF53	Assist RC
			RC SWI/SNF & RSC (<i>S.c.</i>): BAF/PBAF & BAP (<i>D.m.</i> , <i>M.m.</i> , <i>H.s.</i>)	ND	<i>S.c.</i> , Arp7,9 <i>A.t.</i> , Arp7,9; <i>D.m.</i> , BAP55; <i>M.m.</i> , BAF53; <i>H.s.</i> , BAF53	Assist RC
			RC INO80 (<i>S.c.</i> , <i>D.m.</i> , <i>M.m.</i> , <i>H.s.</i>)	H3-H4	<i>S.c.</i> , Arp8 <i>D.m.</i> , BAP55; <i>M.m.</i> , BAF53; <i>H.s.</i> , BAF53	Assist RC
			RC ACF/CHRAC (<i>S.c.</i> , <i>D.m.</i> , <i>M.m.</i>)	Both H2A-H2B & H3-H4	<i>S.c.</i> , Itc1 <i>D.m.</i> , Acf1; <i>M.m.</i> , Acf1; <i>H.s.</i> , Acf1	Assist RC
Multiclass chaperone	H3-H4	RbAp48 ^a (<i>H.s.</i>) ⁸	1. Single chaperone 2. CAF-1 complex 3. RC, HAT, HDAC, PC	Both H3-H4 & CENPA-H4	<i>S.c.</i> , Msi1/Cac3; <i>S.p.</i> , Mis16 <i>A.t.</i> , Msi1; <i>D.m.</i> , p55; <i>X.l.</i> , p48; <i>M.m.</i> , RbAp48; <i>H.s.</i> , RbAp48	1. Centromeric chromatin maintenance 2. Chromatin assembly coupled to DNA synthesis 3. Assist multiple enzymatic activities

Tableau 1-1 : Classification des chaperons d'histones dans différents organismes.

Tableau extrait de la revue « *Histone chaperones : an escort network regulating histone traffic* » (De Koning, et al., 2007). La sélectivité des interactions avec soit H3/H4 soit H2A/H2B est indiquée, lorsque la spécificité pour un variant est connu, celui-ci est souligné. H : Histone, RC : complexe de remodelage, Pc : Complexe Polycomb, ND : Non déterminé, S.c. : *S. cerevisiae*, S.p. : *S. pombe*, A. t. : *Arabidopsis thaliana*, D.m. : *D. melanogaster*, X. L. : *X. Laevis*, M. m. : *Mus musculus*, H. s. : *Homo sapiens*. a) RbAp48 (et ses homologues) peuvent agir en tant que chaperon au sein de complexe tel CAF-1 ou dans d'autres complexes (RC, HAT, HDAC ou PC), b) sNasp et Nap1 interagissent également avec l'histone H1, c) La Nucléoline facilite le remodelage de nucléosomes contenant macro-H2A, d) SSRP1 par son interaction avec les histones H3/H4 pourrait assister Spt16 à interagir avec le nucléosome.

2.3.2. Le remodelage de la chromatine

Lorsque plusieurs nucléosomes sont assemblés sur l'ADN, la chromatine nouvellement formée subit un phénomène dit de « maturation ». Ce processus repose à la fois sur des modifications post-traductionnelles des histones et sur l'intervention de facteurs de remodelage. Ces processus rassemblent les nucléosomes entre eux avec plusieurs niveaux d'organisation.

a) Les facteurs de remodelage utilisant l'ATP

Les facteurs de remodelage de la chromatine effectuent différents types de remaniements des nucléosomes tels que le changement de position des nucléosomes sur l'ADN, l'échange des histones ou l'éviction totale ou partielle des histones (Lusser and Kadonaga, 2003).

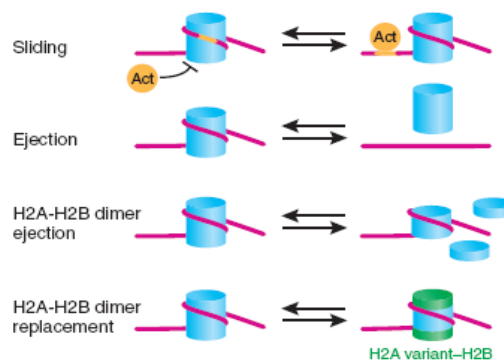


Figure 1-9 : Modes de remodelage de la chromatine.

Les facteurs de remodelage de la chromatine peuvent repositionner le nucléosome, éjecter soit les dimères H2A/H2B soit l'octamère d'histones. Le complexe SWR1 est le seul facteur de remodelage connu pour participer au remplacement du dimère d'histone H2A/H2B par H2A variant/H2B. Act représente un activateur qui possède un site de liaison au nucléosome. L'ADN est représenté par un ruban rose, l'octamère d'histone est représenté par un cylindre bleu de grande taille. Le cylindre bleu de taille moyenne correspond au tétramère d'histone (H3/H4)₂ et ceux de petites tailles au dimère (H2A/H2B). Les cylindres verts correspondent au dimère (variant H2A/H2B).

Ces remaniements de nucléosomes nécessitent la dissociation totale ou partielle des contacts ADN-histones pour permettre le repositionnement de l'ADN sur l'octamère d'histone. L'énergie nécessaire pour casser ces interactions est fournie par la sous-unité catalytique ATPase des facteurs de remodelage de la chromatine. Cette famille peut être subdivisée en quatre sous-familles classées en fonction des motifs protéiques conservés qu'elles comprennent et selon les similarités de leur sous-unités catalytiques (Figure 1-10) : la sous-famille SWI/SNF (mating-type switching/sucrose non-fermenting) contient un domaine BROMO qui lie des lysines acétylées, la sous-famille ISWI (Imitation of SWItch) possède des domaines SANT et SLIDE qui lient respectivement les queues d'histones et l'ADN, la sous-famille CHD (chromodomain) contient un domaine CHROMO qui peut lier les lysines

méthylées et la sous-famille INO80 (INOsito) possède un domaine DBINO prédit pour lier l'ADN.

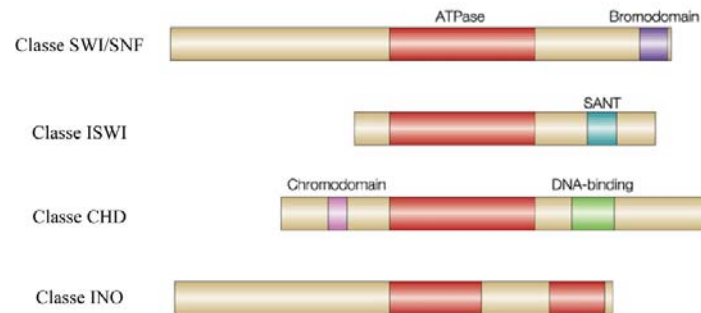


Figure 1-10 : Classification des facteurs de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP

Présence des domaines ATPasique et des domaines de reconnaissance des modifications post-traductionnelles des histones dans les classes de facteurs de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP. Le domaine ATPase est représenté en rouge. Les domaines BROMO sont représentés en violet, les domaines CHROMO en roses, les domaines SANT en bleu et les domaines de liaison à l'ADN en vert.

En régulant l'état de compaction de la chromatine, ces complexes multi-protéiques contrôlent l'accessibilité à l'ADN lors des différents processus nucléaires. Les facteurs de remodelage de la chromatine « ATP-dépendant » jouent donc un rôle important lors de la transcription, de la réplication et de la réparation de l'ADN. Ainsi, chez la levure les complexes INO80 et RSC (Remodel the Structure of Chromatin), appartenant respectivement aux sous-familles INO80 et SWI/SNF, non seulement influencent la transcription (Shen, et al., 2000) mais ont aussi un rôle dans la réparation des cassures double brins de l'ADN. Pour exemple, le complexe INO80, composé de 12 sous-unités, est recruté aux abords des cassures double brins de l'ADN. Il interagit avec les histones H2A phosphorylées, marqueur des dommages de l'ADN. Une fois recruté, INO80 participe à l'éviction des histones de cœur et des variants d'histones aux abords de la cassure double brins de l'ADN (van Attikum, et al., 2007; van Attikum, et al., 2004).

b) Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont sujettes à une grande diversité de modifications covalentes telles que les acétylations, méthylations, phosphorylations, ubiquitinations et sumoylations (Figure 1-11). Ces modifications post-traductionnelles gouvernent la structure dynamique de la chromatine. Elles peuvent se trouver sur la partie globulaire des histones, c'est le cas notamment de l'acétylation de la lysine K56 (Schneider, et al., 2006), mais elles sont en majorité présentes sur la queue N-terminale des histones. Dans leur forme non modifiée, les queues N-terminales des histones sont chargées positivement et interagissent de façon non spécifique avec le squelette peptidique de l'ADN chargé négativement ou les régions du cœur des histones du nucléosome.

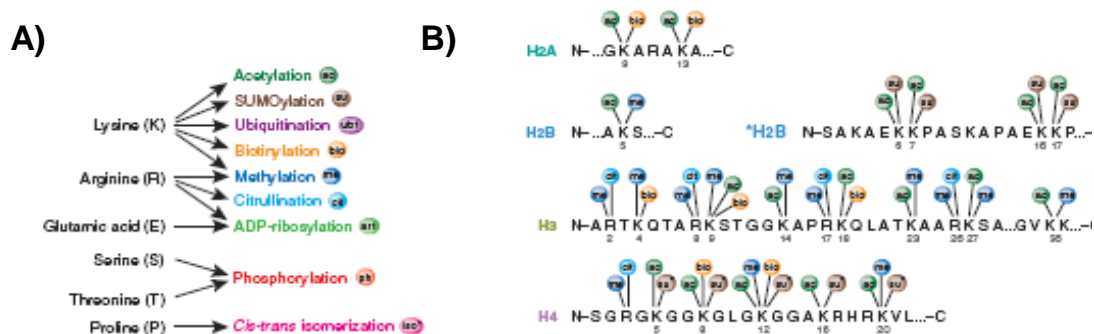


Figure 1-11 : Les modifications post-traductionnelles des histones sur leur queue N-Terminale

- A) Modifications post-traductionnelles par type de résidu
- B) Sites des modifications post-traductionnelles observées sur les queues N-terminales des histones

Il a tout d'abord été proposé que la neutralisation de la charge positive des queues N-terminales des histones par l'acétylation des lysines et la phosphorylation des sérines pourrait affaiblir les interactions ADN-histones et donc faciliterait le remodelage de la chromatine (Stallcup, 2001). Cette hypothèse a récemment été confirmée par l'équipe de C. L. Peterson. Cette équipe a montré que l'acétylation de la lysine K16 de l'histone H4 déstabilise les niveaux de compaction supérieurs de la chromatine (Shogren-Knaak, et al., 2006).

Il apparaît également que chacune des modifications a une fonction spécifique dans la régulation des processus nucléaires. Par exemple, l'acétylation des histones participe à l'activation des gènes, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 participe à la formation de l'hétérochromatine, la phosphorylation de H2AX constitue un marqueur des dommages ADN et l'acétylation de la lysine K56 de l'histone H3 intervient dans la réparation et la réplication de l'ADN (Celic, et al., 2006; Recht, et al., 2006).

L'ensemble de ces observations a amené à formuler l'hypothèse du « code des histones ». Cette hypothèse propose que des ensembles bien définis de modifications, pouvant agir en combinaisons, sont reconnus par des facteurs spécifiques et traduits en un événement particulier (Strahl and Allis, 2000). Ainsi, une modification préexistante régule les modifications suivantes et ces modifications servent comme marqueurs pour le recrutement de protéines ou de complexes protéiques qui régulent diverses fonctions de la chromatine, telle que l'expression des gènes, la réplication et la réparation de l'ADN. Il apparaît que ces inter-relations régulatrices peuvent avoir lieu soit en *cis*, sur une même histone, soit en *trans*, sur une autre histone appartenant ou non au même nucléosome comme l'illustre la Figure 1-12. Les histones sont donc les cibles de protéines chargées de traduire l'information contenue dans leurs modifications post-traductionnelles. Ajoutons à cette complexité le fait que les différents variants d'histones peuvent présenter des motifs de modifications post-traductionnelles distincts et ainsi conférer à chaque nucléosome des spécificités fonctionnelles.

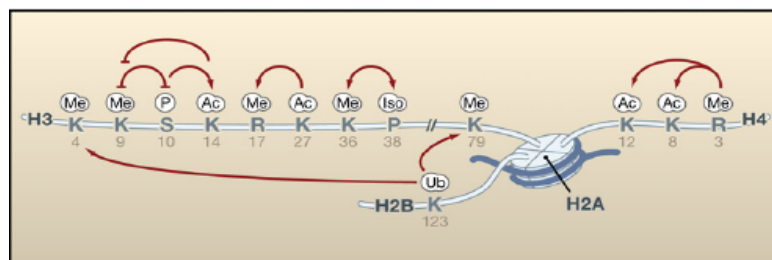


Figure 1-12 : Inter-régulation des modifications post-traductionnelles des histones.

L'influence positive d'une modification post-traductionnelle sur une autre est représentée par une flèche rouge, l'influence négative est représentée par un trait rouge. L'ADN nucléosomal est représenté par un trait bleu autour de l'octamère d'histone coloré en gris clair. Le cœur des histones est représenté par une portion au sein du nucléosome et la queue N-terminale par un ruban. Les résidus portant la modification post-traductionnelles sont indiqués. Me correspond à une méthylation, Ac à une acétylation, Iso à une isomérisation et Ub à une ubiquitination.

Chacune de ces modifications est reconnue par un domaine de liaison spécifique. Ainsi, la lysine méthylée K9 de l'histone H3 est reconnue par le domaine BROMO de la protéine HP1. Cette interaction maintient l'état compact de l'hétérochromatine. Ces domaines d'interaction des queues N-terminales des histones sont de mieux en mieux identifiés et leur caractéristiques structurales sont détaillées dans le paragraphe Chapitre 1 :3.1. Ces domaines sont retrouvés dans de nombreux complexes qui modulent la dynamique de la chromatine tels que les complexes de remodelage de la chromatine, les complexes d'acétylation, de déacétylation ou de méthylation des histones.

Les histones jouent donc un rôle central dans le codage des informations épigénétiques à travers leurs modifications post-traductionnelles. Ce code épigénétique est responsable de la différenciation cellulaire et se transmet aux cellules filles à chaque division cellulaire. La découverte du code épigénétique des histones est une avancée incontestable dans la compréhension des processus qui régulent la vie cellulaire. Pourtant, de nombreuses questions restent en suspens. Comment se transmet l'information épigénétique lors des processus de réplication et de réparation ? Comment ce code épigénétique est-il traduit en signalisation moléculaire régulant la transcription ? Les études récentes semblent converger vers un modèle complexe dans lequel assemblage et remodelage de la chromatine sont intimement liés. Dans ce modèle les variants d'histones et leurs modifications post-traductionnelles associées ont un rôle primordial dans la transmission de l'information épigénétique au sein du noyau.

2.4. Les processus nucléaires dans le contexte de la chromatine

Les processus nucléaires tels que la transcription, la réplication et la réparation nécessitent de nombreuses modifications structurales de la chromatine. Une coopération dynamique entre les modifications post-traductionnelles des histones, les protéines de remodelage de la chromatine et les protéines chaperon d'histones permettent le bon déroulement de chacun de ces processus nucléaires. Si un problème survient au niveau de la structure de la chromatine ou si la transmission de l'information épigénétique est erronée, les conséquences cellulaires peuvent être irréversibles et conduire à un état cancéreux.

2.4.3. La transcription

Dans le noyau, les gènes se trouvent dans différents états transcriptionnels. En effet, un gène peut être soit transcriptionnellement inactif soit transcriptionnellement actif. Alors que la répression d'un gène appartenant à l'hétérochromatine est irréversible, un gène situé dans l'euchromatine peut être activé ou réprimé au cours de la vie cellulaire. De nombreuses études menées *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence la présence de motifs de modifications post-traductionnelles caractéristiques de l'état traductionnel des gènes.

Ainsi, chez les mammifères, la répression transcriptionnelle au niveau de l'hétérochromatine est associée à un faible taux d'acétylation et à un haut niveau de méthylation sur certains sites. Ces modifications post-traductionnelles des histones permettent de recruter de façon spécifique des protéines essentielles au maintien de l'hétérochromatine. Par exemple, la méthylation de la lysine K9 de l'histone H3 permet le recrutement de la protéine HP1

(Hétérochromatine Protéine 1). L'association de HP1 à cette modification augmente la compaction de la chromatine et entraîne donc la répression du gène sur lequel se trouve l'histone.

Lorsqu'un gène est situé dans l'euchromatine, son état transcriptionnel est déterminé par les modifications post-traductionnelles portées par les histones. Ainsi, alors qu'un gène réprimé présente des taux bas d'acétylation, de méthylation et de phosphorylation, un gène actif se caractérise par un taux d'acétylation et de triméthylation de lysines importants. Ces marques sont modulées de façon à réguler l'expression des gènes en fonction des besoins cellulaires. En effet, elle permettent, entre autres, de recruter des facteurs de remodelage de la chromatine nécessaires à l'activation de la transcription. Par exemple, la méthylation de la lysine K4 de l'histone H3 permet de recruter le complexe de remodelage de la chromatine NURF qui intervient dans l'activation la transcription (Figure 1-13). La présence de variants d'histones au niveau du promoteur joue également un rôle dans la régulation de la transcription d'un gène. En effet, le remplacement de l'histone H2A par son variant Htz1 au niveau du promoteur du gène réprimé peut faciliter son activation (Guillemette, et al., 2005; Raisner, et al., 2005; Zhang, et al., 2005).

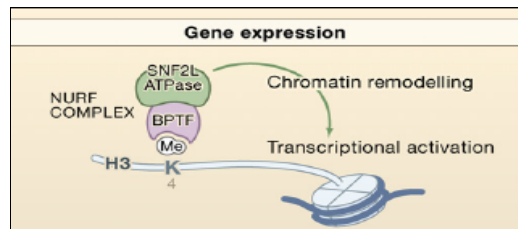


Figure 1-13 : Activation de la transcription via les modifications post-traductionnelles des histones.

Exemple d'activation transcriptionnelle d'un gène via la méthylation de la lysine K4 de l'histone H3. La lysine K4 méthylée de l'histone H3 recrute le complexe de remodelage NURF composé des deux sous-unités BPTF et de l'ATPase SNF2L. NURF modifie ensuite l'état de la chromatine via sa sous-unité catalytique SNF2L ce qui permet d'activer la transcription. L'ADN nucléosomal est représenté par un ruban bleu, toutes les histones sont représentées par une portion de camembert gris-clair. Seule la queue N-terminale de l'histone H3 est représentée par un ruban gris-clair.

Lors de l'élongation de la transcription, la présence de nucléosomes constitue une barrière physique au passage de la polymérase. Or la vitesse moyenne de transcription *in vivo* d'ADN contenant des nucléosomes est similaire à la vitesse de la transcription *in vitro* d'ADN ne contenant pas de nucléosome. Ce paradoxe peut s'expliquer par le fait que plusieurs facteurs tels que des protéines chaperons, des enzymes de modification des histones et des facteurs de remodelage de la chromatine augmentent l'efficacité de l'élongation. La Figure 1-14 illustre un mécanisme possible d'assemblage et de désassemblage de la chromatine lors de la

transcription. Dans ce mécanisme, si le taux de transcription est faible, un ou deux dimères d'histones H2A/H2B sont dissociés sur la totalité du gène transcrit et l'éviction de l'ensemble des histones est principalement observée au niveau des promoteurs. En revanche, si le taux de transcription est important, l'éviction de la totalité des histones a lieu sur l'ensemble de la région codante (Kristjuhan and Svejstrup, 2004; Rufiange, et al., 2007; Schwabish and Struhl, 2004). Notons que des études ont montré que l'ARN polymérase II ne peut passer les nucléosomes que si au moins un dimère H2A/H2B est manquant (Kireeva, et al., 2005; Kireeva, et al., 2002).

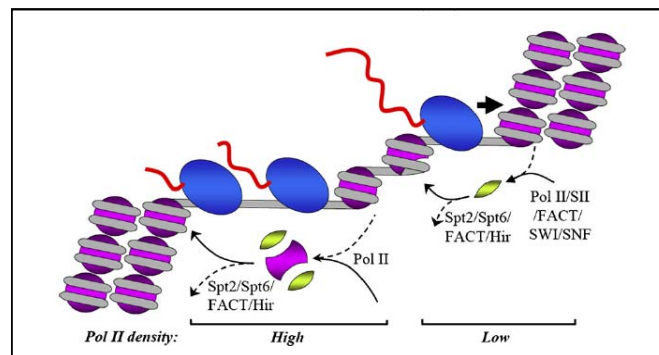


Figure 1-14 : Modèle d'assemblage et de désassemblage des histones lors de la transcription.

Deux mécanismes sont proposés pour la progression de l'ARN polymérase en fonction du taux de transcription. Pour un gène peu transcrit, un seul dimère d'histone (H2A/H2B), en jaune, est dissocié puis ré-assemblé sur le nucléosome lors du passage de l'ARN-polymérase II (représenté par un ovale bleu). Les chaperons d'histone FACT et/ou NAP-1 ainsi que la protéine de remodelage de la chromatine SWI/SNF participent à ces processus. Pour un gène fortement transcrit, le nucléosome est totalement dissocié puis réassocié après le passage de l'ARN-polymérase II. Les chaperons d'histone FACT et/ou NAP-1 ainsi que Hir et Asf1 et la protéine de remodelage de la chromatine SWI/SNF participent à ces processus. Le tétramère d'histone (H3/H4)₂ est représenté en mauve, l'ADN avec un ruban gris.

Dans ce contexte, le rôle des protéines chaperons d'histones seraient donc de stimuler la transcription en facilitant le désassemblage puis le réassemblage des histones. Par exemple, il a été montré que le complexe FACT et la protéine Spt6 (Belotserkovskaya, et al., 2003; Svejstrup, 2003) participent, *in vitro*, à la dissociation des octamères d'histones en aval de l'ARN polymérase II puis à leur réassociation. Deux sous-unités composent le complexe FACT chez l'homme : la sous-unité SPT16 qui interagit avec le dimère d'histones (H2A/H2B) et la sous-unité SSPR1 qui interagit avec les histones H3 et H4. Depuis peu, d'autres chaperons participant à la transcription ont été également identifiés. Comme nous l'avons déjà signalé, il existe probablement une certaine redondance fonctionnelle. Le chaperon Nap-1 qui stimule *in vivo* l'initiation et de l'élongation de la transcription a récemment été découvert en interaction avec le complexe FACT et appartient au complexe de remodelage de la chromatine SWR1 (Krogan, et al., 2006; Mizuguchi et al., 2004; Walfridsson, et al., 2007).

Une autre protéine chaperon des histones H2A/H2B, la nucléoline, possède une activité similaire à FACT lors de la transcription. Il a en effet été montré, *in vitro*, que la nucléoline facilite la transcription et induit la perte d'un dimère d'histones H2A/H2B de nucléosome (Angelov, et al., 2006). Il est intéressant de noter que la nucléoline augmente l'efficacité du facteur de remodelage SWI/SNF, celui-ci est également impliqué dans l'élongation de la transcription via son interaction avec l'ARN polymérase II (Angelov et al., 2006; Cho, et al., 1998; Wilson, et al., 1996). Les protéines chaperons Asf1 et Hir ont également été décrites comme participant au désassemblage et à l'assemblage des histones lors de la transcription (Schwabish and Struhl, 2006).

2.4.4. La réplication

L'un des défis de la réplication est la transmission de l'information épigénétique contenue sur la chromatine parentale aux chromatines filles. En effet, la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones sont les supports de la mémoire chromatinienne. Une question essentielle est de savoir comment, lors de la réplication, ces modifications sont maintenues sur les histones parentales et comment elles sont transmises sur les histones nouvellement synthétisées. Deux processus fondamentalement distincts, illustrés sur la Figure 1-15, affectent la structure de la chromatine durant la réplication. Le premier est le désassemblage des nucléosomes situés en amont de la fourche de réplication. Le second est le dépôt des histones parentales, qui portent l'information épigénétique, et des histones nouvellement synthétisées sur les molécules d'ADN filles situés en aval de la fourche de réplication.

La progression de la fourche de réplication nécessite la dissociation des nucléosomes parentaux en amont de celle-ci. Chaque nucléosome se dissocie en deux dimères d'histones (H2A/H2B) et un tétramère d'histones (H3/H4)₂. Il est possible que la force de déplacement de la fourche de réplication ne soit pas suffisante pour dissocier les histones de l'ADN.

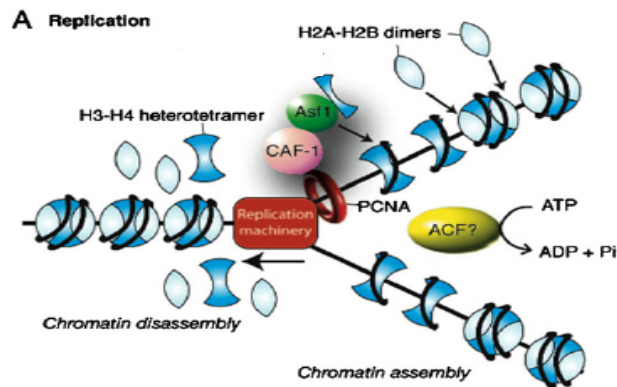


Figure 1-15 : Assemblage et désassemblage de la chromatine lors de la réplication

Représentation schématique des mécanismes d'assemblage et de désassemblage de la chromatine associés à la réplication de l'ADN. En amont de la fourche de réplication, les octamères d'histones sont dissociés en dimères d'histones (H2A/H2B) et en tétramère d'histones (H3/H4)₂. La protéine Asf1 coopère avec le chaperon d'histone CAF-1 pour déposer les histones sur l'ADN en aval de la fourche de réplication. L'assemblage des nucléosomes suit la progression de la fourche de réplication car CAF-1 interagit avec le facteur de prolifération nucléaire PCNA. Le facteur de remodelage ACF permet de compacter la chromatine à des niveaux supérieurs.

Certains facteurs de remodelage tels que SNF2h qui augmente l'efficacité de la réplication pourraient intervenir au niveau de la dissociation des nucléosomes (Collins, et al., 2002). Nous avons vu précédemment que, lors de la transcription, le chaperon d'histone FACT facilite la progression de l'ARN-polymérase II en transférant les histones (H2A/H2B) (Belotserkovskaya and Reinberg, 2004). Un rôle similaire des chaperons d'histones est envisagé dans le cadre de la réplication (Formosa, 2003). En effet, la formation des nucléosomes en aval de la fourche de réplication est facilitée par les chaperons d'histones CAF-1 et Asf1. Ces deux protéines interagissent entre elles chez la levure, la drosophile, le poulet et l'homme (Krawitz et al., 2002; Mello et al., 2002; Sanematsu, et al., 2006; Tyler, et al., 2001). Le désassemblage et l'assemblage des nucléosomes sont corrélés à l'évolution de la fourche de réplication le long de l'ADN grâce respectivement à l'interaction directe entre CAF-1 et PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, facteur de processivité de l'ADN polymérase) et l'interaction du complexe Asf1/(H3/H4) avec les hélicases MCM2-7 (Groth, et al., 2003).

Ainsi Asf1 et CAF-1 sont tous les deux associés à la fourche de réplication et coopèrent pour déposer les histones (H3/H4) sur l'ADN. Notons également que PCNA est recruté sur l'ADN par le facteur de réplication RFC qui est également capable d'interagir *in vitro* avec le chaperon Asf1 (Franco, et al., 2005).

Concernant les mécanismes de transmission des marques épigénétiques lors de la réplication, une hypothèse émergente propose un mécanisme pour lequel PCNA jouerait un rôle clé. En effet, PCNA recrute de nombreuses protéines de restructuration de la chromatine au niveau des fourches de réplication dont des méthyltransférases d'ADN (DNMT1) (Chuang, et al., 1997), des déacétylases (Milutinovic, et al., 2002) ainsi que des protéines de remodelage de la chromatine « ATP-dépendant » (WSTF-SNF2h) (Poot, et al., 2004) et des protéines chaperons d'histones (CAF-1).

Un autre mécanisme faisant intervenir directement l'ADN a également été découvert récemment, il concerne la transmission de la méthylation de la lysine K9 de l'histone H3 sur les brins filles de l'ADN. Cette transmission est couplée à la méthylation de l'ADN par la DNMT1 sur la molécule d'ADN fille et nécessite l'intervention du chaperon d'histone CAF-1 (Reese, et al., 2003; Sarraf and Stancheva, 2004). Cette découverte apporte de nouvelles données sur les mécanismes de transmission des informations épigénétiques aux cellules filles. Néanmoins, les mécanismes moléculaires de coopération entre les différents facteurs de remodelage de la chromatine et les chaperons d'histones dans ce processus restent énigmatiques.

2.4.5. La réparation des dommages de l'ADN

La cellule doit constamment faire face à des lésions au niveau de l'ADN. La lésion la plus sévère pour la viabilité de la cellule est la cassure double brins de l'ADN (DSB pour Double Strand Break) car une mauvaise réparation peut générer des mutations délétères, des translocations de chromosomes qui aboutissent à la mort cellulaire ou au cancer. La cellule répond à des cassures de l'ADN en déployant tout un panel de protéines sur le site du dommage. Quelques-uns de ces facteurs sont impliqués dans la réparation de l'ADN tandis que d'autres prennent en charge la signalisation du dommage (checkpoint de dommage de l'ADN tel que Rad53 chez la levure) ce qui permet de retarder la progression du cycle cellulaire jusqu'à la complète réparation de l'ADN.

La chromatine joue également un rôle critique dans la réparation de l'ADN. Des études ont montré que la plupart des voies de réparation de l'ADN doivent être liées à un processus précis de remaniement actif de la chromatine. Ce remaniement est essentiel pour rendre la molécule d'ADN facilement accessible aux protéines de la réparation et pour restaurer fidèlement la structure chromatinienne préexistante en maintenant notamment les

informations génétiques et épigénétiques. Un premier modèle reliant réparation et chromatine a été établi (Smerdon, 1991; Smerdon and Lieberman, 1978). Ce mécanisme comporte trois phases (Figure 1-16) : i) l'ouverture de la chromatine sur près de 2kb de part et d'autre du dommage de l'ADN pour permettre l'accès des protéines de réparation à l'ADN endommagé, ii) la réparation du dommage avec les protéines de réparation adéquates, iii) le réassemblage de la chromatine une fois la lésion réparée.

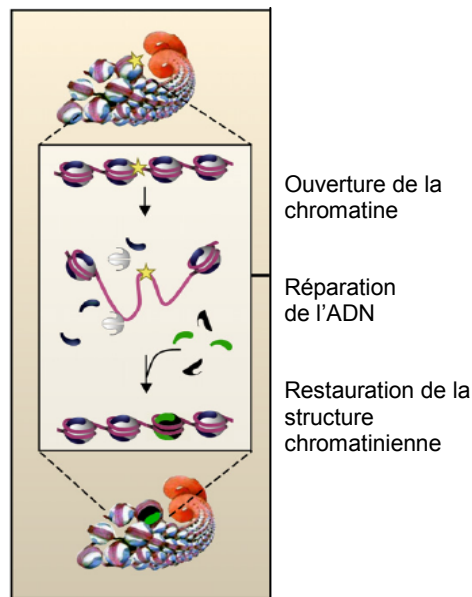


Figure 1-16 : Mécanisme de réparation de l'ADN dans le contexte de la chromatine.

Suite à un dommage de l'ADN, la chromatine est relâchée et les nucléosomes désassemblés pour permettre l'accès à l'ADN de la machinerie de réparation. Une fois l'ADN réparé, les nucléosomes sont reformés soit avec d'anciennes histones soit avec des histones nouvellement synthétisées puis la structure chromatinienne est restaurée. L'ADN est représenté par un ruban de couleur rose, le dommage de l'ADN est représenté par une étoile, le tétramère d'histone (H3/H4)₂ en gris excepté les tétramères (H3/H4)₂ nouvellement synthétisés qui sont colorés en noir, les dimères d'histones H2A/H2B en bleu excepté les dimères H2A/H2B nouvellement synthétisés qui sont colorés en vert.

Lors de la première étape, la chromatine subit des changements structuraux très importants. Ces changements sont principalement induits par les modifications post-traductionnelles retrouvées sur les histones suite à la détection de dommages de l'ADN. Le rôle de ces modifications post-traductionnelles serait d'augmenter la flexibilité de la chromatine et/ou de recruter des protéines de remodelage de la chromatine. Un exemple bien étudié est la phosphorylation du variant d'histone H2AX (noté γ H2AX). Cette modification est l'évènement le plus rapide qui se produit chez la levure et chez l'homme en réponse à une cassure double brins de l'ADN. La phosphorylation de H2AX forme des foyers qui s'étendent chez l'homme sur des megabases de chromatine autour de la lésion (Rogakou, et al., 1999). Cette modification post-traductionnelle permet de recruter notamment des

complexes de remodelage de la chromatine de la superfamille Snf2 tels que INO80 et SWR1 (van Attikum et al., 2007).

Une autre modification post-traductionnelle détectée lors de la réparation de lésions de l'ADN est l'acétylation de la queue N-terminale des histones H3 et H4. Dans son état non acétylé, la queue N-terminale de H4 joue un rôle important dans la stabilisation de la fibre de chromatine et les queues N-terminales de H3 et H4 contribuent à la stabilisation des hauts degrés de compaction de la chromatine (Gordon, et al., 2005; Zheng, et al., 2005). Une hypothèse serait que l'acétylation des histones pourrait faciliter la réparation des cassures doubles brins de l'ADN en déstabilisant la compaction de la chromatine. Cette hypothèse est pertinente dans le cas de l'acétylation des histones H3 sur la lysine K56. En effet, chez la levure, la lysine K56 est située au niveau de « l'histone fold » et sa chaîne latérale interagit avec l'ADN au niveau des brins entrants et sortants du nucléosome. L'acétylation de la lysine K56 perturbe ces interactions et pourrait faciliter l'éviction de l'histone H3 par les enzymes de remodelage de la chromatine. Il est intéressant de noter que cette modification post-traductionnelle n'est pas spécifiquement induite par les dommages de l'ADN mais a principalement lieu sur les histones H3 nouvellement synthétisées et assemblées sur l'ADN lors de la réplication. Pourtant, si la détection du dommage de l'ADN a lieu au cours de la réplication, le cycle cellulaire est interrompu et l'acétylation de la lysine K56 est maintenue jusqu'à réparation de l'ADN.

Tout comme il est nécessaire d'ouvrir la chromatine pour permettre la réparation de l'ADN, il est également nécessaire de restaurer la chromatine après réparation de l'ADN. Cette étape est importante car des histones nouvellement synthétisées sont intégrées dans la chromatine alors qu'elles ne possèdent pas les modifications post-traductionnelles initialement présentes sur les anciennes histones. Le mécanisme moléculaire qui permet la transmission de l'information épigénétique contenue sur la chromatine avant la réparation de l'ADN au niveau des histones nouvellement synthétisées reste énigmatique. La seule connaissance à l'heure actuelle est que le chaperon d'histone CAF-1 prend en charge ces histones nouvellement synthétisées et les dépose sur l'ADN (Polo, et al., 2006). Nous pouvons donc supposer qu'il existe un mécanisme similaire à celui de la réplication pour lequel la transmission de l'information épigénétique impliquerait PCNA et son interaction avec CAF-1.

2.4.6. Chromatine et cancer

Une cellule cancéreuse se caractérise par une croissance effrénée et son incapacité à entrer en apoptose, la mort cellulaire programmée. Les études récentes tendent à montrer que les dysfonctionnements cellulaires observés dans des cellules tumorales sont dus à la fois à des altérations épigénétiques et génétiques (pour revues Jones and Baylin, 2007). La Figure 1-17 illustre le rôle de ces altérations de la chromatine lors de l'évolution de cellules tumorales.

L'accumulation de modifications génétiques et épigénétiques aboutit à l'inactivation de protéines soit par des mutations au niveau de leur séquence, soit par une mauvaise régulation de leur expression. Nous avons vu dans les paragraphes précédents le rôle central de la chromatine dans la régulation de la transcription des gènes, la réplication et la réparation de l'ADN. Lorsque ces altérations affectent une protéine impliquée dans la régulation de la structure chromatinienne, les répercussions au niveau cellulaire sont importantes. Par exemple, des études récentes montrent un lien direct entre le développement de certains cancers humains et des mutations au sein du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Chai, et al., 2005; Roberts and Orkin, 2004). Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels ces mutants sont impliqués dans le développement de cancers n'ont pas été décrits à ce jour. Un autre exemple intéressant concerne la perturbation dans les cellules cancéreuses de l'équilibre entre l'acétylation et la déacétylation des histones soit par mutations des histones acétyltransférases, soit par une surexpression des histones déacétylases (HDAC). A cause de ce déséquilibre, la majorité des cancers humains présente des histones H4 ont des lysines K16 déacétylées et des lysines K20 non triméthylées (Fraga, et al., 2005) ce qui modifie l'expression des gènes. De plus, ces nouveaux motifs de modifications post-traductionnelles peuvent être transmis lors de la mitose et contribuent donc à la prolifération des cellules tumorales.

La découverte du rôle de l'épigénétisme dans l'initiation et la prolifération des cellules tumorales a permis d'orienter la recherche vers l'étude de nouveaux antitumoraux visant l'état de la chromatine. L'exemple le plus encourageant est le développement d'inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC). Ces inhibiteurs induisent l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose de cellules cancéreuses. De récentes études sur le mode d'action de ces inhibiteurs révèlent que leur action anticancéreuse serait reliée à l'augmentation de l'acétylation des histones situées au niveau d'un gène codant pour une protéine pro-apoptotique. Sa surexpression favorise la mort des cellules cancéreuses (Dokmanovic and Marks, 2005; Insinga, et al., 2005; Nebbioso, et al., 2005).

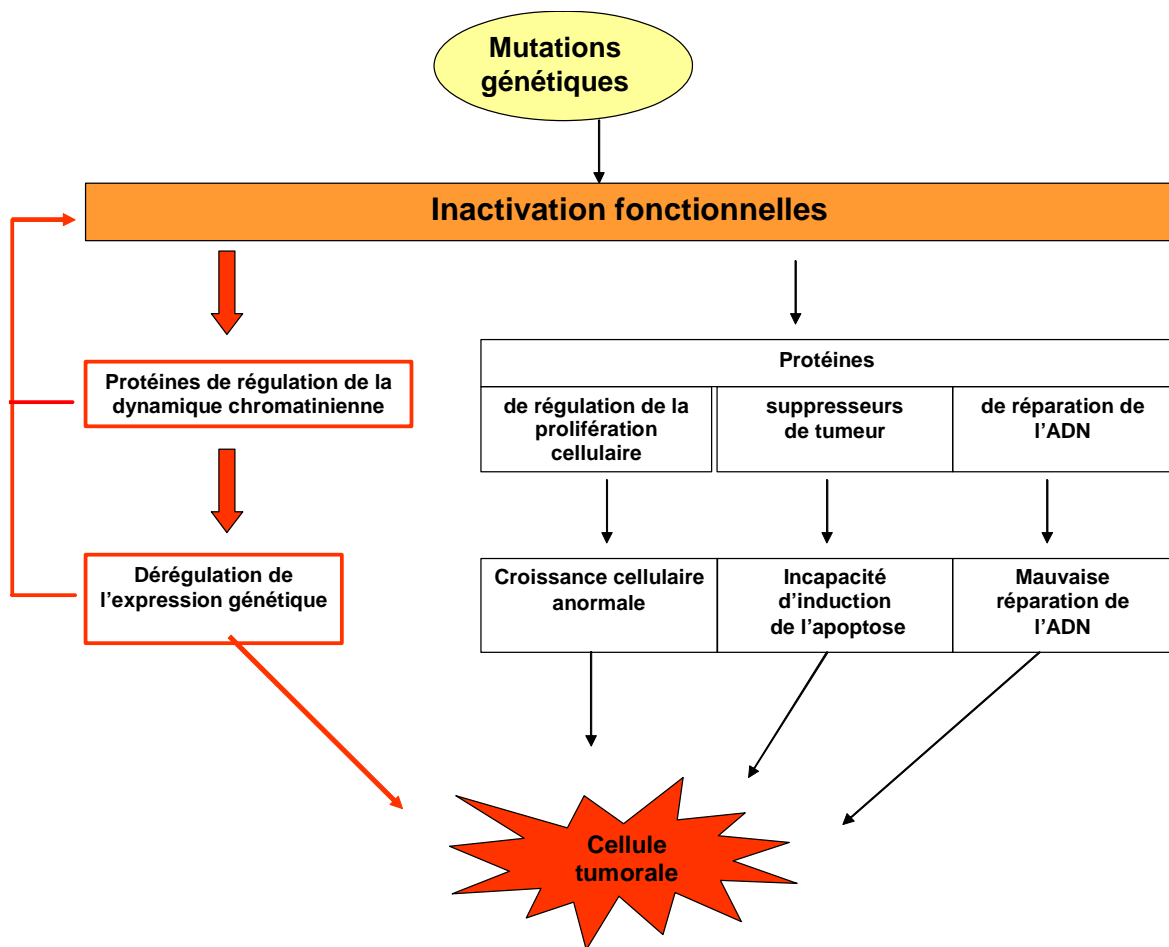


Figure 1-17 : Schéma du rôle de l'épigénétisme dans l'évolution de cellules tumorales.

Suite à des mutations génétiques, des protéines présentent des mutations dans leur séquence. Selon les mutations, les protéines deviennent inactives et n'assument plus leur rôle fonctionnel. Lorsque ces mutations inactivent des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, des protéines supprimeuses de tumeurs ou des protéines de la réparation des dommages de l'ADN, les conséquences sont dramatiques pour la cellule. En effet, ces mutations peuvent entraîner une croissance cellulaire anormale, une incapacité de la cellule à entrer en apoptose voire d'autres mutations génétiques via une mauvaise réparation des dommages de l'ADN. De récentes études ont établi le rôle de l'épigénétisme et du remodelage de la chromatine dans le cycle d'évolution de la cellule vers un état tumorale, indiqué en rouge sur le schéma. En effet, les protéines impliquées dans la régulation de la dynamique chromatinienne jouent un rôle central dans la réplication et la réparation de l'ADN ainsi que dans la régulation de l'expression génétique. L'inactivation d'une protéine impliquée dans une voie de remodelage de la chromatine peut entraîner une mauvaise régulation de l'expression de certains gènes ainsi qu'un dysfonctionnement lors de la réparation et de la réplication de l'ADN.

3. Biologie structurale des protéines interagissant avec les histones

Il est désormais bien établi que la nature transitoire des modifications post-traductionnelles des histones permet la régulation spatio-temporelle de l'accessibilité de l'ADN pour la transcription, la réplication et la réparation. La combinaison de motifs spécifiques de modifications et leurs localisations intracellulaires permettent une fine régulation de ces processus. La traduction de ces motifs en signaux biologiques nécessite une large gamme de protéines d'interaction des histones et de machineries protéiques agissant sur la structure de la chromatine. Ces complexes multi-protéiques comprennent les domaines d'interaction aux queues N-terminales des histones modifiées et/ou les protéines chaperons d'histones. Les premiers contribuent à la lecture du code des histones tandis que les seconds participent à l'assemblage et au désassemblage des nucléosomes. Au cours des dix dernières années, la biologie structurale a largement contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires complexes mis en place lors de ces processus.

3.1. Domaines de liaison de la queue N-Terminale des histones

L'hypothèse du code des histones suggère que les modifications des queues N-terminales des histones constituent des marques spécifiquement reconnues par des domaines protéiques. Ces domaines sont retrouvés dans différents complexes multi-protéiques de remodelage de la chromatine. Actuellement, plusieurs domaines ont été identifiés en fonction de leur capacité à reconnaître des modifications post-traductionnelles spécifiques des histones. Ainsi les domaines BROMO reconnaissent les lysines acétylées, les domaines CHROMO et TUDOR détectent les lysines méthylées et les domaines 14-3-3 et Tandems BRCT reconnaissent les sérines phosphorylées sur les queues N-terminales des histones. Il existe également des domaines qui reconnaissent des histones non modifiées (PHD-finger, ADD, WD-40, SANT). Ces dernières années ont connu des progrès remarquables dans la détermination structurale à haute résolution de ces domaines de liaison. De nombreuses informations structurales ont été obtenues et des modes de reconnaissances spécifiques ont pu être décrits. Ils sont décrits dans les paragraphes suivants.

3.1.7. Domaines de liaison aux lysines acétylées des histones (BROMO)

Les domaines BROMO sont les seuls domaines connus de liaison aux lysines acétylées des histones (Dhalluin, et al., 1999; Haynes, et al., 1992; Jeanmougin, et al., 1997). Ils sont présents dans des complexes d'histones acétyltransférases et des complexes de remodelage de la chromatine impliqués dans les processus d'activation de la transcription. La première structure résolue de domaine BROMO fut celle du co-activateur humain de transcription PCAF par RMN en 1999 (Dhalluin et al., 1999). Son repliement est caractéristique d'un repliement de quatre hélices « left hand ». En 2000 la structure cristallographique de l'homologue chez *S. cerevisiae* de PCAF a été résolue en interaction un peptide de H4 acétylé sur la lysine K16 (Owen, et al., 2000). Sur cette structure, la lysine K16 acétylée se situe dans une poche de résidus hydrophobes et aromatiques conservés. Le groupement acétyle de la lysine K16 établit une liaison hydrogène avec une arginine extrêmement conservée. Les résidus du peptide de l'histone H4 en interaction avec le domaine BROMO et situés en position K16+2 et K16+3 forment également des contacts avec plusieurs résidus du domaine BROMO. De façon remarquable, les résidus qui interagissent avec la lysine acétylée sont très conservés dans les domaines BROMO alors que les résidus en interaction avec les résidus adjacents à la lysine K16 acétylée ne sont conservés que dans la famille PCAF. Ces résultats confirment la capacité des domaines BROMO à reconnaître des lysines acétylées contenues dans des séquences spécifiques.

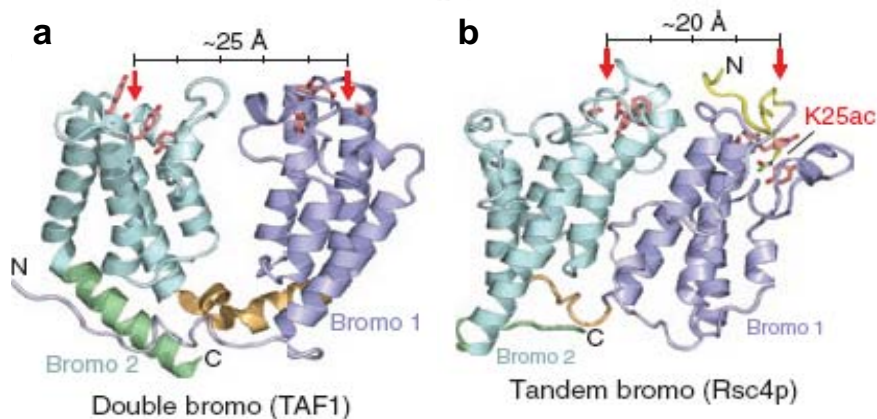


Figure 1-18 : Exemples de structures de doubles domaines BROMO

a) de la protéine TAF1 libre (PDB 1EQF) et en b) de la protéine Rsc4p en complexe avec un peptide H4K25 acétylé (PDB 2R10). Les domaines sont représentés sous forme de ruban, le domaine BROMO -1 N-terminal est coloré en bleu, le domaine BROMO-2 C-terminal est coloré en cyan. Chaque domaine BROMO contient quatre hélices α reliées par des boucles. L'interaction des domaines BROMO avec des lysines acétylées implique des résidus aromatiques qui forment une cage autour de la lysine acétylée. Les chaînes latérales des résidus impliqués dans la reconnaissance de la lysine acétylée sont colorées en rouge. La chaîne principale du peptide de H4K25 acétylé complexé avec le double domaine BROMO de la protéine est en ruban jaune. Le double domaine BROMO reconnaît la lysine acétylée du BROMO-1.

Dans de nombreuses familles, les domaines BROMO sont associés en tandem. Actuellement, il existe deux structures résolues de tandem BROMO par cristallographie, l'un, TAF-1, sous sa forme libre et l'autre, Rscp4, en complexe avec un peptide d'histone H4 acétylé. TAF-1 est la plus grande sous-unité de TFIID (Jacobson, et al., 2000; VanDemark, et al., 2007). Il s'agit d'un complexe multiprotéique impliqué dans l'initiation de l'assemblage de la machinerie de transcription. Le double domaine BROMO de TAF-1 se présente sous la forme d'un V (Figure 1-18). Chaque extrémité de cette structure correspond à un site d'interaction avec une lysine acétylée. D'après la structure cristallographique, TAF-1 peut lier deux lysines acétylées simultanément mais aucune donnée ne permet de le confirmer.

Contrairement à TAF-1, Rscp4 se replie sous une seule unité structurale. La structure de Rscp4 en complexe avec un peptide de H3 acétylé sur la lysine K14 révèle que seul le deuxième domaine BROMO se lie à la lysine acétylée du peptide (Kasten, et al., 2004). Une seconde structure montre que lorsque la lysine K25 de Rscp4 est acétylée, celle-ci lie le premier domaine BROMO (VanDemark et al., 2007). Cette interaction intramoléculaire dissocie l'interaction du deuxième domaine BROMO avec la lysine K14 acétylée de l'histone H3. Cette structure met en évidence un mode de régulation d'interactions entre un domaine de liaison et sa cible.

3.1.8. Domaines de liaison aux lysines méthylées des histones

Certaines régions de la chromatine sont enrichies en lysines méthylées. Selon la localisation et le type de méthylation (mono-, di- ou tri-méthylation) les conséquences biologiques sont distinctes (Martin and Zhang, 2005). Ainsi la méthylation des lysines peut être associée soit à l'activation d'un gène soit à sa répression. Dans l'euchromatine, la triméthylation de la lysine K4 de l'histone H3 (H3K4me3) est très fortement corrélée à l'activation de la transcription alors que la triméthylation de la lysine K27 de l'histone H3 (H3K27me3) est corrélée à la répression d'un gène. Au niveau de l'hétérochromatine, la lysine K9 de l'histone H3 est triméthylée (H3K9me3) (Berger, 2007; Guenther, et al., 2007; Kouzarides, 2007).

L'état de méthylation apporte un degré supérieur dans la spécificité de reconnaissance par les domaines de liaison. En effet, selon l'état de méthylation des lysines, leurs propriétés physico-chimiques sont modifiées. Plus une lysine est méthylée, plus l'hydrophobicité augmente et la capacité d'effectuer des liaisons hydrogènes diminue. De plus, à pH physiologique, la charge positive augmente et est délocalisée sur les groupements méthyles ajoutés à la lysine. Nous constatons que les domaines de reconnaissance des lysines méthylées se sont spécialisés pour l'une ou l'autre des formes de méthylation. Les domaines CHROMO reconnaissent les lysines présentant un fort taux de méthylation, les domaines MBD reconnaissent les lysines à faible taux de méthylation alors que les domaines TUDOR reconnaissent des lysines triméthylées et monométhylées. Les domaines PHD-fingers sont les plus versatiles puisqu'un domaine reconnaît spécifiquement la lysine H3K4me3 alors qu'un autre reconnaît cette même lysine non méthylée.

a) Caractéristiques du mode de reconnaissance des lysines méthylées

Les domaines de reconnaissance des lysines méthylées possèdent généralement des feuillets β et peuvent comme les domaines BROMO s'associer en tandem. Il existe des caractéristiques communes dans le mode d'interaction de l'ensemble de ces domaines avec les lysines méthylées. L'interaction résulte de contacts de type cation- π entre le méthylammonium et une cage de résidus aromatiques du domaine de liaison. La discrimination entre différents types de méthylation résulte en partie de la taille de la cage aromatique ainsi que, dans une moindre mesure, de la présence de résidus conservés capables de former des liaisons hydrogènes avec la lysine mono ou di-méthylée (Figure 1-19) (Hughes, et al., 2007; Ma and Dougherty, 1997). Dans la plupart des cas, le peptide contenant la lysine méthylée, qui ne possède pas de structure secondaire à l'état non lié, adopte une structure en brin β antiparallèle au feuillet du domaine de reconnaissance (Figure 1-19) (Li, et al., 2006; Ruthenburg, et al., 2007).

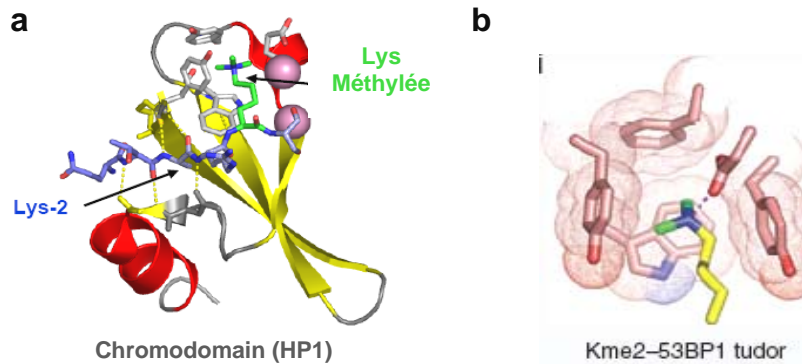


Figure 1-19 : Mode d'interaction du domaine BROMO avec sa cible

a) Structure du domaine CHROMO de la protéine HP1 impliqué dans la reconnaissance de la lysine triméthylée H3K9 (PDB 1kne). Le domaine est représenté en fonction de sa structure secondaire : en jaune sont représentés les brins β et en rouge les hélices α . Le domaine CHROMO est constitué d'un feuillet β entouré de deux hélices α . Les chaînes latérales des trois résidus aromatiques qui forment une cage aromatique autour de la lysine méthylée sont montrées en gris. Le peptide en interaction avec le domaine CHROMO est représenté en bleu, la lysine méthylée en vert. Le peptide forme un brin β et interagit avec le domaine par de nombreuses liaisons hydrogènes. Deux molécules d'eau en contact avec la lysine méthylée sont montrées par des sphères roses.

b) Positionnement de la lysine di-méthylée dans la cage de résidus aromatiques du domaine Tudor de la protéine 53BP1 (PDB 2lgo). La cage d'aromatiques se compose de quatre résidus aromatiques conservés ainsi que de la chaîne latérale d'un résidu acide.

Dans certains cas, la spécificité de reconnaissance dépend également de la séquence avoisinant la lysine méthylée. Par exemple le domaine TUDOR de la protéine 53BP1 qui reconnaît la lysine H4K20 diméthylée, interagit également avec l'arginine H4R19 (Botuyan, et al., 2006). Un autre exemple concerne la reconnaissance de la lysine méthylée H3K9 par le domaine CHROMO de la protéine HP1. Cet exemple est particulier car, lorsque la sérine située en position +1 par rapport à la lysine méthylée H3K9 est phosphorylée, le domaine CHROMO se dissocie de l'histone H3 (Fischle, et al., 2005; Hirota, et al., 2005). Il s'agit d'un exemple de régulation d'un domaine CHROMO avec sa cible et il serait intéressant de savoir si ce mécanisme de régulation est généralisable à la reconnaissance par les domaines CHROMO d'une lysine méthylée à proximité d'une thréonine ou d'une sérine phosphorylable.

b) Particularité des domaines PHD-fingers

Les domaines PHD-fingers ont des structures très caractéristiques, ils sont formés d'un feuillet β constitué de deux brins β proches d'une hélice α et au cœur de deux motifs en doigt de zinc (Figure 1-20). Pourtant, selon la protéine à laquelle ils appartiennent, ces domaines peuvent interagir avec des lysines triméthylées ou non méthylées. Grâce à la résolution structurale en 2006 et 2007 des domaines PHD-fingers de la protéine BPTF en complexe avec un peptide H3K4me3 et de la protéine BHC80 en complexe avec un peptide H3K4me0, cette particularité a pu être expliquée (Lan, et al., 2007; Li et al., 2006). Dans les deux structures, le peptide d'histone H3 forme un brin β qui vient compléter le feuillet du domaine PHD-finger (Figure 1-20). Par contre, les modes d'interaction diffèrent : la lysine triméthylée s'insère dans la cage de la protéine BPTF alors que la lysine non méthylée est prise en sandwich entre plusieurs chaînes latérales de résidus acides de la protéine BHC80. Dans le premier cas, la taille de la cage aromatique est adaptée à la taille d'une lysine triméthylée et l'interaction est stabilisée par des interactions cation- π . Dans le deuxième cas, la proximité des chaînes latérales du domaine PHD-finger crée une exclusion stérique envers les lysines triméthylées.

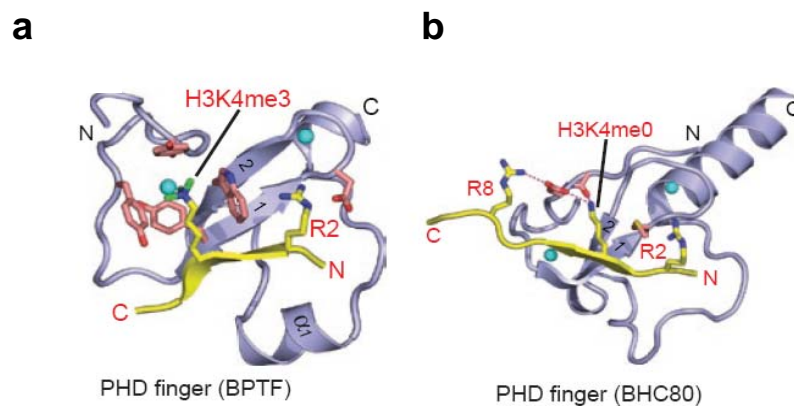


Figure 1-20 : Reconnaissance spécifique des lysines H3K4 triméthylées et non méthylées par les domaines PHD-fingers

a) Structure du domaine PHD-finger de la protéine BPTF en complexe avec le peptide H3K4me3 (PDB 2F6J) et b) Structure du domaine PHD-finger de la protéine BHC80 en complexe avec le peptide H3K4me0 (PDB 2PUY).

Les domaines protéiques sont représentés sous forme de rubans. Les deux domaines se caractérisent par un cœur en feuillet β proche d'une hélice α . Le peptide contenant la lysine méthylée, de couleur jaune, adopte dans les deux domaines une structure en brins β . Les chaînes latérales des résidus des domaines PHD-fingers en interaction avec la lysine H3K4 sont représentées en rose. Les chaînes latérales des résidus des peptides impliqués dans l'interaction avec le domaine sont également montrées.

3.1.9. Domaines de liaison aux phosphosérines des histones

De nombreuses sérines et thréonines des histones peuvent être phosphorylées. La phosphorylation a un rôle très important dans l'ensemble des processus de signalisation cellulaire (Seet, et al., 2006). L'ajout d'un groupe phosphate sur le groupe hydroxyle d'un résidu introduit une charge négative relativement encombrante. Cette modification augmente les possibilités d'appariements ioniques et de liaisons hydrogènes du résidu concerné.

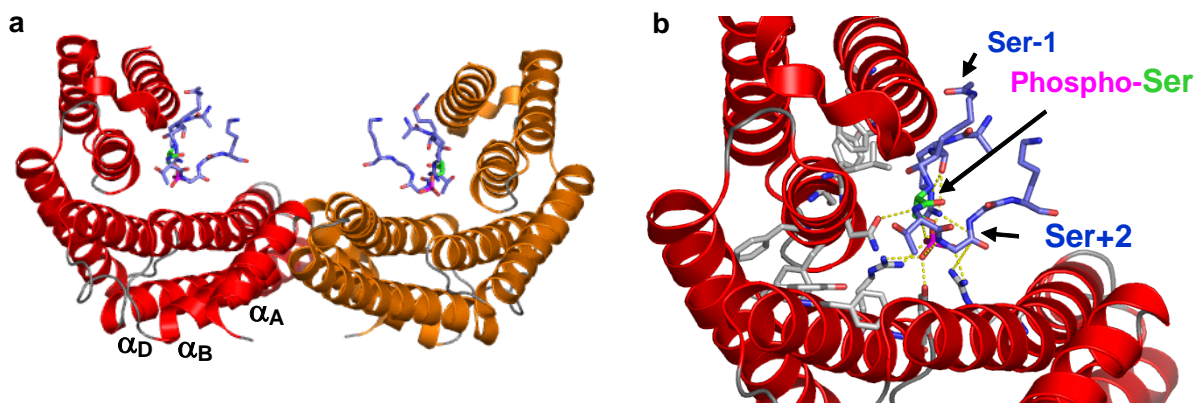


Figure 1-21 : Structure du dimère de la protéine 14-3-3 reconnaissant la phosphosérine S10 d'un peptide (PDB 2clj).

Chaque domaine est formé de huit hélices. a) Vue entière de la structure, le premier monomère est en rouge, le deuxième en orange. Les trois hélices impliquées dans l'homodimérisation sont indiquées. Le peptide en complexe avec la protéine est coloré en bleu. Chaque monomère interagit avec un peptide phosphorylé sur la sérine H3S10. b) Vue détaillée de la poche de reconnaissance du phosphopeptide. Les résidus polaires et chargés qui interagissent avec la phosphosérine sont colorés en gris, les liaisons hydrogènes sont colorées en jaunes. Les résidus aromatiques entourant le peptide sont également représentés. Aucune molécule d'eau n'est présente dans la poche d'interaction. Les résidus en position Sérine phosphorylée +2 et -1 impliqués dans la spécificité de reconnaissance sont également indiqués.

Bien que de nombreux domaines de liaison aux phosphates soient décrits dans la littérature, seuls deux domaines de reconnaissance d'histones phosphorylées ont été caractérisés à ce jour : les protéines 14-3-3s qui lient les phosphosérines H3S10 et les domaines tandems BRCT qui interagissent avec les phosphosérines H2A.XS139 (Macdonald, et al., 2005). Ces structures contiennent une majorité d'hélices α . Leur interaction avec les phosphosérines est stabilisée par de nombreuses liaisons hydrogènes entre la chaîne principale du domaine et les chaînes latérales de l'histone. La spécificité de reconnaissance de la phosphosérine est fonction de la séquence adjacente à la phosphosérine. A titre d'illustration, la structure d'une protéine 14-3-3 en complexe avec un peptide d'histone H3 phosphorylée sur la lysine K20 est représentée sur la Figure 1-21.

3.1.10. Domaines de liaison aux queues N-Terminales non modifiées des histones

L'idée que des domaines peuvent lier de façon spécifique des queues N-terminale d'histones est très récente. Les premières études ont montré que les complexes qui se lient à des queues d'histones non modifiées sont généralement trouvés dans des régions hypoacétylées et dont la transcription est réprimée (Edmondson, et al., 1996; Hakimi, et al., 2002; Shi, et al., 2004). D'autres études fonctionnelles et structurales réalisées depuis quelques années sur trois complexes ont apporté des informations nouvelles sur les bases de cette reconnaissance spécifique. Le domaine PHD-finger de la protéine BHC80 reconnaît la lysine H3K4 non méthylée. Un autre domaine reconnaît cette même lysine, il s'agit du domaine ADD de l'ADN méthyltransférase DNMT3 (Lan et al., 2007; Ooi, et al., 2007). Un troisième exemple est donné par le domaine β -propeller de la protéine WDR5 qui cible quant-à lui l'arginine H3R2 (Couture, et al., 2006; Han, et al., 2006; Ruthenburg, et al., 2006; Schuetz, et al., 2006). Il est intéressant de souligner qu'*in vivo*, la protéine WDR5 intervient dans la régulation de la méthylation de la lysine H3K4 (Wysocka J. Cell 2005). Il était donc supposé que le domaine β -propeller de la protéine WDR5 interagissait avec cette lysine. C'est la résolution de la structure de ce domaine en complexe avec un peptide de H3 méthylé sur la lysine K4 par cristallographie en 2006 qui a montré qu'en fait WDR5 interagit avec l'arginine R2 non modifiée située à proximité de la lysine K4 méthylée (Couture et al., 2006; Han et al., 2006; Ruthenburg et al., 2006; Schuetz et al., 2006).

En résumé, les dernières années ont vu l'émergence d'un grand nombre de structures de complexes impliquant des domaines de liaison aux queues N-terminales des histones en interaction avec leur cible. Ces données structurales à haute résolution se sont révélées essentielles non seulement pour comprendre la spécificité des complexes d'interaction mais également pour comprendre leur mécanisme de régulation.

Vu l'implication des protéines chaperons d'histones dans les différents processus cellulaires, on s'attend à ce que la connaissance des structures de protéines chaperons en interaction avec leur histone cible soit tout aussi bénéfique. Ces informations permettraient notamment de comprendre les mécanismes d'assemblage et de désassemblage de nucléosomes au niveau moléculaire. Cette thématique fait l'objet de la section suivante.

3.2. Les protéines chaperon d'histones

La famille des protéines chaperons comprend plus de vingt protéines et continue de croître. En effet, deux nouveaux chaperons ont été découverts ces derniers mois, ANP32B chez l'homme et Vsp75 chez *S. cerevisiae* (Munemasa, et al., 2007; Selth and Svejstrup, 2007). Actuellement, seules trois structures de chaperons d'histones ont été déterminées : la nucléoplasmine, Nap-1 et Asf1. Cette section portera donc sur la structure de ces chaperons d'histones et sur leur mode de liaisons supposé avec les histones. Nous introduirons plus en détails les informations structurales concernant la protéine chaperon Asf1 qui est centrale à ce travail.

3.2.1. Protéines de stockage des histones

Les protéines N1/N2 et la nucléoplasmine sont deux protéines chaperons impliqués dans le stockage respectif des histones H3/H4 et H2A/H2B, au niveau du noyau des cellules germinales (Dilworth, et al., 1987; Philpott and Leno, 1992). Après fertilisation, la nucléoplasmine et N1/N2 relâchent progressivement les histones et participent probablement à l'assemblage de la chromatine lors des premières étapes du développement (Frehlick, et al., 2006; Philpott, et al., 2000). En plus de leur rôle dans le stockage des histones, ces deux chaperons sont capables, *in vitro*, d'assembler des nucléosomes en absence d'autres protéines chaperons (Kleinschmidt, et al., 1990).

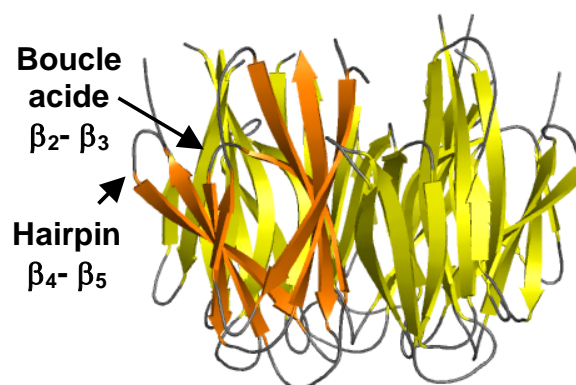


Figure 1-22 : Structure du domaine conservé de la nucléoplasmine-like INO80 (PDB 1xe0).

La structure est représentée sous forme de rubans. Cinq monomères sont assemblés dans un arrangement circulaire et deux pentamères interagissent fortement pour former un décimère. Un monomère est coloré en orange : il est constitué de deux feuillets β de quatre brins β qui se font face. La boucle acide ainsi que le β -hairpin exposé au solvant sont indiqués.

Trois structures de protéines de cette famille ont été résolues par cristallographie, il s'agit du domaine globulaire N-terminal de la nucléoplasmine de xénope (Np-core) et de drosophile ainsi que de la protéine nucléoplasmine-like NO38 de xénope. Ces trois structures sont similaires et forment des décimères. La Figure 1-22 illustre cet arrangement. Cinq monomères s'assemblent pour former un pentamère circulaire et deux pentamères interagissent fortement entre eux de manière à former un décimère. Chaque monomère est formé de huit brins β arrangés en deux feuillets qui se font face. Deux boucles présentent des caractéristiques intéressantes pour des interactions avec des protéines : la boucle de résidus acides entre les brins $\beta 2$ et $\beta 3$ qui se trouve en surface et le β -hairpin formé des brins $\beta 4$ et $\beta 5$ qui s'oriente vers l'extérieur du décimère. La partie globulaire de la nucléoplasmine interagit plus fortement avec les histones (H2A/H2B). Chaque monomère du décimère formé par les protéines Np-core pourrait interagir avec un dimère (H2A/H2B) au niveau de la boucle acide. Ainsi, la nucléoplasmine pourrait stocker jusqu'à dix dimères (H2A/H2B) par complexe.

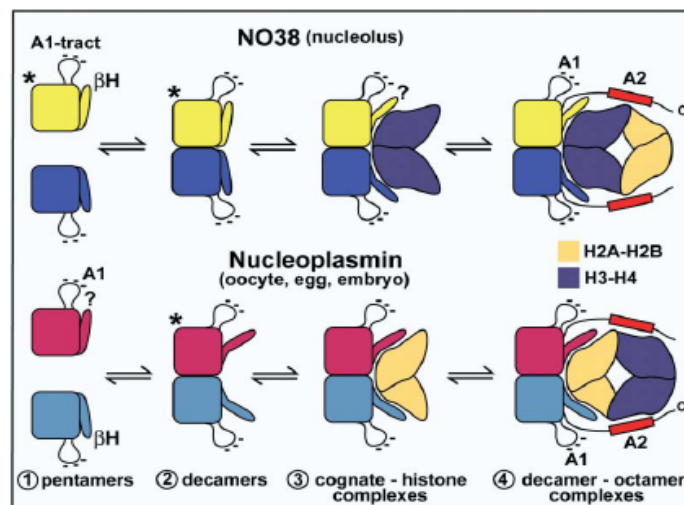


Figure 1-23 : Modèle général du mode d'interactions des histones avec NO38 et la nucléoplasmine.

Les complexes pour lesquels la structure à haute résolution est connue sont indiqués par un astérisque. Les autres sont déduits d'expériences de liaison aux histones. Par souci de clarté, seules deux sous-unité de chaque chaperon sont représentées, de couleur jaune, bleu, rose ou cyan (chaque sous-unité correspond à un pentamère) et la partie C-terminale a été omise dans la plupart des représentations. βH indique le β -hairpin formé des brins $\beta 4$ et $\beta 5$ qui s'orientent vers l'extérieur du complexe, A1 et A2 indiquent deux successions de résidus acides. Les dimères d'histones (H2A/H2B) sont colorés en orange, les dimères d'histones (H3/H4) en bleu foncé. Panneau du haut : deux sous-unités de NO38 forment un décimère qui se lie préférentiellement au tétramère (H3/H4)₂, les dimères (H2A/H2B) pourraient également interagir pour former un octamère d'histone qui serait alors stabilisé par les résidus acides (A2). Panneau du bas : deux sous-unités de la nucléoplasmine forment un décimère qui se lie aux dimères (H2A/H2B), lorsque le tétramère (H3/H4)₂ est ajouté, il complète le complexe et forme un octamère d'histones.

Une comparaison approfondie avec la structure de NO38 montre que le β -hairpin formé des brins $\beta 4$ et $\beta 5$ est moins exposé au solvant. De plus, *in vitro*, la partie globulaire de NO38 interagit plus fortement avec le tétramère (H3/H4)₂ qu'avec les dimères (H2A/H2B). De façon remarquable, des expériences biochimiques ont montré que les protéines entières Np et NO38 interagissent avec les quatre histones de cœur sans aucune préférence pour l'une ou l'autre des histones et qu'une suite de résidus acides (A2) est nécessaire à la formation de ces complexes. Dans sa publication de 2004, W. Akey propose un mécanisme de formation des complexes NO38-octamère d'histones et Np-octamère d'histones, ce mécanisme est représenté sur la Figure 1-23. La première étape est la formation d'un décimère à partir des deux pentamères, ce pentamère interagit ensuite avec les histones pour lesquelles l'affinité est la plus élevée, le tétramère (H3/H4)₂ pour NO38, les dimères (H2A/H2B) pour la nucléoplasmine. La dernière étape est l'interaction des histones complémentaires pour former l'octamère d'histones (Namboodiri, et al., 2004; Okuwaki, et al., 2001).

3.2.2. Protéines de transport des histones vers le noyau : Nap

Chez la drosophile, l'homme et les plantes, les protéines homologues de Nap-1 (Nucleosome assembly protein 1) transportent les histones du cytoplasme vers le noyau lors de la phase S de la réplication (Ishimi, et al., 1984; Ishimi, et al., 1987). Chez la levure, Nap-1 interagit avec les histones H2A/H2B au niveau du cytoplasme. Cette protéine contient également dans sa séquence un signal de localisation nucléaire (NLS) reconnu par une caryoprotéine qui lui permet de traverser la membrane par les pores nucléaires (Mosammaparast, et al., 2005). Récemment, il a été montré que Nap-1 a également la capacité d'assembler et de désassembler les histones (H2A/H2B) du tétrasome lors de processus dépendants et indépendants de la réplication. Nap-1 pourrait donc participer à l'échange d'histones lors de la transcription (Walfridsson et al., 2007).

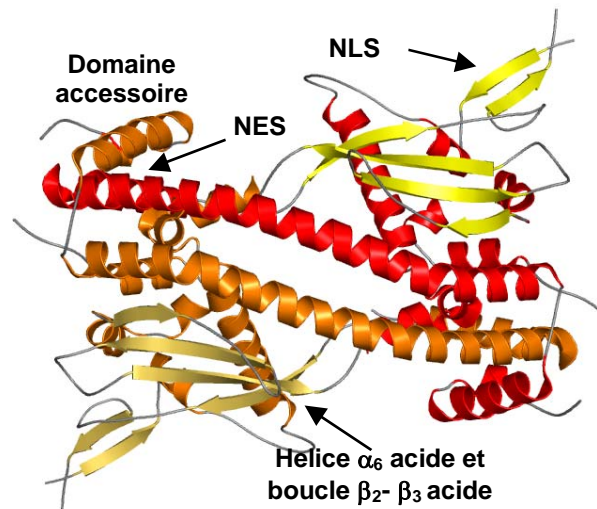


Figure 1-24 : Structure du domaine conservé de la protéine de levure Nap-1 (PDB 2ayu).

La structure est représentée en ruban en fonction de la structure secondaire. Les hélices α sont colorées en rouge ou orange foncé, les brins β en jaune ou orange clair. La protéine est dimérique. Les hélices α et les brins β du premier monomère sont respectivement colorés en rouge et en jaune. La structure du second monomère est en orange. Le signal d'export vers le noyau (NES) est situé en bout de la longue hélice qui participe à la dimérisation et est en partie caché par le second monomère. Le signal de localisation nucléaire du premier monomère est également indiqué ainsi que la boucle acide du deuxième monomère.

Deux structures de la famille NAP ont été résolues, la protéine Nap-1 de levure (Figure 1-24) et la protéine SET humaine respectivement en 2006 et 2007 (Muto, et al., 2007; Park and Luger, 2006). Bien que ces deux structures présentent quelques différences au niveau de leur partie globulaire, elles partagent de grandes similarités. Elles forment un dimère qui implique une longue hélice. Le NLS qui interagit avec la caryoprotéine est situé au niveau d'un β -hairpin très exposé au solvant. Chaque protéine possède un domaine globulaire composé de quatre brins β qui font face à trois hélices α . Ce domaine est stabilisé par un réseau de résidus aromatiques et présente une large surface acide.

Il existe peu d'informations sur le mode de liaison des protéines chaperons de la famille de Nap. *In vitro*, Nap-1 interagit avec toutes les histones (H3/H4) et (H2A/H2B). Concernant la protéine SET, elle possède une région acide d'environ 40 résidus au niveau de sa partie C-terminale. Cette partie C-terminale de SET est nécessaire pour lier l'octamère d'histones *in vitro* alors que la partie N-terminale est suffisante pour interagir avec les histones (H3/H4) et assembler les nucléosomes (Muto et al., 2007). Ce paradoxe n'est, à ce jour, pas expliqué.

3.2.3. Asf1 : une protéine de transfert des histones (H3/H4)

Rappelons que la protéine Asf1 (Anti-Silencing function 1) est un chaperon spécifique des histones (H3/H4). Asf1 est très conservée chez les eucaryotes supérieurs et participe à l'assemblage et au désassemblage des nucléosomes. Nous avons vu préalablement que Asf1 coopère avec les chaperons CAF-1 et HIRA pour assembler les histones sur l'ADN respectivement lors de la réplication et indépendamment de la réplication. Asf1 intervient également au cours de la réparation de l'ADN, de plus, il a été proposé que Asf1 permettrait de contenir l'effet toxique des histones (H3/H4) libres dans la cellule (Groth, et al., 2005). Ainsi Asf1 est une protéine multifonctionnelle qui participe à de nombreux processus cellulaires. Ce paragraphe est consacré uniquement aux aspects structuraux de la protéine Asf1, l'ensemble des fonctions biologiques d'Asf1 sera abordé dans la section suivante.

a) Analyse de la séquence du chaperon d'histones Asf1

Une étude détaillée de l'alignement de séquences des homologues d'Asf1 dans différents organismes permet d'extraire des premières informations sur l'existence de domaines.

Notons tout d'abord qu'il existe deux isoformes de Asf1 dans différents organismes dont *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Homo Sapiens*, *Mus musculus* et *Rattus norvegicus*. L'alignement des séquences des deux protéines humaines, *hAsf1A* et *hAsf1B* ainsi que celles des protéines de trois organismes modèles, la drosophile (*DmAsf1*), les levures *S. cerevisiae* (*ScAsf1*) et *S. pombe* (*SpAsf1*) est reporté sur la Figure 1-25.

Cet alignement montre l'existence de deux régions distinctes de la protéine Asf1. Les 155 premiers résidus sont très conservés d'une séquence à l'autre. A l'inverse, l'extrémité C-terminale est très variable de par la nature des résidus qui la composent et de par sa longueur. Chez *S. cerevisiae* (*ScAsf1*) et *S. pombe* (*SpAsf1*), l'extrémité C-terminale est longue et très riche en aspartates et glutamates formant des queues caractéristiques de types poly Asp/Glu (D/E). Ce type d'extrémité est également présent dans d'autres séquences de chaperons d'histones tels que la nucléoplasmine, Nap-1 de levure et la nucléoline. Elle n'est pourtant pas essentielle à la fonction de chaperon d'histone d'Asf1. Il est intéressant de noter que les deux isoformes humaines ne possèdent pas cette séquence extrêmement acide en C-terminal. La partie C-terminale de *hAsf1A* est riche en sérines et thréonines. Cette propriété se retrouve dans une moindre mesure chez *hAsf1B*.

DmAsf1	1	MAK	VH	IT	NVV	VLD	NP	SS	FF	N	PF	Q	E	L	T	F	E	C	I	E	L	K	E	D	L	E	N	K	M	I	Y	V	G	S	A	E	S	E	E	H	D	Q	V	L	D	T	I														
hAsf1A	1	MAK	VQ	V	N	N	V	VLD	NP	S	P	F	Y	N	PF	Q	E	I	T	F	E	C	I	E	D	L	S	E	D	L	E	N	K	I	I	Y	V	G	S	A	E	S	E	E	Y	D	Q	V	L	D	S	V									
hAsf1B	1	MAK	V	S	V	L	N	V	VLE	N	P	S	P	F	H	S	P	F	R	F	E	I	S	F	E	C	S	E	A	L	A	D	D	L	E	N	K	I	I	Y	V	G	S	A	E	S	E	E	F	D	Q	I	L	D	S	V					
ScAsf1	1	M	S	T	V	S	L	L	G	I	K	V	L	N	N	P	A	K	F	T	D	P	Y	E	F	E	I	T	F	E	C	L	E	S	L	K	H	D	L	E	N	K	L	T	Y	V	G	S	S	R	S	L	D	H	D	Q	E	L	D	S	I
SpAsf1	1	M	S	T	V	N	I	L	S	V	N	V	L	N	N	P	A	K	F	S	D	P	Y	K	F	E	I	T	F	E	C	L	E	S	L	K	S	D	L	E	N	K	L	T	Y	V	G	S	A	T	S	Q	S	Y	D	Q	I	L	D	T	L
DmAsf1	61	Y	V	G	P	V	P	E	G	R	H	I	F	V	F	Q	A	D	P	P	D	V	S	K	L	P	E	P	-	D	A	V	G	V	T	I	V	L	L	T	C	S	Y	R	G	Q	E	F	V	R	V	G	Y	Y	V	N	N	D	Y	--	
hAsf1A	61	L	V	G	P	V	P	A	G	R	H	M	F	V	F	Q	A	D	A	P	N	P	G	L	I	P	D	A	-	D	A	V	G	V	T	V	V	L	I	T	C	T	Y	R	G	Q	E	F	I	R	V	G	Y	Y	V	N	N	E	Y	--	
hAsf1B	61	L	V	G	P	V	P	A	G	R	H	M	F	V	F	Q	A	D	A	P	N	P	S	L	I	P	E	T	-	D	A	V	G	V	T	V	V	L	I	T	C	T	Y	H	G	Q	E	F	I	R	V	G	Y	Y	V	N	N	E	Y	--	
ScAsf1	61	L	V	G	P	V	P	V	G	V	N	K	F	V	F	S	A	D	P	S	A	E	L	I	P	A	S	-	E	L	V	S	V	T	V	I	L	L	S	C	S	Y	D	G	R	E	F	V	R	V	G	Y	Y	V	N	N	E	Y	--		
SpAsf1	61	L	V	G	P	I	P	I	G	I	N	K	F	V	F	E	A	D	P	P	N	I	D	L	L	P	Q	L	S	D	V	L	G	V	T	V	I	L	L	S	C	A	Y	E	D	N	E	F	V	R	V	G	Y	Y	V	N	N	E	M	E	G
DmAsf1	117	---	A	D	P	E	M	R	E	N	P	P	T	K	P	L	F	E	K	L	T	R	N	I	L	A	S	K	P	R	V	T	R	F	K	I	N	W	D	Y	G	H	I	N	G	N	G	V	E	N	G	H	Q	D	E	M	A				
hAsf1A	117	---	T	E	T	E	L	R	E	N	P	P	V	K	P	D	F	S	K	L	Q	R	N	I	L	A	S	N	P	R	V	T	R	F	H	I	N	W	E	D	N	T	E	K	L	E	D	A	E	S	S	N	P	N	L	Q	S	L	L		
hAsf1B	117	---	L	N	P	E	L	R	E	N	P	P	M	K	P	D	F	S	Q	L	Q	R	N	I	L	A	S	N	P	R	V	T	R	F	H	I	N	W	D	N	N	M	D	R	L	E	A	T	E	T	Q	D	P	S	L	G	C	G	L		
ScAsf1	117	---	D	E	E	E	L	R	E	N	P	P	A	K	V	Q	V	D	H	I	V	R	N	I	L	A	E	K	P	R	V	T	R	F	N	I	V	W	D	N	E	N	E	G	D	L	Y	P	P	E	Q	P	G	V	D	D	E	E	E		
SpAsf1	121	L	N	L	Q	E	M	D	D	A	E	I	K	K	V	K	V	D	I	S	K	V	W	R	S	I	L	A	E	K	P	R	V	T	R	F	N	I	Q	W	D	N	P	D	F	D	D	A	P	P	V	Q	P	D	A	D	E	E	E	E	E
DmAsf1	175	T	D	G	P	S	T	S	E	A	A	S	A	V	I	H	P	E	D	D	N	S	L	A	M	P	M	E	N	G	I	K	A	L	N	E	N	S	N	S	L	A	M	E	C																
hAsf1A	175	S	T	D	A	L	P	S	A	S	K	G	W	S	T	S	E	N	S	L	N	V	M	L	E	S	H	M	D	C	M																														
hAsf1B	175	P	L	N	C	T	P	--	I	K	G	L	G	L	P	G	C	I	P	G	L	L	P	E	N	S	M	D	C	I																															
ScAsf1	175	E	D	D	E	E	E	D	D	D	E	D	D	E	D	D	D	D	D	Q	E	D	G	E	G	E	A	E	E	A	A	E	E	E	E	E	E	E	E	E	T	E	D	N	E	T	N	L	E	E	E	E	E	D	I	E	N	S	D	G	
SpAsf1	181	E	E	A	D	E	M	E	E	E	F	D	E	E	G	E	G	D	E	E	E	E	E	E	D	D	G	D	G	D	G	E	G	D	G	D	G	E	G	E	N	D	G	K	G	S	E	E	E	E	E	E	E	I	D	I	E	E	E	E	E
DmAsf1	218																																																												
hAsf1A	204																																																												
hAsf1B	202																																																												
ScAsf1	235	D	E	E	E	G	E	E	V	G	S	V	D	K	N	E	D	G	N	D	K	K	R	R	K	I	E	G	G	S	T	D	I	E	S	T	P	K	D	A	A	R	S	T	N																
SpAsf1	241	E	S	A	L	A	N	A	S	A	A	E	E	K	P	E	E	K	P	E	T	S	Q																																						

Figure 1-25 : Alignement des séquences de cinq protéines Asf1

Alignement des séquences de cinq protéines Asf1, la protéine de *Drosophila melanogaster* (DmAsf1), celle de *Saccharomyces cerevisiae* (ScAsf1), de *Schizo saccharomyces pombe* (SpAsf1) et les deux protéines humaines (hAsf1A et hAsf1B).

b) Analyse de la structure de Asf1

La structure tridimensionnelle de la partie N-terminale conservée de hAsf1A humain a été résolue par RMN dans notre laboratoire par F. Mousson en 2004 et celle de *S. cerevisiae* a été résolue par cristallographie dans l'équipe de Kaufman en 2003 (Daganzo, et al., 2003; Mousson, et al., 2005). Les deux protéines présentent 58% d'identité de séquence et un repliement identique de type immunoglobuline en feuillets β surmontés par deux petites hélices (Figure 1-26). Trois boucles sont divergentes entre les domaines N-terminaux des protéines hAsf1A et ScAsf1. Il s'agit des boucles comprenant les résidus A48-Y53, N80-G91 et E118-F132 qui connectent respectivement les brins β β 4- β 5, β 6- β 7 et β 8- β 9 et dont les séquences présentent un faible taux d'identité de séquence (24%).

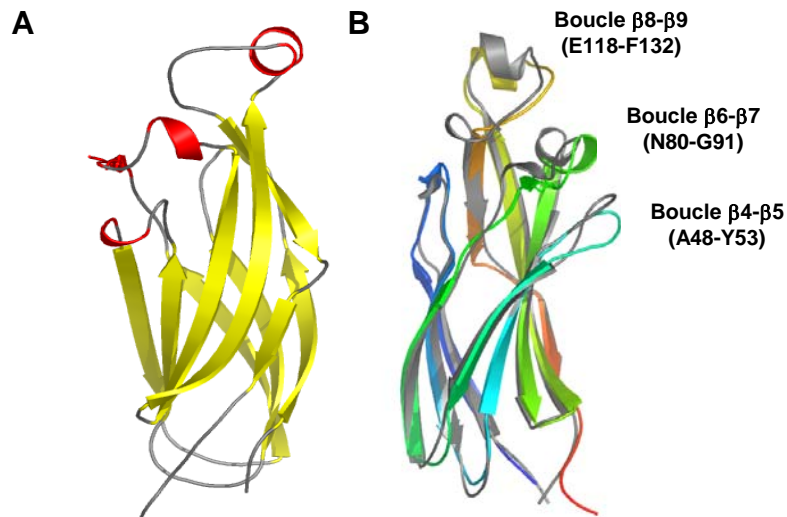


Figure 1-26 : Structure de *hAsf1* (1-156)

Représentation sous forme de ruban de la structure tridimensionnelle obtenue par RMN de la partie N-terminale (1-156) de *hAsf1A* (PDB : 1tey)

- a) Seule en fonction de la structure secondaire, les brins β sont colorés en jaune et les hélices α en rouge.
- b) Superposée avec la structure tridimensionnelle obtenue par cristallographie de la partie N-terminale de *Asf1* de *S. cerevisiae* colorée en gris (PDB : 1roc). *hAsf1A* est colorées en arc-en-ciel, de la couleur bleu pour la partie C-terminale à la couleur rouge pour la partie N-terminale. Les divergences structurales entre les deux protéines sont indiquées.

Suite à ces résultats, F. Mousson a entrepris d'étudier l'interaction entre *Asf1A* et les histones (H3/H4) par RMN. Comme ce complexe a un poids moléculaire élevé, la résolution par RMN serait difficile voire impossible. En conséquence, F. Mousson a étudié l'interaction entre le domaine globulaire de *hAsf1* et une région de l'histone H3. En effet, des travaux ont montré que i) l'extrémité C-terminale non conservée de *ScAsf1* n'est pas nécessaire à l'interaction avec les histones H3/H4 (Umehara, et al., 2002) et ii) l'extrémité C-terminale de l'histone H3 (97 à 135) interagit avec *hAsf1* (Munakata, et al., 2000). Par la suite, F. Mousson a montré lors de sa thèse que la région C-terminale de l'histone H3 correspondant à l'hélice $\alpha 3$ C-terminale (122-135) est suffisante à l'interaction avec *hAsf1A*.

Elle a ensuite cartographié la région d'interaction de ce peptide sur *hAsf1A* (1-156). Cette cartographie, représentée sur la Figure 1-27, a été réalisée par la mesure des variations de déplacements chimiques de *hAsf1A* (1-156) mesurées après ajout du fragment H3 (122-135). Nous pouvons observer sur cette cartographie que l'hélice $\alpha 3$ C-terminale de l'histone H3 interagit avec une zone restreinte de la protéine *Asf1*. Cette région est composée de résidus hydrophobes très conservés entourés de résidus chargés. Parmi les résidus affectés par l'ajout du fragment H3 (122-135) se trouvent la valine V94 ainsi que les résidus chargé D54 et

R108. A proximité, se trouve une boucle située entre les brins β_3 et β_4 qui est exposée au solvant.

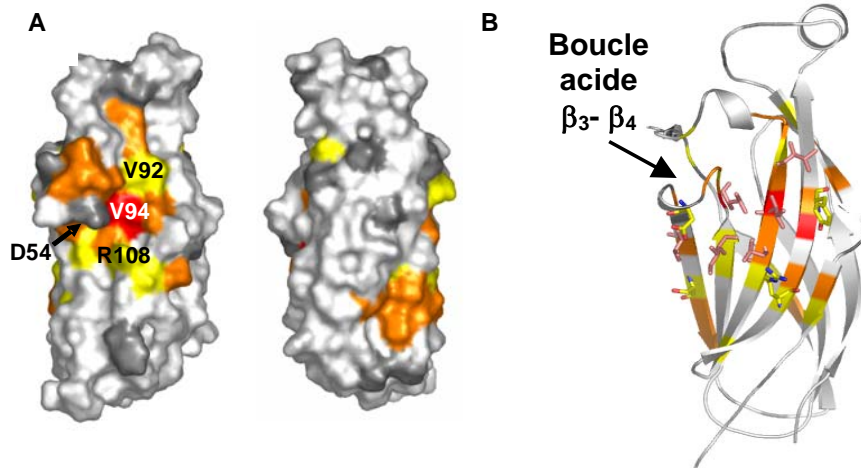


Figure 1-27 : Localisation de la région d'interaction de l'histone H3 sur Asf1 obtenue par RMN.

A) Représentation sur la surface de hAsf1A1-156 des résidus affectés par la présence de l'histone H3 (122-135) sur deux vues de la protéine. Les résidus colorés en orange ont leurs déplacements chimiques très affectés (> 0.3 ppm), les résidus colorés en jaune ont leurs déplacements chimiques moyennement affectés ($0.2 < \Delta\delta < 0.3$ ppm), les résidus colorés en gris clair ont leurs déplacements chimiques faiblement affectés (< 0.2 ppm). Les résidus gris foncé sont ceux pour lesquels il n'a pas été possible de déterminer un effet. Les résidus interagissant avec les histones (H3/H4) entières et vérifiés par GST-pulldown sont indiqués. Cette région se caractérise par un patch de résidus hydrophobes centré sur la valine V94 et entouré de résidus chargés.

B) Localisation sur Asf1, représentée en ruban, des résidus en d'interaction avec l'histone H3 obtenu par RMN. La boucle acide participant à l'interaction est indiquée.

L'implication de cette région dans l'interaction avec les histones natives (H3/H4) entières a été validée par GST-pulldown par A. Lautrette (Figure 1-28). En effet la mutation de la valine V94 en arginine abolit totalement l'interaction avec les histones (H3/H4) native. La mutation de résidus proches du cœur de l'interface telles que celles de l'aspartate D54 en arginine et de l'arginine R108 en glutamate affaiblissent l'interaction. En revanche la mutation de résidus en dehors de cette région comme par exemple le mutant *hAsf1* D37R+E39R n'influence pas l'interaction avec les histones (H3/H4) natives.

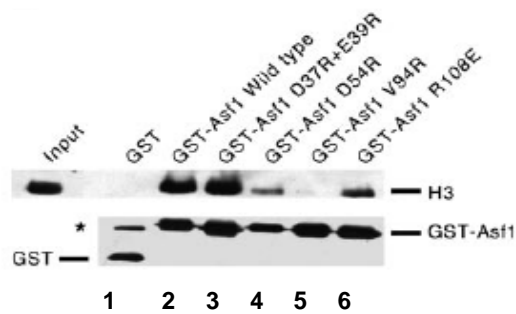


Figure 1-28 : Interactions des mutants d'Asf1 avec les histones (H3/H4) natives

Western blot des électrophorèses SDS-PAGE d'échantillons issus d'expériences d'interaction GST-pulldown entre les histones entières et différents mutants de Asf1 : et (His)₆-GST (puits 1), (His)₆-GST-*h*Asf1 (1-156) (puits2), (His)₆-GST-*h*Asf1 (1-156)-D37R+E39R (puits 3), (His)₆-GST-D54R (puits 4), (His)₆-GST-V94R (puits 5), (His)₆-GST-R108E (puits 7). L'input correspond au dépôt des histones initiales. L'histone H3 est révélée par un anticorps reconnaissant la partie C-terminale de l'histone H3 (panneau du haut). Les protéines de fusion (His)₆-GST sont révélées avec un anticorps anti-(His)₆.

L'ensemble de ces résultats montre que Asf1 interagit avec les histones par une interface hydrophobe spécifique qui fait probablement intervenir un agencement particulier des chaînes latérales apolaires et chargées, et non des interactions électrostatiques non spécifiques. Ainsi, F. Mousson et A. Lautrette ont obtenu les premières informations structurales entre une protéine chaperon et sa cible (Mousson et al., 2005).

Malgré ces avancées, plusieurs questions restaient en suspend : quelles sont les bases de la reconnaissance spécifique des histones pour leur chaperon ? Quelle est la stœchiométrie du complexe Asf1 avec les histones ? Interagit-elle avec une forme hétérodimérique (H3/H4) ou une forme hétérotétramérique (H3/H4)₂? Comment Asf1 interagit-elle avec les histones en présence des autres chaperons CAF-1 et HIRA ?

c) Analyse du mode d'interactions entre Asf1, CAF-1, HIRA et les histones H3/H4

Rappelons que, *in vivo*, Asf1 n'agit pas seule mais coopère avec CAF-1 et HIRA pour assembler les nucléosomes lors de la réplication et de la transcription respectivement. De plus, il a été montré que, *in vitro*, Asf1 améliore l'efficacité des protéines chaperons CAF-1 et HIR dans l'assemblage des histones (H3/H4) sur l'ADN (Mello et al., 2002; Sharp et al., 2001; Tyler et al., 2001; Zhang, et al., 2005). Pourtant, les mécanismes moléculaires associés n'ont toujours pas été déterminés. Actuellement, très peu d'informations structurales sont disponibles concernant les chaperons CAF-1 et HIR, les seules données proviennent de leur séquence.

Le chaperon CAF-1 se compose dans la plupart des espèces de trois sous-unités, une grande, une moyenne et une petite. Chez l'homme, ces trois sous-unités correspondent respectivement à p150, p60 et p48 et chez *S. cerevisiae* à Cac1, Cac2 et Cac3. Les sous-unités p60 et p48 sont supposées se replier sous la forme d'un β -propeller. CAF-1 interagit avec les histones H3/H4 par l'intermédiaire de sa grande sous-unité p150, sous-unité qui interagit également avec PCNA lors de la réplication. Ce chaperon interagit avec Asf1 via sa sous-unité p60.

Quant-au chaperon HIRA, il est également prédit pour se replier sous la forme d'un β -propeller. La séquence de la protéine humaine HIRA ressemble à une fusion des deux séquences homologues de levure Hir1p et Hir2p et chacun des ces isoformes interagit avec la protéine *ScAsf1* (Daganzo et al., 2003; Zheng et al., 2005). Chez l'homme, il en va tout autrement, alors que *hAsf1A* interagit avec HIRA, l'isoforme *hAsf1B* ne lie pas HIRA. Il s'agit de la première différence fonctionnelle connue entre les isoformes humain d'Asf1.

En 2006, la structure d'Asf1 en complexe avec un peptide de HIRA, correspondant au domaine B connu pour interagir avec Asf1, a été résolue (Figure 1-29). Cette structure apporte de nouvelles données sur la coopération entre Asf1, CAF-1, HIRA et les histones (H3/H4). En effet, cette structure montre que le domaine B de HIRA forme un β -hairpin parallèle à l'un des feuillets β de Asf1 et que cette interaction a lieu sur la face opposée de la région d'interactions des histones (H3/H4) avec Asf1 (Tang, et al., 2006). Ce résultat est cohérent avec le fait que les interactions d'Asf1 avec Hir et les histones (H3/H4) ne sont pas exclusives. Cette étude montre également que la sous-unité p60 de CAF-1 contient une séquence similaire à celle du domaine B de HIRA et que ce domaine interagit avec Asf1. Ainsi, Asf1A pourrait lier simultanément les histones (H3/H4) avec HIRA ou CAF-1 alors qu'Asf1B ne pourrait s'associer simultanément qu'avec les histones (H3/H4) et CAF-1.

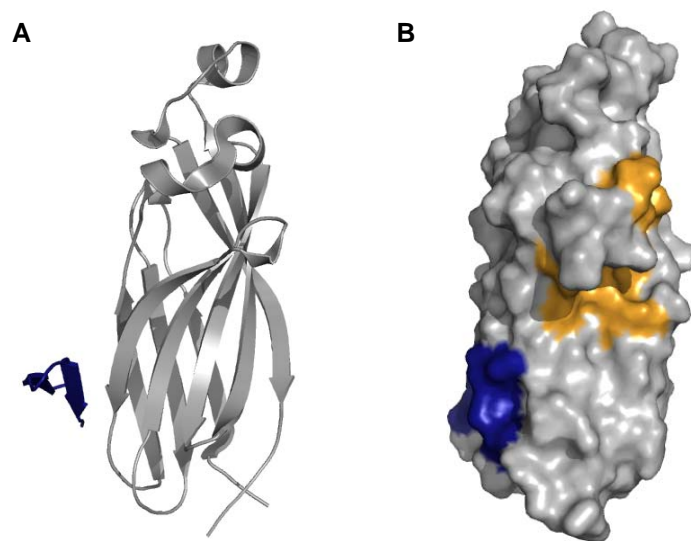


Figure 1-29 : Structure de Asf1A en complexe avec le domaine B de liaison de HIRA (PDB : 2i32).

A) Asf1 est représenté en ruban gris, le domaine B de HIRA est représenté en ruban bleu. B) Représentation sur la surface d'Asf1 des zones d'interactions du domaine B de HIRA coloré en bleu et de l'histone H3 coloré en orange. Les deux surfaces d'interactions sont situées sur des régions opposées de Asf1 et sont donc compatibles simultanément.

4. Asf1 : une protéine chaperon d'histone (H3/H4) multifonctionnelle

Au cours de la section précédente nous avons décrit la structure de la protéine Asf1 seule et en interaction avec d'autres partenaires. Nous avons soulevé de nombreuses questions concernant les mécanismes moléculaires qui gouvernent les relations entre Asf1, les histones, CAF-1 et HIR. Ces questions se posent dans un contexte biologique particulier. Dans cette section, nous allons par conséquent nous intéresser aux aspects fonctionnels de la protéine Asf1. Après une brève introduction sur l'historique de la découverte de la protéine Asf1, le rôle de Asf1 dans les différents processus nucléaires tels que la réplication, la réparation, la répression des gènes situés dans l'hétérochromatine puis la régulation de la transcription des gènes sera détaillé.

Asf1 a initialement été identifiée en 1997 comme étant impliquée dans le phénomène de répression de gène (ou « silencing »). Sa surexpression chez *S. Cerevisiae* supprime ce phénomène d'où son nom *Anti-Silencing Function 1* (Le, et al., 1997). Depuis sa découverte, de nombreuses études ont montré qu'Asf1 est une protéine chaperon d'histones dont le rôle biologique est multiple. En effet, Asf1 est nécessaire à des processus divers comme la répression de la transcription de certains gènes (Le et al., 1997; Sharp et al., 2001; Tyler et al., 1999), le maintien de la stabilité génomique au cours de la réplication (Myung, et al., 2003;

Prado, et al., 2004) et intervient également dans la réparation des dommages de l'ADN (Emili, et al., 2001; Hu, et al., 2001; Recht et al., 2006). Un autre aspect de la fonction chaperon d'histones d'Asf1 a été mis en évidence en 2005. Lors de la réplication, Asf1 stocke l'excès d'histones nouvellement synthétisées dans les cellules mammifères (Groth et al., 2005). Ainsi, Asf1 jouerait également le rôle de tampon d'histones (H3/H4). Les mécanismes impliquant Asf1 dans l'ensemble de ces processus continuent à faire l'objet de nombreuses investigations.

4.1. Asf1 : un chaperon d'histones au statut particulier

Bien que le rôle de la protéine Asf1 dans l'assemblage et le désassemblage des nucléosomes soit désormais bien établi, il semble que sa fonction de chaperon d'histones soit particulière. En effet, une étude récente menée par l'équipe de G. Almouzni montre que contrairement aux protéines CAF-1 et HIRA, Asf1 seule ne permet pas la reconstitution de nucléosomes dans des extraits cellulaires d'œufs de Xénope que ce soit lors de la réplication ou indépendamment de la réplication (Ray-Gallet, et al., 2007). Les auteurs suggèrent qu'Asf1 pourrait jouer le rôle de passeur d'histones qui ne participerait pas directement à l'assemblage des nucléosomes. De plus, les mêmes auteurs observent que quand la protéine Asf1 est supprimée des extraits cellulaires d'œufs de Xénope, elle entraîne avec elle le chaperon HIRA mais pas CAF-1. Ils proposent que la majorité des protéines HIRA dans les ovocytes de xénopes forment un complexe stable avec Asf1. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre le mode d'intervention de Asf1 dans l'assemblage des nucléosomes : Asf1 participe-t-elle de manière active à l'assemblage des nucléosomes? Ou Asf1 permet-elle uniquement de transmettre les histones à d'autres chaperons effecteurs de l'assemblage des nucléosomes? Autrement dit, quelles sont les bases moléculaires de la coopération entre Asf1 et CAF-1 d'une part et Asf1 et HIRA d'autre part dans l'assemblage des nucléosomes?

4.2. Rôle de Asf1 lors de la réplication

Chez *S. cerevisiae*, Asf1 intervient dans la stabilité du réplisome lors de la réplication probablement grâce à son interaction avec le facteur de réplication C (RFC) chez la levure, à sa coopération avec l'hélicase MCM2-7 chez l'homme d'une part, et à son interaction avec la sous unité p60 de CAF-1 chez tous les organismes (Franco et al., 2005; Groth, et al., 2007; Guenther et al., 2007). Asf1 se trouve donc au cœur de la machinerie de réplication. La Figure 1-30 représente certains de ces acteurs dont la protéine Asf1 au sein du réplisome. En accord

avec cette position centrale, Asf1 est essentielle pour la viabilité des cellules de levure *S. pombe*, de la drosophile et de poulet DT40 (Krawitz et al., 2002; Mello et al., 2002; Sanematsu et al., 2006; Tang et al., 2006; Tyler et al., 2001). La délétion de la protéine chaperon d'Asf1 (*Asf1Δ*) provoque de graves problèmes dans la progression de la fourche de réplication et dans le réassemblage de la chromatine après le passage de la machinerie de réplication (Groth et al., 2005; Sanematsu et al., 2006; Schulz and Tyler, 2006). Des foyers présentant des histones H2AX sont détectées dans les cellules *Asf1Δ* (Sanematsu et al., 2006). Sachant que ces foyers sont caractéristiques de la présence de cassures double brins de l'ADN, il est probable que les problèmes d'assemblage de la chromatine donnent lieu à des dommages de l'ADN. Les voies de signalisation des dommages induisent l'activation des protéines de réparation de l'ADN et éventuellement l'entrée en apoptose de la cellule.

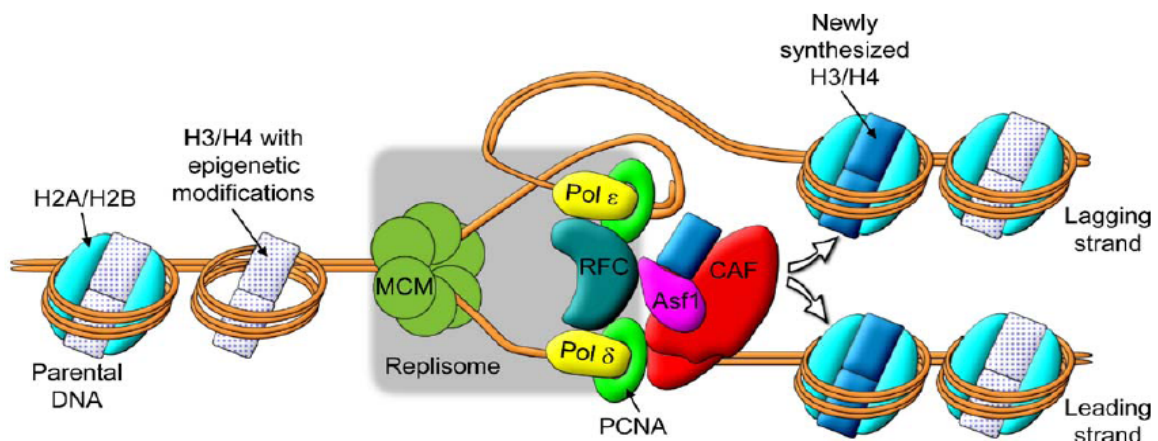


Figure 1-30 : Mécanisme possible de l'assemblage de nucléosomes impliquant la protéine Asf1 lors de la réplication

Les données biochimiques suggèrent qu'Asf1 et CAF-1 coopèrent pour assembler les histones sur l'ADN lors de la réplication. CAF-1 est associée à la fourche de réplication par son interaction avec PCNA et Asf1 pourrait interagir de façon transitoire avec RFC (Franco et al., 2005). Les données génétiques à partir de *S. Cerevisiae* suggèrent qu'Asf1 aurait des fonctions d'assemblage des histones indépendamment de CAF-1 lors de la réplication. D'autres fonctions ont été mises en évidence. Il a été montré qu'Asf1 désassemble les histones (H3/H4) parentales en amont de la fourche de réplication en coopération avec l'hélicase MCM2-7 et facilite leur réassemblage (Groth et al., 2007).

De façon surprenante, chez *S. cerevisiae* la délétion du gène d'Asf1 n'est pas létale. Cette délétion entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation des dommages de l'ADN (Le et al., 1997; Prado et al., 2004; Ramey, et al., 2004; Singer, et al., 1998; Tyler et al., 1999). Ces résultats suggèrent que l'assemblage des nucléosomes associé à la réplication peut être réalisé par d'autres chaperons d'histones de *S. cerevisiae*. Plusieurs

études semblent confirmer cette hypothèse. Notamment, des études génétiques montrent que les chaperons d'histones Asf1 et CAF-1 ont des fonctions redondantes (Tyler et al., 1999). Ainsi, dans les cellules de *S. cerevisiae* CAF-1 pourrait prendre le relais d'Asf1. Pourtant, les cellules pour lesquelles les deux gènes de Asf1 et de CAF-1 ont été supprimés restent viables (Tyler et al., 1999). Ces résultats suggèrent que d'autres protéines chaperons, comme par exemple le chaperon Vsp75 nouvellement découvert, ou des chaperons encore inconnus chez *S. cerevisiae*, prennent en charge les histones (H3/H4) pour les déposer sur l'ADN en absence de Asf1 et de CAF-1 (Selth and Svejstrup, 2007).

4.3. Asf1 et la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN

Asf1 est nécessaire à la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Deux propriétés sont probablement reliées à cette fonction d'Asf1. D'une part Asf1 participe à la régulation de la forme active d'une protéine de signalisation des dommages de l'ADN, le checkpoint Rad53. D'autre part Asf1 est requis pour l'acétylation de la lysine K56 de l'histone H3, modification post-traductionnelle nécessaire lors de la réparation de l'ADN.

4.3.1. Asf1 et Rad53

Chez *S. cerevisiae* Asf1 interagit avec une protéine de signalisation de dommages de l'ADN, il s'agit du checkpoint Rad53. Sous l'effet d'un stress génotoxique Rad53 est hyperphosphorylée par la protéine Mec1 et n'interagit plus avec Asf1 (Emili et al., 2001; Hu et al., 2001). Rad53 contient deux domaines FHA connus pour interagir avec des résidus phosphorylés. Des expériences menées par A. Lautrette au laboratoire ont montré que le domaine FHA1 de Rad53 interagit avec la queue C-terminale phosphorylée de ScAsf1 et la queue C-terminale de Rad53 interagit avec la partie N-terminale conservée de ScAsf1. Par ailleurs, Rad53 et les histones (H3/H4) sont des partenaires exclusifs d'Asf1. (Emili et al., 2001; Hu et al., 2001). L'ensemble de ces données est à l'origine de modèles moléculaires traduisant l'implication d'Asf1 dans la réponse aux dommages de l'ADN chez *S. Cerevisiae*.

Un de ces modèles, illustré sur la Figure 1-30, présente le complexe Asf1/Rad53 comme précurseur de l'activation de la signalisation des dommages de l'ADN. La phosphorylation de Rad53 par Mec1 suite à un dommage de l'ADN libère Rad53 sous sa forme active. Une fois libérée de son interaction avec Rad53, Asf1 peut se lier aux histones (H3/H4) et/ou à d'autres partenaires. Actuellement, l'action précise d'Asf1 n'est pas déterminée. Asf1 pourrait rendre l'ADN plus accessible à la machinerie de réparation de l'ADN ou aux protéines de remodelage de la chromatine ou bien contribuer à l'assemblage d'histones

nouvellement synthétisées. D'autre part l'association d'Asf1 avec Rad53 pourrait permettre de maintenir la kinase sous sa forme inactive en l'absence de dommages de l'ADN. Un tel modèle est cependant difficilement vérifiable. En effet, les cellules pour lesquelles le gène d'Asf1 a été supprimé présentent plus de dommages endogènes de l'ADN que les cellules sauvages. Il n'est donc pas possible de conclure si l'activation de Rad53 dans les cellules *asf1Δ* en l'absence de stress génotoxiques est due à un effet direct de l'absence d'Asf1 ou à la présence de dommages de l'ADN engendrée par l'absence d'Asf1.

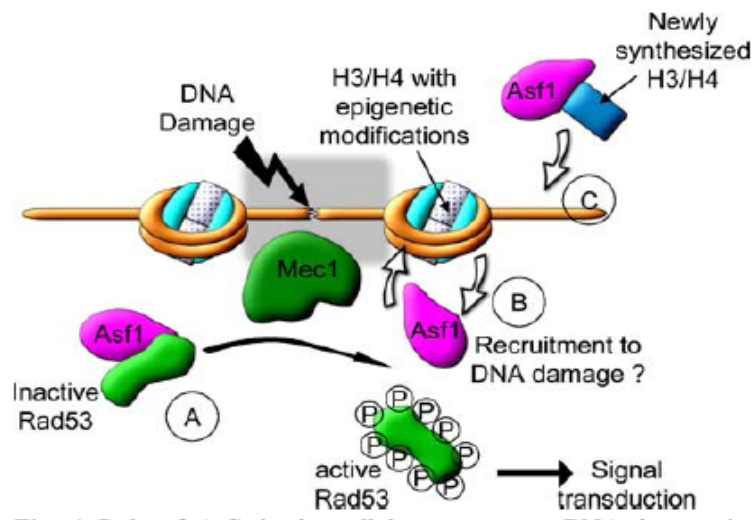


Figure 1-31 : Rôle d'Asf1 dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN chez *S. cerevisiae*

En l'absence de dommage, Asf1 interagit avec la protéine Rad53 inactive (A). En réponse à un stress génotoxique, Rad53 est recrutée sur les sites de dommage de l'ADN où Rad53 est phosphorylée et activée via un processus faisant intervenir de la phosphorylation par la kinase Mec1. Asf1 se dissocie de la forme phosphorylée de Rad53. Cette dissociation pourrait faciliter la réponse de la cellule face aux dommages de l'ADN selon un mécanisme encore indéterminé. Cela pourrait faire intervenir l'assemblage et/ou le désassemblage des histones couplé à la réparation de l'ADN (B) ou l'assemblage d'histones nouvellement synthétisées (C). L'acétylation de la lysine H3K56 n'est pas observée en absence d'Asf1 et est importante dans la résistance cellulaire à l'hydroxyurée (Recht et al., 2006).

De nombreuses études ont montré que les cellules *Asf1Δ* sont sensibles à une grande variété d'agents génotoxiques dont l'hydroxyurée (HU) le méthyl-méthane-sulfonate (MMS), la camptothécine (CPT) (Emili et al., 2001; Hu et al., 2001; Le et al., 1997; Mousson et al., 2005; Ramey et al., 2004; Tamburini, et al., 2005). Ces traitements induisent des effets génotoxiques distincts et n'ont pas les mêmes phénotypes sur les cellules *Asf1Δ*. En effet, en présence de HU, Rad53 n'est pas hyperphosphorylée comme dans les autres stress et la division cellulaire n'est pas efficace. Ce phénotype suggère que l'activation de Rad53 est perturbée en absence d'Asf1 (Hu et al., 2001). Par contre, en présence de MMS, la phosphorylation de Rad53 semble normale. Ces différences phénotypiques concernant l'activation de Rad53 indiquent qu'Asf1 possède des fonctions distinctes dans la réponse cellulaire selon le stress

génétoxique subit. Il apparaît également qu'Asf1 n'est pas nécessaire pour la réparation de l'ADN suite à une exposition aux UV.

Chez les mammifères Chk2 est l'orthologue de Rad53. Malgré la forte identité de séquence entre Chk2 et Rad53, aucune interaction entre Chk2 et Asf1 n'a été observée (Groth et al., 2005). Néanmoins, Asf1 est impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN dans les cellules mammifères. En 2001, Sillje et Nigg ont montré que les isoformes humaines Asf1A et Asf1B sont les substrats des kinases « Tousled-like », Tlk1 et Tlk2, lors de la réplication (Sillje and Nigg, 2001). Cette famille de kinases est conservée chez les métazoaires. Lors de la phase S, les kinases Tlk1/2 sont activées et phosphorylent Asf1A et Asf1B. En réponse à un stress génotoxique, Tlk1/2 sont inactivées ce qui empêche la phosphorylation de Asf1 (Groth et al., 2003; Krause, et al., 2003). Le rôle de la phosphorylation d'Asf1 par Tlk1/2 est actuellement inconnu.

4.3.2. Asf1 et l'acétylation de la lysine K56 de l'histone H3

Récemment, Asf1 a été montrée comme nécessaire pour l'acétylation de la lysine K56 de l'histone H3 (H3K56) chez *S. cerevisiae* (Recht et al., 2006). Cette acétylation a principalement lieu lors de phase S sur des histones nouvellement synthétisées (Masumoto, et al., 2005). La déacétylation de la lysine H3K56 a lieu lors de la phase G2 et les histones déacétylases Hst3 et Hst4 contribuent à cette régulation (Masumoto et al., 2005). Ces enzymes sont réprimées suite à un dommage de l'ADN via une voie de signalisation dépendante de Rad53-Mec1. Le maintien de l'acétylation de la lysine H3K56 est vital pour la survie cellulaire suite à un dommage de l'ADN (Arkin, 2005; Maas, et al., 2006). L'acétylation de la lysine K56 est également retrouvée chez *Schizosaccharomyces* et chez la drosophile mais pas chez les mammifères où la lysine K56 est plus probablement méthylée (Recht et al., 2006; Xu, et al., 2005). Il est intéressant de noter qu'un mutant de l'histone H3K56R non acétylable présente une sensibilité aux dommages de l'ADN aussi important qu'un mutant de Asf1 (Masumoto et al., 2005). Par contre, l'expression d'un mutant qui mime l'acétylation H3K56Q supprime partiellement la sensibilité à HU et les défauts de croissance des cellules *asf1Δ* (Recht et al., 2006). Ces résultats montrent qu'Asf1 est impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN et que ce rôle est en partie rempli via l'acétylation de H3K56.

4.4. Rôle de Asf1 dans le maintien du silencing au sein de l'hétérochromatine

Les trois protéines chaperons Hir, CAF-1 et Asf1 sont impliquées dans le maintien de l'hétérochromatine. De nombreuses études génétiques tendent à montrer que Asf1 et Hir sont impliquées dans l'établissement de l'hétérochromatine par une voie indépendante et parallèle à celle de CAF-1 chez la levure (Kaufman, et al., 1998; Krawitz et al., 2002; Sharp et al., 2001, Singer; Singer et al., ; Sutton, et al., 2001). De plus, la coopération entre Asf1 et Hir dans l'assemblage des nucléosomes contribue à la formation d'hétérochromatine chez la levure (Daganzo et al., 2003; Mousson et al., 2005).

Depuis peu, un mécanisme de régulation de la formation de l'hétérochromatine au niveau des télomères est proposé, il est schématisé sur la Figure 1-32. Ce mécanisme fait intervenir Asf1 à travers ses interactions avec le complexe acétyltransférase sas2 (Meijsing and Ehrenhofer-Murray, 2001; Osada, et al., 2005). Ce complexe est formé des trois sous-unités sas2, la sous-unité catalytique, sas4 et sas5 dont la fonction n'est pas connue. Asf1 interagit avec la sous-unité sas4 *in vitro*. Sas2 acétyle l'histone H4 sur la lysine K16. Cette modification empêche l'interaction de la protéine Sir sur la chromatine (Suka, et al., 2002). La formation de l'hétérochromatine télomérique nécessite la polymérisation de Sir sur les nucléosomes non acétylés. Ainsi, en acétylant la lysine H4K16, le complexe sas2 contribue à délimiter les zones d'hétérochromatine (Osada et al., 2005). Il est également possible que l'interaction entre Asf1 et Rad53 régule l'action de Asf1 dans la formation de l'hétérochromatine télomérique (Sharp et al., 2005).

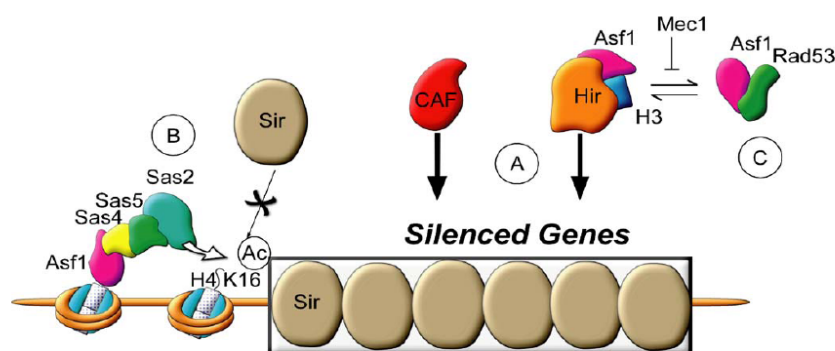


Figure 1-32 : Implication d'Asf1 dans la formation de l'hétérochromatine télomérique.

Asf1 et Hir coopèrent pour établir l'hétérochromatine par une voie indépendante et parallèle à CAF-1 (A). Asf1 interagit avec Hir et le complexe ternaire Asf1/Hir/(H3/H4) en coopération avec d'autres facteurs, cela pourrait contribuer à la formation de l'hétérochromatine. Asf1 participe également à la formation de l'hétérochromatine via son interaction avec le complexe sas2. Ce complexe est formé des trois sous-unités sas2, la sous-unité catalytique, sas4 et sas5. Asf1 interagit avec la sous-unité sas4 *in vitro* et Sas2 acétyle l'histone H4 sur la lysine K16. La formation de l'hétérochromatine télomérique nécessite la polymérisation de Sir sur des nucléosomes non acétylés. En acétylant la lysine H4K16, le complexe sas2 contribue à délimiter les zones d'hétérochromatine (B). En interagissant avec Asf1, Rad53 régule la quantité d'Asf1 compétente pour établir l'hétérochromatine (C).

Chez les mammifères, Asf1 et HIRA participent à la formation des foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) (Zhang et al., 2005). Ces foci sont formés lorsque des cellules normales entrent en sénescence après avoir subi un nombre important de divisions cellulaires. Les SAHF sont supposés participer au maintien de l'état de sénescence en réprimant les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. La formation des SAHF est également provoquée par l'expression d'oncogènes. Dans ce contexte, l'entrée de la cellule en sénescence est un moyen pour la cellule d'empêcher qu'elle ne devienne cancéreuse. Asf1 est nécessaire pour induire l'entrée en sénescence provoquée par l'expression d'oncogènes Ras actif (Zhang et al., 2005).

4.5. Rôle d'Asf1 dans la régulation de la transcription

L'implication de l'assemblage et du désassemblage des histones dans les mécanismes de régulation des gènes est un phénomène découvert très récemment (Williams and Tyler, 2007).

Une étude a montré que Asf1 est nécessaire à l'initiation de la transcription de certains gènes. Ces expériences ont été menées sur un gène codant pour une phosphatase qui régule le taux de phosphate chez *S. cerevisiae*. L'expression de cette phosphatase est modulée par le taux de phosphate dans la cellule. Lorsque le taux est faible, l'expression du gène est activée via la fixation de deux co-activateurs Pho2 et Pho4 au niveau de son promoteur. Un modèle d'activation du gène *PHO5* est illustré sur la Figure 1-33 (Adkins, et al., 2007) : en présence d'une quantité suffisante de phosphate dans la cellule, le gène *PHO5* n'est pas exprimé. Quatre nucléosomes sont positionnés sur le promoteur et empêchent les co-activateurs d'accéder à leur site de reconnaissance de l'ADN. Lorsque le phosphate est en faible quantité dans la cellule, les complexes de remodelage SWI/SNF et SAGA aident les co-activateurs de la transcription à accéder à leur site de reconnaissance de l'ADN. La fixation des co-activateurs entraîne une déstabilisation des nucléosomes situés au niveau du promoteur ce qui permet à Asf1 de désassembler les nucléosomes. Les complexes SWI/SNF et SAGA ainsi que la machinerie de transcription sont ensuite recrutés sur l'ADN nu. Ce modèle met donc en évidence une participation directe du chaperon Asf1 dans la régulation de la transcription de certains gènes.

L'implication d'Asf1 dans la régulation de la transcription pourrait également intervenir en amont de ce modèle. En effet, Asf1 intervient dans l'échange dynamique des histones H3 anciennes par des histones H3 nouvellement synthétisées et acétylées sur la lysine K56 lors de la transcription (Kim et al., 2007). Certaines études montrent que l'incorporation d'histones H3 nouvellement synthétisées est très dynamique au niveau des promoteurs en dehors de la réplication (Jamai, et al., 2007). De plus, la présence de nucléosomes présentant l'histone H3 acétylée sur la lysine K56 favorise le recrutement du facteur de remodelage SWI/SNF (Xu et al., 2005). Ainsi, en assemblant des histones acétylées sur la lysine H3K56 au niveau des promoteurs, Asf1 pourrait participer à la régulation de l'expression de certains gènes.

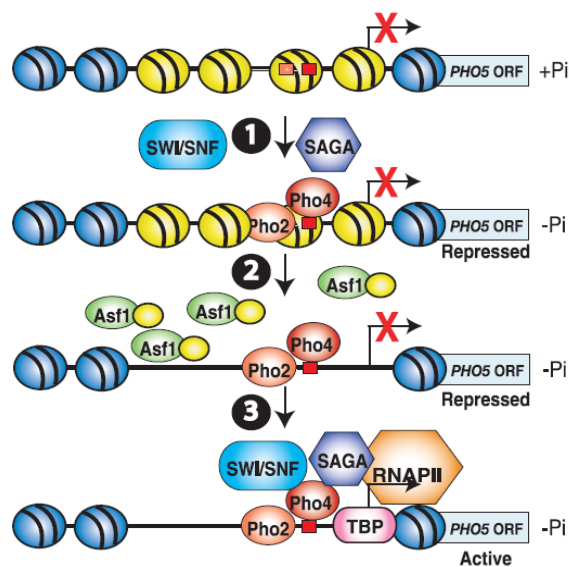


Figure 1-33 : Etapes d'activation transcriptionnelle du gène PHO5 par désassemblage de la chromatine.

Les nucléosomes en dehors du promoteur de PHO5 sont colorés en bleu, les quatre nucléosomes du promoteur de PHO5 sont colorés en jaune. En présence de quantité suffisante de Phosphate (+P_i) le gène PHO5 est réprimé et les nucléosomes du promoteur rendent les sites de liaison des co-activateurs Pho4 et Pho2, représentés par des rectangles rouge et oranges, inaccessibles. Etape 1 : suite à une déplétion de phosphate (-P_i), les activateurs de transcription du gène PHO5 se lient à leur site de liaison avec l'aide des protéines de remodelage de la chromatine SWI/SNF et SAGA. Cette étape nécessite le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF mais celui-ci n'est pas recruté de façon stable sur le promoteur. Etape 2 : suite au recrutement des activateurs sur l'ADN, les nucléosomes sont désassemblés par Asf1. Etape 3 : Le désassemblage de la chromatine au niveau des promoteurs permet le recrutement de la machinerie de transcription ainsi que le recrutement stable des complexes SWI/SNF et SAGA.

La fonction de chaperon d'histone d'Asf1 intervient aussi pendant l'élongation de la transcription. Lorsque le taux de transcription est élevé, Asf1 dissocie les histones (H3/H4) l'ADN en amont de l'ARN polymérase puis les réassemble en coopération avec le chaperon HIR en aval. Asf1 agit alors comme un facteur d'élongation de l'ARN polymérase II. (Green, et al., 2005; Schwabish and Struhl, 2006; Tagami et al., 2004). Récemment, des rôles distincts

ont été découverts pour les deux chaperons d'histones Asf1 et HIR lors de la transcription. Alors qu'Asf1 dépose des histones (H3/H4) nouvellement synthétisées et acétylées sur la lysine H3K56, HIR recycle les anciennes histones (H3/H4) (Kim et al., 2007; Rufiange et al., 2007). L'équilibre entre les quantités de Asf1 et HIR dans le noyau peut donc être important pour le maintien ou le renouvellement de la chromatine durant la transcription.

Par contraste avec son rôle d'activateur de la transcription, Asf1 participe à la répression de certains gènes. En effet, Asf1 et la protéine Hir sont impliquées dans la répression de 6 des 8 gènes d'histones de cœur chez *S. cerevisiae* (Spector, et al., 1997; Sutton et al., 2001). Asf1 participe également à la répression de certains gènes chez la drosophile, et est recrutée sur ces gènes via la protéine de liaison à l'ADN Su(H)/H (Goodfellow, et al., 2007). Cependant, le mode d'action d'Asf1 dans la répression de ces gènes n'est actuellement pas connu.

5. Objectif et stratégie

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au chaperon d'histones Asf1. Comme nous l'avons illustré plus haut, Asf1 est une protéine multifonctionnelle conservée au cours de l'évolution. L'action de la protéine Asf1 se situe au carrefour entre les processus de remodelage de la chromatine et les processus nucléaires tels que la réplication, la transcription et la réparation des dommages de l'ADN. En accord avec cet aspect multifonctionnel, Asf1 interagit avec les histones (H3/H4) et aussi avec de nombreux partenaires impliqués dans chacun de ces processus. La Figure 1-34 illustre le rôle central du chaperon Asf1 par le nombre de ces partenaires.

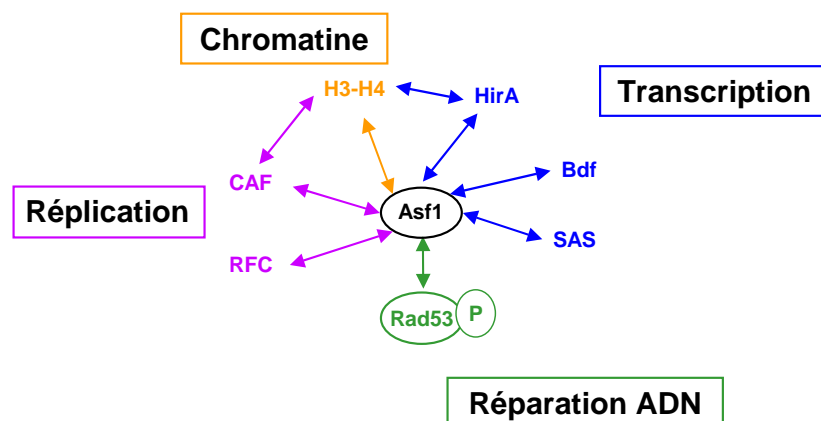


Figure 1-34 : Réseau d'interactions d'Asf1

Représentation d'une partie du réseau d'interactions transitoires mentionnant quelques partenaires de la protéine chaperon Asf1 au centre de ce réseau. Une double flèche entre deux protéines symbolise une interaction entre elles.

L'objectif général de cette thèse est de comprendre comment, à travers une telle variété d'interactions, Asf1 peut exercer la sélectivité nécessaire à chacune de ses fonctions. Plus particulièrement, notre étude porte sur l'implication de la fonction chaperon de Asf1 dans l'ensemble de ces processus nucléaires. Pour cela, nous avons focalisé notre recherche sur l'interaction entre Asf1 et les histones : quel est leur mode d'interaction ? Quel est son impact biologique? Quelles sont les bases moléculaires de l'assemblage et du désassemblage des histones (H3/H4) de l'ADN par Asf1 ?

Nous avons vu dans l'introduction l'apport de données structurales dans la compréhension de mécanismes biologiques au niveau moléculaire. Le point de départ de notre stratégie a donc consisté à caractériser la structure du complexe Asf1/(H3/H4) de façon à en extraire des informations nouvelles sur les mécanismes d'assemblages et de désassemblage des histones par Asf1. Par la suite ces informations ont servi de base à des études fonctionnelles et mécanistiques sur la fonction chaperon d'Asf1 ainsi qu'à la conception d'inhibiteurs spécifiques de l'interaction entre Asf1 et les histones (H3/H4).

Pour mener à bien ce projet qui aborde l'interaction Asf1-histone à des niveaux atomiques, moléculaires et cellulaires, nous avons mis à profit différentes techniques complémentaires *in vitro*, *in vivo* et *in silico*. Pour réaliser ce travail nous avons bénéficié de collaborations avec différents laboratoires, notamment les laboratoires de E. Guittet (ICSN Gif-sur-yvette), C. Mann (CEA Saclay), G. Craescu (Institut Curie, Orsay) et A. Prunell (Institut Jacques Monod, Paris).

Afin de caractériser en détails le complexe Asf1-(H3/H4) nous avons choisi d'utiliser la spectroscopie RMN. La RMN permet de mettre en évidence les aspects structuraux de protéines et de complexes protéiques. La méthodologie utilisée pour la caractérisation structurale du complexe Asf1-(H3/H4) est détaillée dans le CHAPITRE 3.

La caractérisation structurale du complexe Asf1-(H3/H4) est le point de départ de la conception rationnelle de mutants abrogeant de façon spécifique cette interaction. Ces mutants permettent ensuite d'étudier le rôle biologique de cette interaction *in vivo* par des tests phénotypiques (CHAPITRE 4).

Actuellement, il existe des techniques d'étude *in vitro* de la chromatine lors de la transcription et de la réplication appelées *cell-free system*. Néanmoins aucun de ces systèmes ne permet d'obtenir une information au niveau moléculaire. Notre démarche a consisté à développer une méthode d'observation de l'assemblage et du désassemblage de nucléosomes par Asf1 au niveau moléculaire à partir d'une technique mise au point dans le laboratoire de A. Prunell (CHAPITRE 5).

Compte tenu du rôle de la protéine Asf1 dans le maintien de l'intégrité génomique, et du développement d'anti-tumoraux peptidiques se basant sur l'inhibition spécifique d'interaction protéique, nous avons entrepris la conception d'inhibiteurs spécifiques de l'interaction Asf1-histones. Pour cela, nous avons adopté une démarche rationnelle alliant l'étude *in silico* d'inhibiteurs à partir de la structure du complexe à l'étude *in vitro* de l'affinité de ces inhibiteurs pour Asf1 (CHAPITRE 6).

Chapitre 2 : Méthodologie RMN

1. Introduction

Pour résoudre par RMN la structure du complexe Asf1-histones, nous avons utilisé un ensemble d'approches décrit dans ce chapitre. La première analyse structurale du mode d'interactions entre deux partenaires consiste à cartographier les régions d'interactions par la mesure des variations de déplacements chimiques des groupements amides. Cette méthode est décrite dans un premier paragraphe. Pour interpréter ces données, il est nécessaire de disposer de l'attribution des déplacements chimiques des atomes du squelette peptidique. La stratégie utilisée est décrite dans un second paragraphe. Les valeurs des déplacements chimiques donnent des indications sur les structures secondaires. Ce point est indiqué dans un troisième paragraphe. L'attribution des signaux des chaînes latérales est ensuite réalisée par la stratégie réalisée dans le quatrième paragraphe. Enfin, la détermination de la structure est obtenue par modélisation moléculaire sous contraintes. L'obtention de contraintes intra- et inter- et intra-moléculaires est détaillée dans un dernier paragraphe ainsi que la procédure de modélisation.

2. Cartographie de la région d'interaction

La cartographie de régions d'interaction par RMN pour les partenaires d'un complexe est essentiellement réalisée grâce à un type de spectre, le HSQC ^1H - ^{15}N qui nécessite un marquage uniforme à l'azote ^{15}N d'une des protéines étudiées. Sur ce type de spectre, chaque signal observé correspond à un groupe amide du squelette peptidique et aux groupements NH des chaînes latérales des glutamines, asparagines et arginines (Figure 2-1). La carte ainsi obtenue constitue une empreinte caractéristique de la structure protéique considérée. Ce spectre est très sensible à différents paramètres, notamment à des modifications dans l'environnement de la protéine comme la température, le pH, la présence d'un cofacteur, et surtout la présence d'un partenaire interagissant avec la protéine considérée. Ce type de spectre est souvent utilisé pour explorer les interactions intermoléculaires. En effet, les variations de déplacements chimiques observées sur un spectre HSQC ^1H - ^{15}N après ajout d'un partenaire sont le plus souvent caractéristiques d'une interaction directe entre deux partenaires (Figure 2-1-c). L'identification des résidus dont les fréquences sont affectées permet de déterminer les régions d'interactions (Figure 2-1).

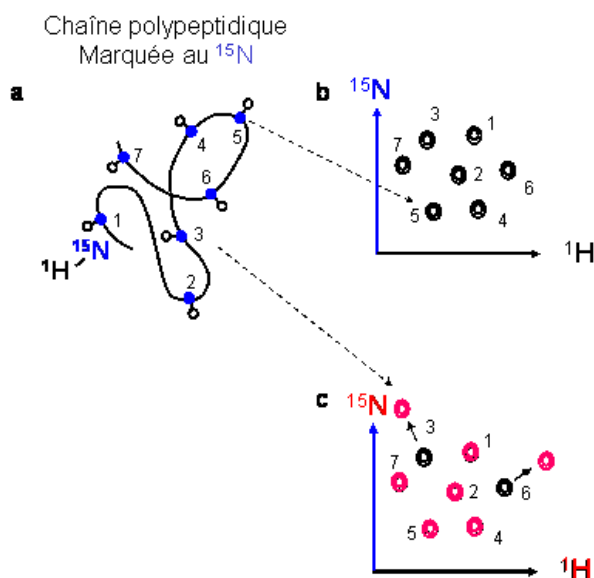


Figure 2-1 : Effet de la présence d'un partenaire sur le spectre 1H-15N HSQC d'une protéine.

a) Représentation du squelette peptidique d'une protéine, b) Schéma de spectres 1H-15N HSQC d'une protéine marquée 15N en absence de partenaire (signal coloré en noir), c) Superposition du spectre 1H-15N HSQC (b) avec celui de la même protéine marquée 15N en présence d'un partenaire (signal coloré en rose). Sur ce type de spectre, un signal est caractéristique d'un groupe amide d'un résidu. Les flèches pleines indiquent le déplacement du signal d'un résidu lors de l'ajout d'un partenaire.

Cependant, cette méthode présente quelques limites : elle nécessite l'attribution préalable de la protéine marquée et des effets indirects peuvent être observés à proximité des résidus aromatiques. En effet, les résidus aromatiques induisent de fortes variations de déplacements chimiques dans leur environnement proche même pour des faibles variations structurales.

3. Stratégie d'attribution des signaux ^1H , ^{15}N et ^{13}C du squelette peptidique d'une protéine

Afin de cartographier les régions d'interaction entre deux protéines et permettre ensuite la résolution au niveau atomique d'un complexe protéique, il est nécessaire d'attribuer les signaux du squelette peptidique de chacun des partenaires. Dans le cas de protéines de grandes tailles, les protons sont trop nombreux pour que leurs déplacements chimiques soient aisément identifiables. Le marquage isotopique ^{15}N et/ou ^{13}C de la protéine aide à lever les ambiguïtés. Les expériences hétéro-nucléaires à deux ou trois dimensions permettent de relier le déplacement chimique d'un proton à celui d'un atome ^{15}N ou ^{13}C . Chaque type d'expérience hétéro-nucléaire utilise différentes propriétés de ces trois noyaux afin de corrélérer spécifiquement plusieurs noyaux entre eux, selon les critères suivants : i) le

type d'atome, ii) sa position dans le résidu, iii) la nature de la corrélation qui peut s'effectuer soit via les liaisons chimiques (couplage spin-spin ou scalaire) soit directement à travers l'espace (couplage dipolaire). Selon les noyaux considérés et le nombre de liaisons qui les séparent, la valeur du couplage spin-spin varie. De plus, pour chaque type de noyau, il est possible de discriminer ceux de même nature suivant la fonction chimique dans laquelle ils sont impliqués ou la position qu'ils occupent dans le résidu. Les protons ne résonnent pas à la même fréquence selon qu'ils appartiennent à un groupement amide ou à un groupement méthyle par exemple. De plus, les déplacements chimiques des carbones sont fonction du type de résidus auquel ils appartiennent et de leur position dans le résidu.

L'attribution séquentielle consiste à enregistrer une série de spectres qui permettent de visualiser des interactions entre deux ou trois types de noyaux. Les expériences qui sont couramment utilisées pour l'attribution des déplacements chimiques du squelette peptidique sont présentées sur la Figure 2-2. L'ensemble de ces expériences permet de relier le groupe amide d'un résidu i à des noyaux ^1H ou ^{13}C du résidu i ou $i-1$.

Un spectre à deux dimensions ^1H - ^{15}N HSQC, déjà présenté auparavant, connecte les fréquences du proton et de l'azote d'un même groupe amide ($\text{H}^{\text{Ni}}-\text{Ni}$). Les autres expériences RMN utilisées comportent trois dimensions hétéro-nucléaires. Elles possèdent toutes un plan de base ^1H - ^{15}N HSQC. Les plans perpendiculaires à celui-ci permettent de connecter un ou des noyaux particuliers aux corrélations $\text{H}^{\text{Ni}}-\text{Ni}$ du spectre HSQC. L'expérience NOESY-HSQC (en vert) connecte ainsi tous les protons proches dans l'espace d'un groupe $\text{H}^{\text{Ni}}-\text{Ni}$ à celui-ci. Parmi toutes les corrélations observées, certaines sont déterminantes pour l'attribution séquentielle. Il s'agit des couples $\text{H}^{\alpha}_{i-1}-\text{Ni}$ - H^{Ni} et $\text{H}^{\alpha}_{i-1}-\text{Ni}$ - H^{Ni} , qui relient les protons α des résidus i et $i-1$ à l'amide du résidu i . L'expérience TOCSY-HSQC (en rouge) connecte les fréquences des protons de la chaîne latérale d'un résidu i à son amide. L'expérience HBHA(CO)NH (en bleu) relie les protons α et β d'un résidu $i-1$ à l'amide du résidu i . Les expériences HNCA, HN(CO)CA et CBCA(CO)NH (en jaune, magenta et vert respectivement) permettent de relier respectivement les carbones $\text{C}\alpha$ des résidus $i-1$ et i , et les carbones $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ du résidu $i-1$ à la fréquence de l'amide du résidu i .

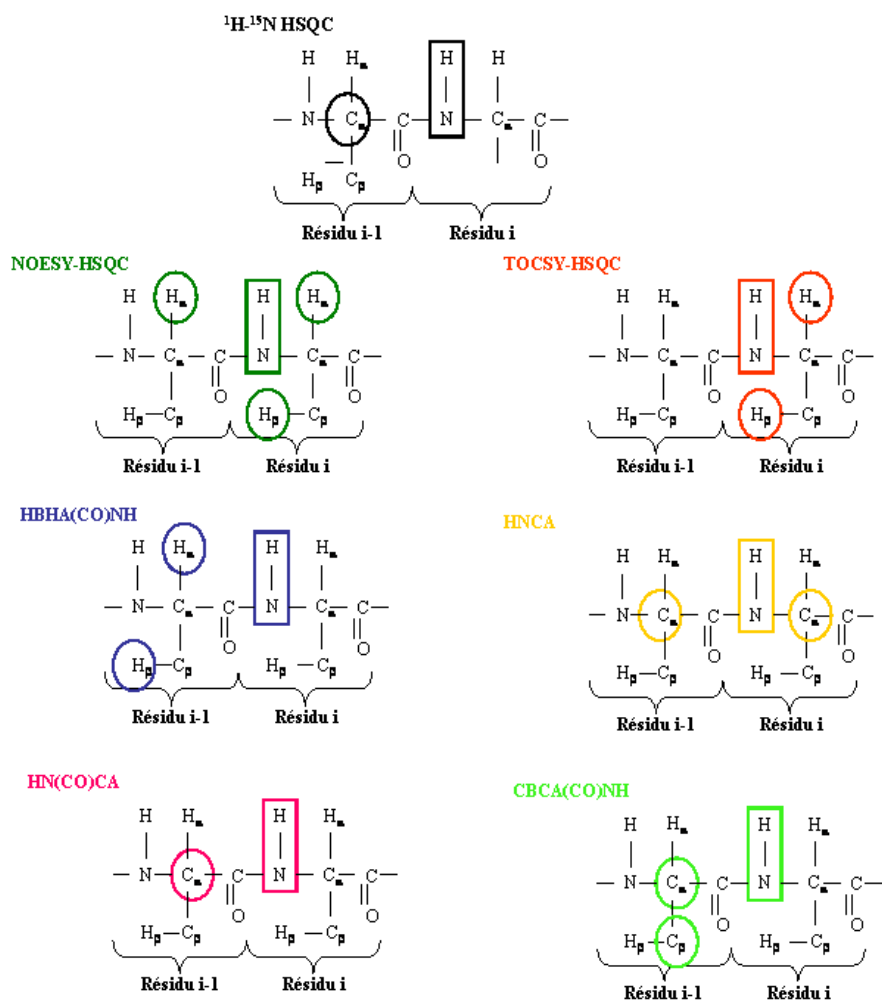


Figure 2-2 : Expériences réalisées pour l'attribution des noyaux du squelette peptidique

Schéma des corrélations observées pour chacune des expériences utilisées pour l'attribution séquentielle des déplacements chimiques des noyaux du squelette peptidique : HSQC, NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC, HNCA, HN(CO)CA, HBHA(CO)NH, CBCA(CO)NH. Les noyaux corrélés sont entourés.

La méthode utilisée pour attribuer les résonances des atomes ¹H, ¹⁵N et ¹³C du squelette peptidique est présentée sur la Figure 2-2. Sont superposées d'une part, les expériences NOESY-HSQC (en vert), TOCSY-HSQC (en rouge), et HBHA(CO)NH (bleu), et d'autre part les expériences NOESY-HSQC (en vert), TOCSY-HSQC (en rouge) et HBHA(CO)NH (en vert). De cette manière, une corrélation à la fois présente dans les spectres NOESY-HSQC et TOCSY-HSQC correspond à une corrélation intra-résidu H^α_i-N_i -HN_i, alors qu'une corrélation présente à la fois dans les spectres NOESY-HSQC et HBHA(CO)NH correspond à une corrélation inter-résidu H^α_{i-1}-N_i -HN_i ou H^β_{i-1}-N_i -HN_i. Les valeurs moyennes de déplacements chimiques de protons H^α et H^β sont généralement assez différentes pour un résidu donné, il est donc facile de sélectionner l'attribution correcte. Pour les carbones ¹³C, les spectres

HNCA, HN(CO)CA et CBCA(CO)NH sont superposés. Une corrélation présente dans les trois spectres correspond à une corrélation inter-résidu $C_{i-1-N_i}^\alpha$ - H^{N_i} . En revanche, une corrélation qui n'apparaît que dans le spectre HNCA correspond à une corrélation intra-résidu $C_{i-N_i}^\alpha$ - H^{N_i} et une corrélation qui n'apparaît que dans le spectre CBCA(CO)NH correspond à une corrélation inter-résidu $C_{i-1-N_i}^\beta$ - H^{N_i} .

Le point de départ du protocole d'attribution est un signal sur le spectre 1H - ^{15}N HSQC qui correspond à la corrélation entre les déplacements chimiques du proton et de l'azote du groupement amide du squelette peptidique d'un résidu i . Sur les plans de fréquences ^{15}N du résidu i , avec les expériences NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC, HBHA(CO)NH d'une part et HNCA, HN(CO)CA, CBCA(CO)NH d'autre part, il est possible d'identifier les corrélations $^1H_{\alpha i}$ - $^{15}N_i$ - $^1H_{N_i}$ et $^1H_{\alpha i-1}$ - $^{15}N_i$ - $^1H_{N_i}$ d'un côté et $^{13}C_{\alpha i}$ - $^{15}N_i$ - $^1H_{N_i}$, $^{13}C_{\alpha i-1}$ - $^{15}N_i$ - $^1H_{N_i}$ et $^{13}C_{\beta i-1}$ - $^{15}N_i$ - $^1H_{N_i}$ de l'autre. Les déplacements chimiques de $^1H_{\alpha i}$, $^1H_{\alpha i-1}$ et $^{13}C_{\alpha i}$, $^{13}C_{\alpha i-1}$ peuvent être attribués. Sur les plans perpendiculaires des fréquences $^1H_{\alpha i}$ et $^{13}C_{\alpha i}$ sont retrouvées les corrélations 1H_i - $^{15}N_i$ et $^1H_{i+1}$ - $^{15}N_{i+1}$. Cette corrélation peut alors être attribuée sur le spectre HSQC qui sert de référence.

Pour les protéines de grande taille comme Asf1, il est nécessaire de travailler en parallèle sur les deux types de spectres. En effet, étant donné la grande quantité de signaux, la probabilité de ne trouver qu'une seule corrélation intra-résidu pour un résidu i sur un plan $^1H_{\alpha i}$ ou $^{13}C_{\alpha i}$ est faible. Ce travail réduit les ambiguïtés. Il convient de préciser que l'attribution se fait à partir de plusieurs attributions successives effectuées à partir de plusieurs résidus initiaux qui permettent de déduire la séquence de la protéine correspondante grâce aux valeurs caractéristiques de déplacements chimiques des protons α et β .

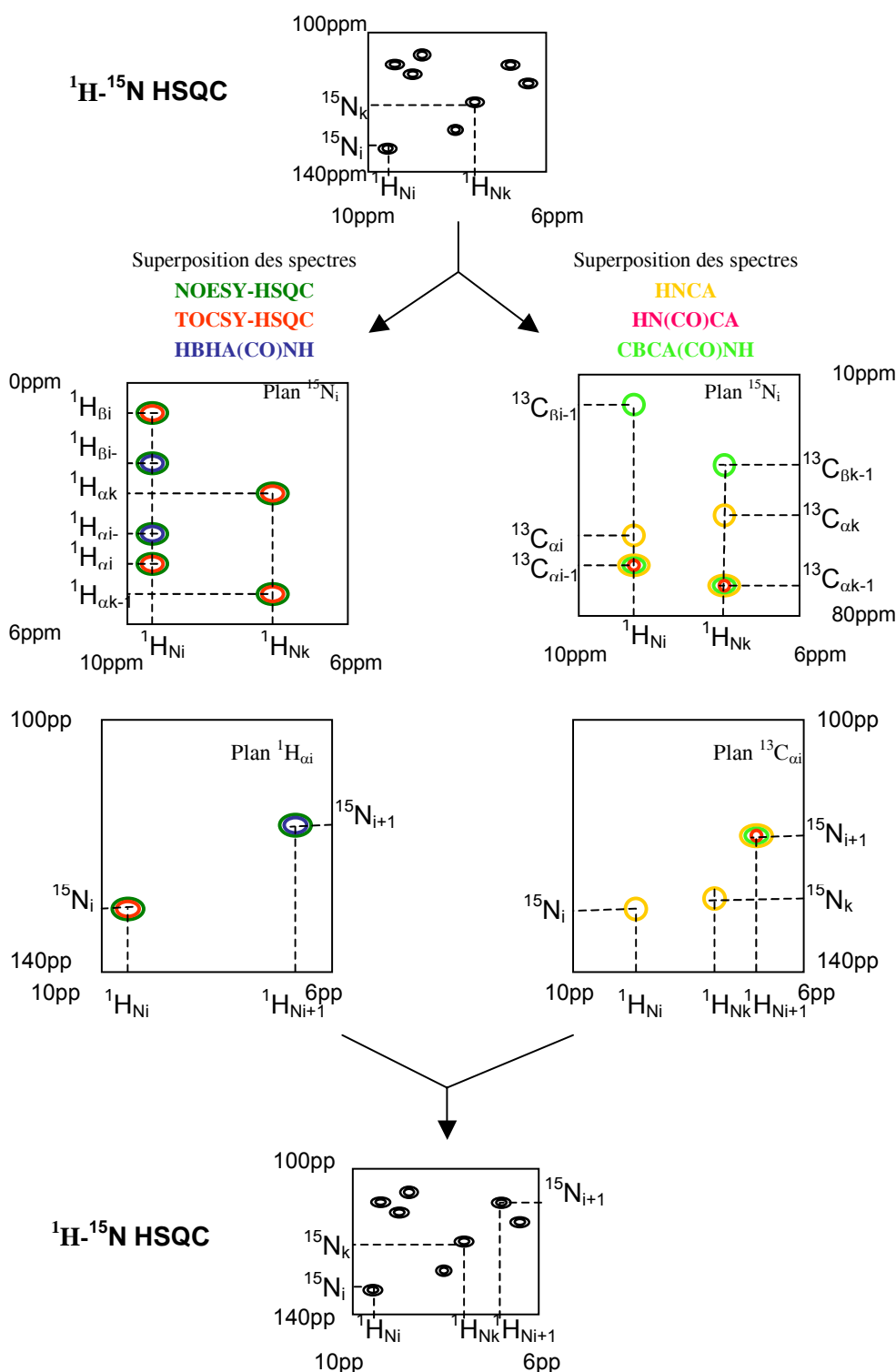


Figure 2-3 : Stratégie d'attribution des noyaux du squelette peptidique

Représentation schématique de la stratégie employée pour l'attribution séquentielle des noyaux du squelette peptidique. Le spectre du haut est un spectre ^1H - ^{15}N HSQC. Sont représentés en dessous les plans des fréquences ^{15}N correspondants aux différentes expériences à trois dimensions, puis les plans HSQC des fréquences $\omega^1\text{H}\alpha i$ ou $\omega^{13}\text{C}\alpha i$ de ces mêmes expériences, puis à nouveau le spectre ^1H - ^{15}N HSQC. Les corrélations ont une couleur différente en fonction du type de spectre : vert pour le NOESY-HSQC, rouge pour le TOCSY-HSQC, bleu pour le HBHA(CO)NH, jaune pour le HNCA, vert pour le CBCA(CO)NH et magenta pour le HN(CO)CA.

4. Les déplacements chimiques en RMN et structure secondaire

L'attribution complète des déplacements chimiques du squelette peptidique permet de connaître précisément la structure secondaire d'une protéine. En effet, les déplacements chimiques de certains noyaux sont indicateurs de structures secondaires. C'est le cas des déplacements chimiques des H α pour lesquels il a été montré que l'appartenance à une structure secondaire de type hélice α induit un déplacement vers les bas champs par rapport à sa valeur mesurée dans des peptides non structurés alors que ce déplacement a lieu vers les hauts champs dans le cas d'une structure secondaire de type feuillet β (Wishart, et al., 1991; Wishart, et al., 1992). Le phénomène est aussi observé pour les carbones α et β avec un sens opposé pour les carbones α (Ikura, et al., 1991). L'ensemble des données collectées jusqu'à aujourd'hui montre que c'est le carbone α qui constitue la sonde la plus sensible à la structure secondaire. Cela peut se comprendre intuitivement compte tenu de sa position centrale entre les deux liaisons délimitant les angles de torsion ϕ et ψ qui déterminent le repliement du squelette peptidique. Rappelons que ces angles passent du couple de valeurs moyennes (-60, -45) pour une structure α , au couple (-135, -135) pour un feuillet β antiparallèle.

L'index de déplacement chimique (*Chemical Shift Index*, CSI) qui révèle les déviations caractéristiques des déplacements chimiques de certains noyaux par rapport aux valeurs mesurées pour les peptides désordonnés est maintenant largement utilisé pour détecter les éléments de structures secondaires (Wishart et al., 1992). Depuis sa mise en évidence, les valeurs de l'index ont été affinées en raison de la quantité croissante de structures de protéines résolues par RMN et de la précision accrue des valeurs « *random coil* » rendue possible par l'utilisation de courts peptides dans des conditions expérimentales très diverses. Ainsi, pour les protéines repliées, le logiciel TALOS (Cornilescu, et al., 1999) permet de déterminer la structure secondaire dans laquelle est impliqué chaque résidu de la protéine. Pour les protéines dépliées ou partiellement repliées, l'index de déplacement chimique indique la propension locale de la chaîne à former une structure secondaire, c'est-à-dire la présence plus ou moins persistante de structures secondaires résiduelles.

5. Stratégie d'attribution des signaux ^{13}C et ^1H des chaînes latérales d'une protéine

La détermination haute résolution d'une structure de protéine ou de complexe par RMN nécessite la connaissance de l'ensemble des distances inter-atomiques des protons. Il est donc nécessaire d'attribuer le maximum de protons des chaînes latérales de la protéine. Les expériences HCCH-TOCSY et HCCH-COSY permettent de relier les protons des chaînes latérales aux carbones α et β déjà attribués. L'expérience HCCH-COSY permet de relier deux carbones vicinaux ainsi que les protons portés par ces deux carbones : par exemple, un proton $\text{H}\alpha$ est corrélé aux carbones $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ et au proton $\text{H}\beta$. L'expérience HCCH-TOCSY permet quant à elle de corréler un proton à l'ensemble des protons et des carbones du même résidu. Ainsi, chacun des 20 acides-aminés possède une signature particulière pour ces deux expériences. La Figure 2-4 illustre cette propriété en représentant de manière schématique les spectres attendus pour la valine. Quatre plans correspondant à la fréquence de chacun des quatre carbones sont représentés. Sur la fréquence correspondant au carbone α , quatre corrélations sont observées : $\text{H}\alpha\text{-C}\alpha\text{-H}\alpha$ sur la diagonale et $\text{H}\alpha\text{-C}\alpha\text{-H}\beta$ sont observés sur les deux spectres HCCH-TOCSY et HCCH-COSY, $\text{H}\alpha\text{-C}\alpha\text{-H}\gamma_1$ et $\text{H}\alpha\text{-C}\alpha\text{-H}\gamma_2$ ne sont observés que sur le spectre HCCH-TOCSY. Le carbone β étant vicinal au carbone α et γ , les quatre corrélations sont présentes dans les deux spectres. Enfin sur chacun des deux plans correspondants aux carbones γ , le carbone β est le seul carbone vicinal, le spectre HCCH-COSY ne permet alors d'observer que la corrélation au carbone β alors que le spectre HCCH-TOCSY regroupe l'ensemble des corrélations.

Enfin, les expériences NOESY-HSQC éditées ^{15}N et ^{13}C et TOCSY-HSQC éditées ^{15}N sont également utilisées en complément pour l'attribution de l'ensemble des chaînes latérales. Notons également que les déplacements chimiques des carbones des résidus aromatiques sont différents de ceux des chaînes aliphatiques. Les expériences HCCH-TOCSY, HCCH-COSY et NOESY-HSQC éditées ^{13}C sont par conséquent réalisées deux fois, un des spectres est centré sur les déplacements chimiques des aliphatiques et l'autre sur les déplacements chimiques des aromatiques.

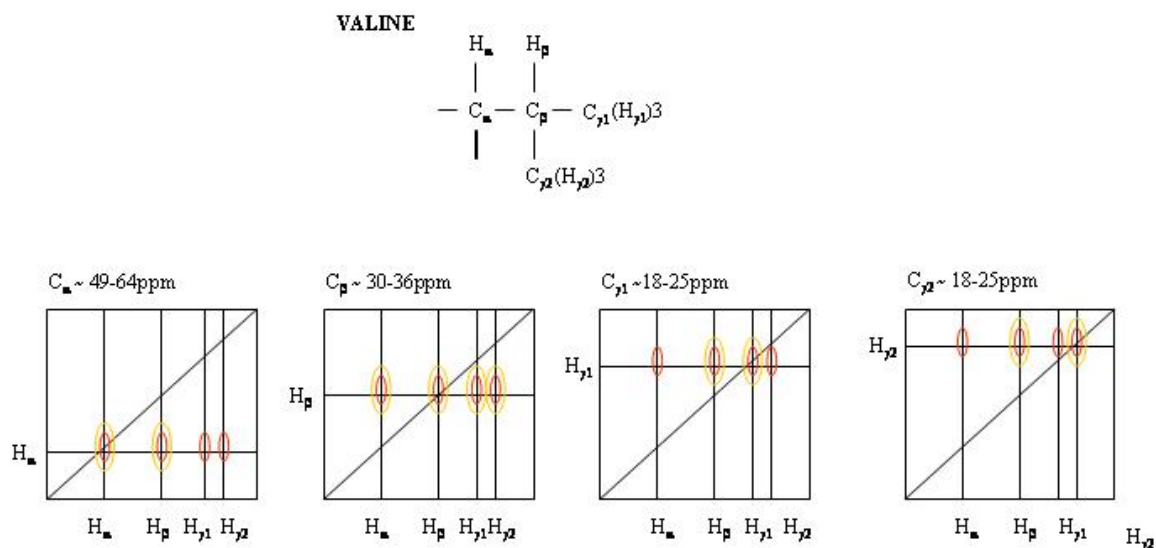


Figure 2-4 : Superposition des signatures HCCH-TOCSY et HCCH-COSY du résidu valine

Une corrélation présente dans le spectre HCCH-TOCSY est représentée par un ovale orange et une corrélation présente dans le spectre HCCH-COSY est représentée par un ovale jaune. La fréquence du carbone est donnée au-dessus de chaque plan correspondant.

6. Stratégie de modélisation moléculaire à partir des données RMN

L'attribution complète des protons des chaînes latérales de la protéine est ensuite exploitée pour attribuer les signaux des spectres NOESY-HSQC ^{15}N et NOESY-HSQC ^{13}C . Ces expériences donnent des informations de type spatial car les corrélations nOes peuvent être traduites en distances inter-atomiques moyennes. Cependant, étant donné le nombre important de protons dans un complexe protéique, il est impossible de détecter avec certitude toutes les corrélations nOes. Ces ambiguïtés sont dues à la proximité des déplacements chimiques qui multiplie les possibilités de combinaisons de distances inter-protons correspondant à une corrélation nOe donnée. De plus, cette ambiguïté est accrue car les signaux présents dans les spectres NOESY-HSQC peuvent correspondre à des interactions intra ou inter-moléculaires. Des expériences NOESY-HSQC-filtrées qui permettent d'obtenir uniquement des corrélations inter-moléculaires ont donc été réalisées pour différencier ces deux types de corrélations.

La stratégie employée consiste, dans un premier temps, à attribuer de façon non-ambigüe le maximum de corrélations nOes intra-et inter-moléculaires. La modélisation moléculaire permet, dans un second temps, de générer un ensemble de structures satisfaisant à la fois les

contraintes spatiales dérivées des expériences RMN et les critères de géométrie imposés par les structures peptidiques. C'est en s'appuyant sur les structures générées par modélisation moléculaire que de nouvelles corrélations nOes peuvent être attribuées pour affiner les modèles structuraux. Il s'agit d'un processus itératif qui aboutit à un ensemble de structures convergeant vers une seule conformation.

6.1. Détermination de distances intra-moléculaires

Parmi les nombreuses corrélations présentes sur les spectres NOESY-HSQC, les corrélations les plus accessibles sont les corrélations séquentielles de type $H_{\alpha i} - H_{N_{i+1}}$ présentes dans les spectres NOESY-HSQC ^{15}N . D'autres corrélations peuvent aussi être attribuées de façon non ambiguë. Ces corrélations sont caractéristiques de la structure secondaire en hélice α ou en brin β adoptée par le squelette peptidique (et déterminée par la méthode décrite aux paragraphes 3 et 4). Ainsi pour une conformation en hélice α , des corrélations $H_{\alpha i} - H_{\alpha i+3}$ et $H_{\alpha i} - H_{\beta i}$ sont observées sur les spectres NOESY-HSQC ^{13}C et des corrélations $H_{\alpha i} - H_{N_{i+3}}$, $H_{\alpha i} - H_{N_{i+1}}$ et $H_{\alpha i} - H_{N_i}$ sont observées sur des spectres NOESY-HSQC ^{15}N . Ces contacts sont illustrés sur la Figure 2-5.

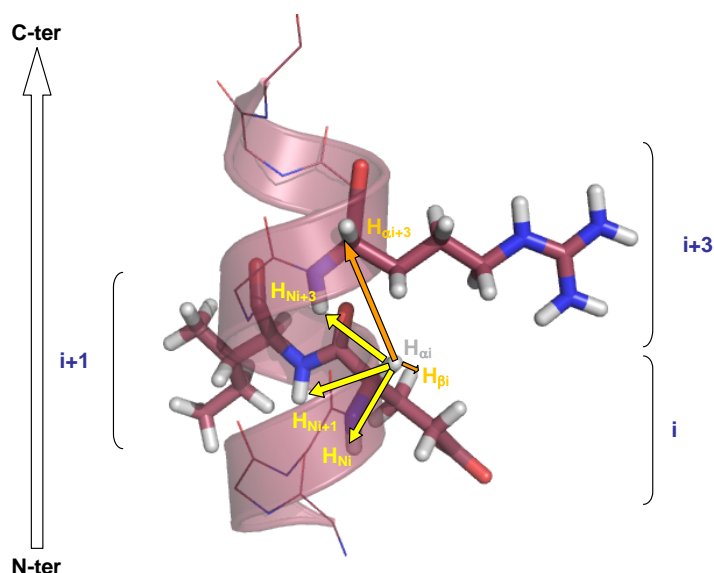


Figure 2-5 : Corrélations nOes attendues dans une hélice α .

Les corrélations de type $H_{\alpha i} - H_{\alpha i+3}$ et $H_{\alpha i} - H_{\beta i}$ observées sur les spectres NOESY-HSQC ^{13}C sont en orange, et les corrélations $H_{\alpha i} - H_{N_{i+3}}$, $H_{\alpha i} - H_{N_{i+1}}$ et $H_{\alpha i} - H_{N_i}$ observés sur les spectres NOESY-HSQC ^{15}N sont en jaune. Les résidus i , $i+1$ et $i+3$ sont représentés en stick, la chaîne principale des autres résidus de l'hélice est représentée en ligne

Dans le cas de brins β , deux possibilités se présentent selon que ces brins forment des feuillets β parallèles ou anti-parallèles (Figure 2-6). Pour un feuillet β parallèle, on attend des corrélations nOes de type $H_{\alpha i}-H_{Nj}$ ainsi que à des corrélations $H_{Ni}-H_{\alpha j-1}$ et $H_{Nj}-H_{\alpha j+1}$. Pour un feuillet β anti- parallèle, les corrélations attendues sont les suivantes : $H_{\alpha i}-H_{\alpha j}$, $H_{Ni-1}-H_{Nj+1}$, $H_{Ni+1}-H_{Nj-1}$, $H_{Ni+1}-H_{\alpha j}$, $H_{\alpha i}-H_{Nj+1}$. De fait, une analyse des corrélations nOes entre les brins permet de déterminer l'orientation des brins les uns par rapport aux autres et d'en déduire le repliement d'une protéine.

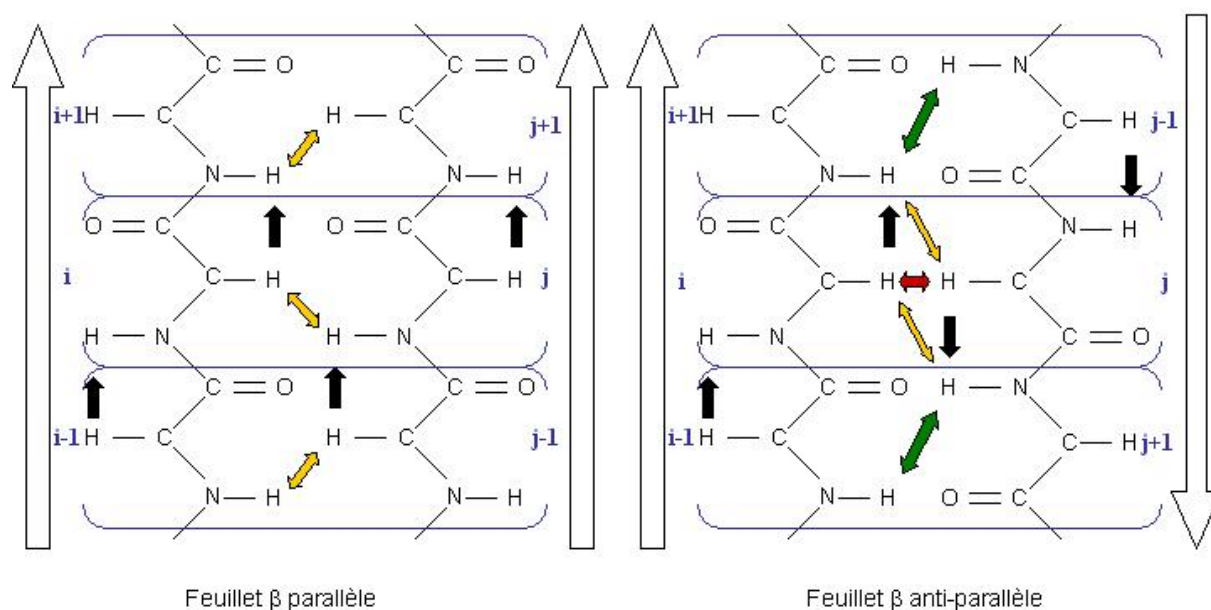


Figure 2-6 : Corrélations nOes attendues dans un feuillet β parallèle et anti-parallèle.

Corrélation de type $H_{\alpha}-H_{\alpha}$ (flèche rouge), H_N-H_N (flèches vertes), $H_{\alpha}-H_N$ (flèches jaunes) et $H_{\alpha i}-H_{Nj+1}$ (flèches noires).

6.2. Détermination de distances inter-moléculaires

Les distances intra-moléculaires fournissent des renseignements sur le repliement des molécules, mais ne donnent aucune information sur l'orientation des molécules dans un complexe. Cette orientation ne peut être définie que par la détermination de distances inter-moléculaires. Des expériences combinant un filtrage isotopique et une NOESY-HSQC (Zwahlen, et al., 1997) permettent d'obtenir uniquement les corrélations inter-moléculaires contrairement à une NOESY-HSQC classique (Figure 2-7). La mise au point du filtre isotopique appliqué au complexe *hAsf1* (1-156)/H3 (122-135) a été réalisé en collaboration avec C. van Heijenoort (ICSN, Gif-sur-Yvette).

Au cours de ces expériences, l'un des partenaires est uniformément marqué ^{13}C ou ^{15}N et l'autre partenaire n'est pas marqué. Une NOESY-HSQC X-filtré (X étant un hétéroatome ^{13}C ou ^{15}N) se décompose en trois étapes : 1) sélection des protons du partenaire non marqué via un filtre isotopique, 2) transfert de leur aimantation sur les protons qui leur sont proches dans l'espace via un NOESY puis 3) récupération du signal transféré sur les protons du partenaire marqué isotopiquement via une HSQC. Ces étapes, utilisées pour l'expérience NOESY-HSQC ^{13}C -filtré, sont schématisées sur la Figure 2-8.

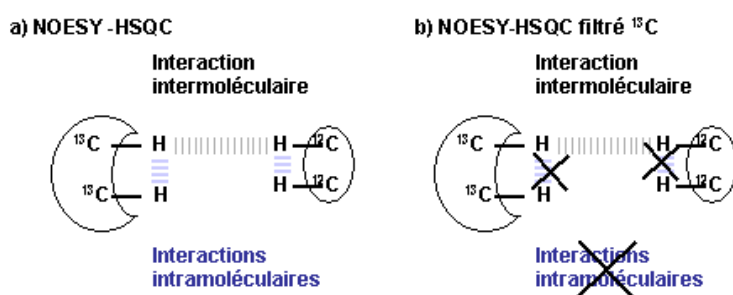


Figure 2-7 : Contact intermoléculaires observés dans les spectres NOESY-HSQC réalisés

Représentations schématiques des types de contacts inter-protons présents a) dans un spectre NOESY-HSQC classique, b) dans un spectre NOESY-HSQC filtré ^{13}C . Les schémas a) et b) représentent un complexe protéique dont le partenaire marqué au carbone ^{13}C est à gauche et le partenaire non marqué est à droite. Les contacts inter-moléculaires sont représentés par des traits gris et les contacts intra-moléculaires par des traits bleus. La croix noire indique que le contact n'est pas observable.

La particularité d'une NOESY-HSQC X-filtré provient du filtrage isotopique (Gemmecker, et al., 1992) qui permet de sélectionner les protons d'un des partenaires du complexe avant de réaliser une NOESY-HSQC classique. Ainsi, un filtre ^{13}C (ou ^{15}N) correspond à une expérience pour laquelle l'aimantation des protons reliées à un ^{13}C (ou un ^{15}N) est supprimée alors que l'aimantation des autres protons n'est pas affectée, cette sélection est schématisée sur la Figure 2-9-a.

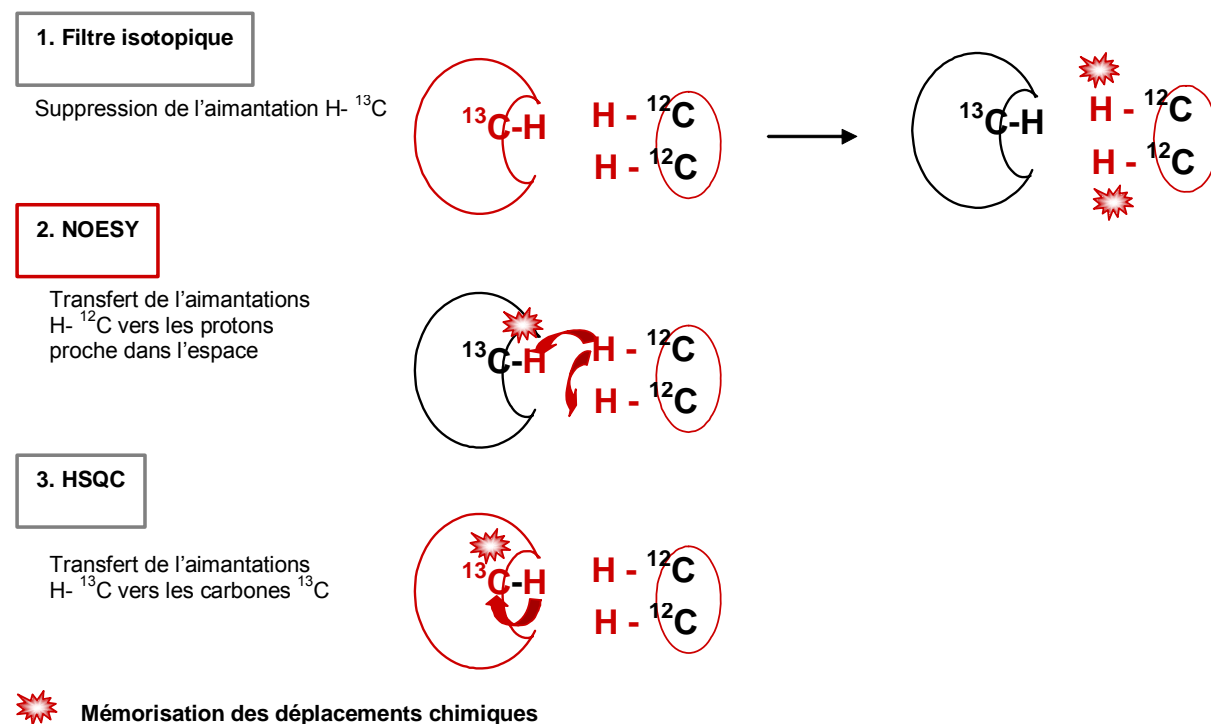


Figure 2-8 : Schéma des étapes d'un NOESY-HSQC filtrée ¹³C.

L'aimantation est signalée par la couleur rouge. Une couleur noire indique l'absence d'aimantation. La NOESY-HSQC filtrée ¹³C se décompose en trois étapes : 1) sélection et marquage des protons du partenaire non marqué via un filtre isotopique, 2) transfert de leur aimantation sur les protons qui leur sont proches dans l'espace via un NOESY puis 3) sélection du signal transféré sur les protons du partenaire marqué isotopiquement par une HSQC.

La séquence d'impulsions du filtre ¹³C utilisée au cours de ce travail de thèse est schématisée sur la Figure 2-9-b et l'évolution des aimantations des protons H-¹²C et H-¹³C y est reportée. Au début de cette expérience, tous les protons sont porteurs d'une aimantation. Après une première impulsion de 90° sur les protons, l'aimantation des protons H-¹³C évolue pendant un temps Δ sous couplage $^1J_{H-X}$ puis est transférée sur le carbone ¹³C par une impulsion adiabatique de 180°. L'aimantation transférée est ensuite supprimée par un gradient g2. Après la première impulsion de 90°, les protons H-¹²C subissent également une impulsion 180° puis une autre impulsion 90°, cette série d'impulsions correspond à un écho de spin qui permet de refocaliser leur aimantation. Les imperfections de l'impulsion 180° sur les protons sont éliminées par les gradients g1.

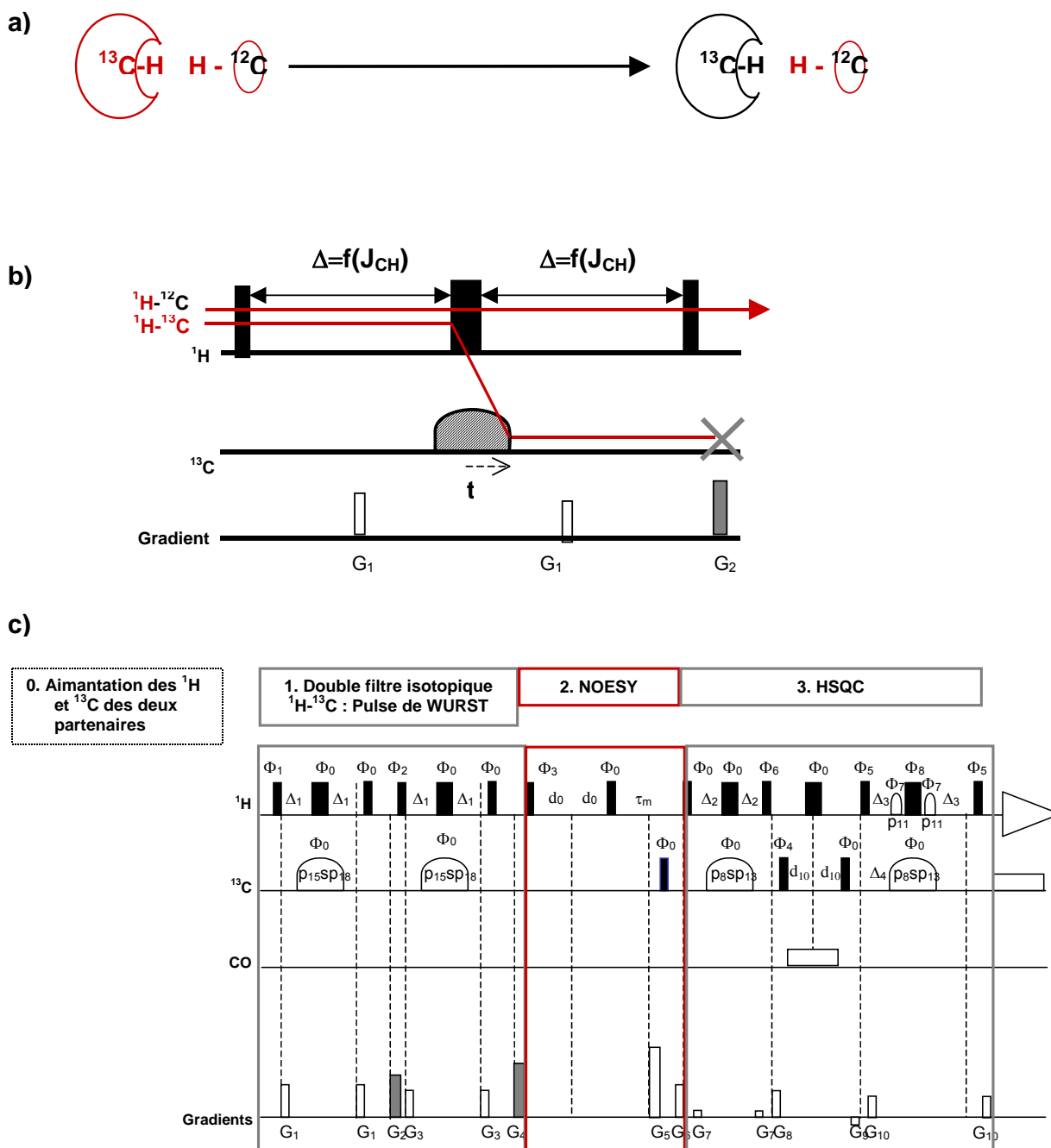


Figure 2-9 : Séquence RMN du filtre isotopique ^{13}C utilisé et du spectre NOESY-HSQC ^{13}C filtré.

a) Représentation schématique de l'aimantation de protons et des carbones avant (à gauche) et après (à droite) filtrage isotopique. L'aimantation est symbolisée par la couleur rouge.

b) Séquence d'impulsion d'un filtre isotopique ^{13}C ; Suppression de la magnétisation sur les protons reliés à un carbone ^{13}C : l'aimantation d'un proton ^1H - ^{13}C évolue pendant une durée Δ sous couplage $^1\text{J}_{\text{XH}}$ puis est transférée sur l'atome X par une impulsion adiabatique de 180° sur le carbone ^{13}C . L'aimantation portée par les protons ^1H - ^{13}C est supprimée par le gradient g2. Les gradients g1 permettent d'éliminer les artefacts dus aux imperfections de l'impulsion 180° sur le proton. L'aimantation est représentée par la couleur rouge. La suppression de l'aimantation est indiquée par une croix grise.

c) Séquence d'impulsion d'un spectre NOESY-HSQC ^{13}C filtré, la première étape regroupe la séquence du double filtre isotopique sur le ^{13}C , la seconde étape est une séquence de spectre NOESY, la troisième étape est une séquence de spectre HSQC comprenant l'élimination du signal de l'eau.

L'efficacité d'un filtre isotopique dépend du rendement du transfert car si une partie de l'aimantation d'un proton H-X n'est pas transférée sur l'hétéroatome X, celle-ci n'est pas supprimée. Elle donnera lieu à une corrélation nOe intra-moléculaire sur le spectre final qui sera interprétée comme une corrélation inter-moléculaire.

Deux conditions permettent d'obtenir un rendement maximal du transfert d'aimantation. D'une part, la fréquence de l'impulsion 180° sur l'hétéroatome doit correspondre précisément à la fréquence de résonance de celui-ci et, d'autre part, le temps d'évolution Δ doit correspondre exactement à la valeur de la constante de couplage J_{CH} du couple ^{13}C -H considéré. Cependant, dans le cas du ^{13}C , les valeurs de déplacements chimiques, c'est-à-dire les fréquences de résonance exactes ainsi que les couplages $^1J_{HC}$ sont étendus (de 10 à 70ppm et de 120 à 145Hz pour les carbones aliphatiques, de 120 à 150ppm et de 160 à 220Hz pour les aromatiques). Une seule impulsion de fréquence fixe sur le ^{13}C ne permet donc pas de transférer efficacement l'aimantation de tous les protons H- ^{13}C sur le carbone. C'est pourquoi l'impulsion utilisée dans ce filtre isotopique ^{13}C a la particularité de moduler sa fréquence d'impulsion en fonction du temps, il s'agit d'une impulsion adiabatique de WURST (*Wideband Uniform Rate Smooth Truncation*) (Kupce and Freeman, 1995). Plus précisément, lorsqu'on applique ce type d'impulsion de 180° , l'aimantation des carbones bascule à un moment qui dépend de leur déplacement chimique. Les auteurs de cette séquence ont astucieusement tiré parti de cette caractéristique de la séquence WURST et des propriétés particulières des constantes de couplage dans les protéines pour optimiser le transfert d'aimantation du proton vers le carbone auquel il est relié. En effet, ils ont remarqué que les constantes de couplage $^1J_{HC}$ varient linéairement avec le déplacement chimique des carbones correspondant (Figure 2-10).

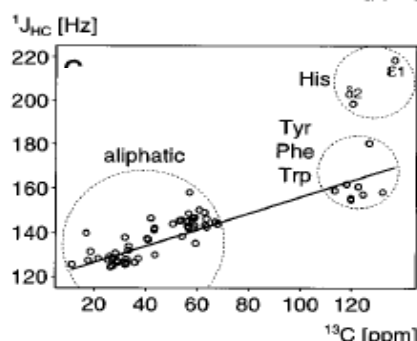


Figure 2-10 : Corrélation entre constante de couplage et déplacements chimiques

Evolution de la constante de couplage $^1J_{HC}$ en fonction des déplacements chimiques du ^{13}C au sein des protéines.

Il est donc possible de transférer successivement chaque aimantation H- ^{13}C sur le carbone ^{13}C à sa fréquence de résonance propre ω_{C} et après un temps d'évolution $^1J_{\text{H-C}}$ optimal. Notons que ω_{C} dépend du champ magnétique B_0 et non de $^1J_{\text{H-C}}$, il est donc nécessaire d'optimiser les délais de cette séquence en fonction du champ magnétique. Pour augmenter l'efficacité du filtre et limiter les artefacts, les auteurs proposent de placer successivement deux filtres isotopiques. A la suite du filtre isotopique ^{13}C , seuls les protons H- ^{12}C possèdent une aimantation susceptible d'être transférée sur les protons qui leur sont proches dans l'espace pendant le temps de mélange d'une séquence NOESY. Ces protons peuvent être portés par un carbone ^{12}C s'il s'agit d'un transfert entre protons de la même molécule ou par un carbone ^{13}C s'il s'agit d'un transfert entre protons de deux molécules au niveau de l'interface. Ainsi, la séquence NOESY permet le transfert d'aimantation du partenaire non marqué vers le partenaire marqué ^{13}C . Puis l'ajout d'une séquence HSQC ^{13}C permet de sélectionner et d'identifier les protons du partenaire marqué situé au niveau de l'interface (Figure 2-8 et Figure 2-9-c).

Le spectre obtenu, schématisé sur la Figure 2-11, comprend trois dimensions : deux dimensions correspondent au plan HSQC ^{13}C du partenaire marqué, la troisième dimension correspond aux déplacements chimiques des protons du partenaire non marqué.

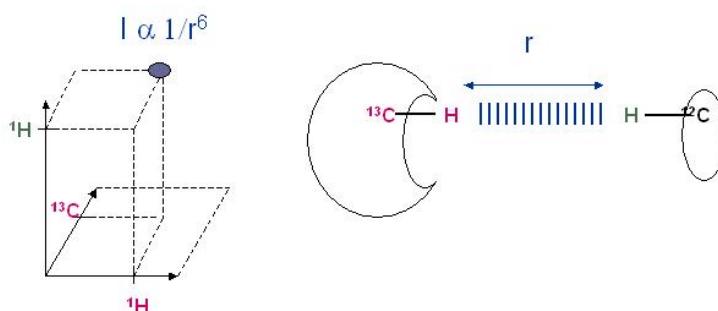


Figure 2-11 : Schématisation d'un spectre attendu pour une séquence NOESY-HSQC doublement filtré ^1H - ^{13}C

Sur le panneau de gauche est représenté le spectre obtenu qui comprend trois dimensions. Deux dimensions correspondent au plan HSQC ^{13}C du partenaire marqué (en rose), la troisième dimension correspond aux déplacements chimiques des protons du partenaire non marqué (en bleu). La présence d'un signal sur le spectre indique qu'un proton de la protéine non marquée est proche d'un couple H-C de la protéine marquée. L'identification des atomes impliqués se fait grâce à leurs déplacements chimiques. L'intensité I du signal attendu est proportionnelle à $1/r^6$, r est la distance inter-moléculaire entre les deux protons représentée sur le panneau de droite.

La distance inter-moléculaire entre deux protons impliqués dans l'interface peut être calculée à partir de l'intensité du signal, elle est proportionnelle à $1/r^6$.

6.3. Modélisation moléculaire

Les données fournies par les expériences NOESY-HSQC et NOESY-HSQC X-filtré lors d'une première approche d'attribution constituent un premier jeu de contraintes à longue distance utile pour la modélisation moléculaire d'un complexe protéique. Cependant, de nombreuses corrélations nOes ne peuvent être attribuées du fait des nombreuses ambiguïtés. Le logiciel ARIA (*Ambiguous Restraints for Iterative Assignment*) (Linge, et al., 2003; Nilges, 1995; Nilges, 1997) a été utilisé dans ce travail pour : i) lever les ambiguïtés sur l'attribution des corrélations nOes ii) déterminer la structure du complexe par modélisation moléculaire. Ce logiciel utilise un protocole qui intègre l'attribution automatique des nOes dans le calcul de la structure.

L'utilisateur fournit une liste de déplacements chimiques attribués et une liste de corrélations nOes partiellement attribuées. Il est possible d'introduire des paramètres supplémentaires tels que les angles de torsion, les couplages scalaires, les couplages dipolaires résiduels, des liaisons hydrogènes caractéristiques de la conformation en feuillet β ou hélice α ou encore des ponts disulfures. Le logiciel convertit la liste des corrélations nOes afin de générer des contraintes de distance ambiguës. Ces distances contiennent les contributions des distances entre toutes les paires de protons qui correspondent aux attributions possibles du nOe considéré. Le logiciel intègre toutes les ambiguïtés afin de calculer une structure. Le processus itératif appliqué permet de lever progressivement les ambiguïtés et d'obtenir un modèle structural de plus en plus fin, ce processus est schématisé sur la Figure 2-12. Les structures générées respectent les critères de géométrie imposées par les structures peptidiques comme les angles de torsions, les longueurs de liaisons ou la stéréospécificité, et correspondent à un minimum d'énergie totale.

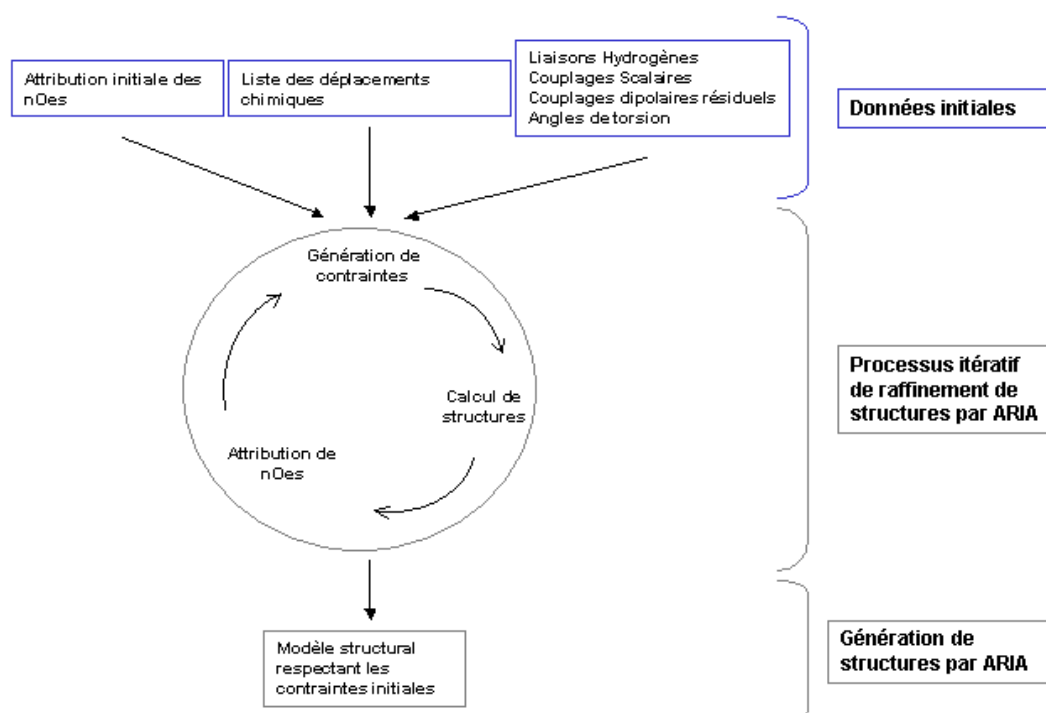


Figure 2-12 : Mode de fonctionnement du logiciel ARIA

Représentation schématique d'attribution automatique des corrélations nOes et de calcul de structure par le logiciel ARIA. Les trois étapes principales du logiciel sont représentées. Dans un premier temps, l'utilisateur fournit un ensemble de données. Il s'agit essentiellement d'une liste des déplacements chimiques, et des nOes partiellement attribués. L'utilisateur peut compléter ces données en introduisant des paramètres complémentaires tels que les angles de torsion, les couplages scalaires, les couplages dipolaires résiduels, des liaisons hydrogènes caractéristiques de la conformation en feuillet β ou hélice α ou encore des ponts disulfures. Dans un second temps, l'ensemble de ces données est converti en contraintes. Par exemple, le logiciel convertit la liste de corrélations nOes afin de générer des contraintes de distances ambiguës. Il s'agit de la première étape d'un processus itératif d'affinement de structures. Le logiciel intègre ensuite toutes les ambiguïtés afin de calculer une structure. A partir de cette structure, le logiciel ARIA complète l'attribution des nOes ce qui introduit de nouvelles contraintes... Ce processus itératif permet de lever progressivement les ambiguïtés et d'obtenir un modèle structural de plus en plus fin. Les structures générées respectent les critères de géométries imposées par les structures peptidiques comme les angles de torsions, les longueurs de liaisons ou la stéréospécificité, et correspondent à un minimum d'énergie totale.

**Chapitre 3 : Caractérisation structurale du complexe
Asf1/(H3/H4)**

1. Introduction

La capacité de la protéine Asf1 à interagir directement avec les histones (H3/H4) pour les assembler en nucléosomes fait de la fonction chaperon d'Asf1 l'une de ses fonctions principales. Afin de décrire précisément les règles qui régissent la spécificité de cette interaction ainsi que les mécanismes moléculaires associés, nous avons entrepris de caractériser la structure du complexe entre Asf1 et les histones H3/H4. Ainsi, nous avons entrepris de résoudre la structure du complexe entre le domaine conservé de *hAsf1* et l'hélice C-terminale (122-135) de l'histone H3. Puis nous avons réalisé une modélisation moléculaire afin de proposer un modèle du complexe *hAsf1* avec les histones entières (H3/H4). Nous avons également pu concevoir des mutants spécifiques de l'interaction Asf1/H3 de façon à étudier son rôle biologique *in vivo*.

Ce chapitre s'attache à décrire l'ensemble des étapes nécessaires à la détermination structurale du complexe Asf1/(H3/H4) et à l'étude *in vivo* de la fonction chaperon d'Asf1.

2. Caractérisation structurale du complexe Asf1/(H3/H4)

2.1. Stratégie

Au début de cette étude, nous disposions d'information structurale sur la protéine Asf1 seule et en interaction avec le peptide d'histone H3 mais aucune sur les caractéristiques structurales de ce même peptide. Le point de départ de ce projet a donc consisté à produire le peptide H3 (122-136) marqué uniformément ^{15}N ou $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ afin de réaliser une étude structurale de ce peptide seul et en interaction avec Asf1 par RMN. Ces données ainsi que celles de Asf1 (1-156) ont constituées une base solide pour la caractérisation structurale du complexe ASF1(1-156)/H3(122-135) puis la modélisation du complexe entier Asf1/(H3/H4).

2.2. Production du peptide H3(122-135) uniformément marqué ^{15}N ou $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$

L'objectif de cette section n'est pas d'exposer l'ensemble des détails d'expression et de purification du peptide H3(122-135) qui sont exposés dans le chapitre Matériel et Méthode mais plutôt de donner rapidement la méthode utilisée pour obtenir les quantités suffisantes de peptide marqué et très pur afin de réaliser une étude RMN.

Pour obtenir un peptide uniformément marqué, l'expression doit se faire dans un milieu culture ne comprenant que le minimum d'éléments nécessaires à la croissance des bactéries. Dans ce milieu de culture, la seule source d'azote est le sulfate d'ammonium marqué ^{15}N pour obtenir un peptide uniformément marqué au ^{15}N et la seule source de carbone est le glucose ^{13}C pour un double marquage uniforme ^{13}C - ^{15}N . L'utilisation d'un tel milieu limite la croissance des bactéries et par conséquent l'expression de protéine cible. Or, les quantités nécessaires pour résoudre la structure d'un complexe protéique par RMN sont importantes. Si un spectre classique HSQC de bonne qualité peut être réalisé à partir d'un échantillon de 500 μL à 0,5mM, les spectres de type NOESY-filtrée ^{13}C réalisés au cours de cette étude ont nécessités de 1,5 à 2mM de protéine marqué. Il est donc nécessaire d'avoir un protocole de purification qui nous permette d'extraire le maximum de peptide exprimé.

Dans cet objectif, le peptide H3(122-135) est co-exprimé avec la protéine GST (GST-H3(122-135)). En effet, l'une des propriétés de la GST est sa forte affinité pour le glutathion réduit. Cette propriété est essentielle à la première étape de purification. Deux autres avantages de cette co-expression sont également utilisés lors de la purification : d'une part, la GST est reliée au peptide par un site de coupure à la protéase Tev et d'autre part, la GST tout comme la protéase Tev sont marquées par un tag histidine. Ce tag est composé d'une succession de six histidines en position N-terminale de chaque protéine.

Pour obtenir un peptide très pur en quantité suffisante, trois étapes de purification ont été nécessaires. La première étape consiste à extraire du lysat cellulaire le peptide co-exprimé avec la GST. Pour cela, nous avons utilisé la chromatographie d'affinité GSH-agarose. Cette chromatographie se base sur la forte affinité de la GST pour le glutathion réduit. En effet, en mettant en contact le lysat cellulaire et des billes de glutathion réduit de la colonne de chromatographie, seule la GST-H3(122-135) reste fixé sur les billes. Après une succession de lavages seule la GST-H3(122-135) est récupéré après son élution de la colonne. Le peptide est ensuite séparé de la GST par simple action de la protéase Tev.



Figure 3-1 :

A gauche : gel SDS-PAGE de 12% de la purification par chromatographie d'affinité GSH-Sépharose du peptide de fusion GST-H3 (122-135). Puits 1, marqueur de poids moléculaire ; 2, surnageant contenant la protéine soluble avant passage sur colonne ; 3, Surnageant après passage sur colonne ; 4, Elution du peptide de fusion au GSH.

A droite : gel SDS-PAGE de 12% du peptide H3 (122-135) avant et après clivage à la protéase Tev. Puits 1, marqueurs de poids moléculaire ; 2, GST-H3 (122-135) avant clivage à la protéase Tev ; 3, GST-H3 (122-135) après coupure à la protéase Tev. La faible différence de migration entre les deux bandes atteste de la coupure à la protéase Tev. Le peptide, trop petit, n'est pas visible sur le gel

La seconde étape est de séparer le peptide H3(122-135) des deux protéines GST et TEV. Pour cela, une deuxième colonne d'affinité est utilisée. Comme les deux protéines sont marquées par un tag histidine, elles sont retenues sur une colonne de nickel, contrairement au peptide H3(122-135) qui est directement récupéré à la sortie de colonne. La troisième et dernière étape permet quant-à elle d'éliminer les impuretés accumulées durant les premières étapes de purification telles que l'imidazole et d'éviter une dégradation importante du peptide. Pour cette dernière étape, nous avons choisi une colonne de séparation en phase inverse RPC (Reverse Phase Chromatographie). Ce type de chromatographie, bien adapté à la séparation des polypeptides de faible poids moléculaire, permet de retenir le peptide H3(122-135) puis de l'éluer par un gradient de solvant hydrophobe. Cette étape est réalisée sur une HPLC semi-préparative. Comme le peptide ne contient pas de résidus aromatiques, le suivi de la chromatographie se fait à la longueur d'onde de la liaison peptidique c'est-à-dire 214nm. Le peptide est ensuite lyophilisé et solubilisé dans un tampon adapté à l'étude RMN. La Figure 3-1 représente des gels SDS-PAGE de suivi de la première étape de purification sur colonne purification du peptide H3(122-135).

L'un des points délicat de la purification du peptide de H3 est que celui-ci est très petit et comprend des résidus basiques, il est par conséquent très sensible à la protéolyse. Afin de limiter cette protéolyse, l'ensemble des étapes de purification ont été réalisés à 4°C.

2.3. Etude du peptide H3 (122-135) seul.

2.3.1. Attribution du peptide H3 (122-135)

D'ordinaire, l'attribution du squelette peptidique de petits peptides ne nécessite pas de marquage ^{13}C ou ^{15}N de celui-ci. Toutefois, comme nous envisageons de résoudre la structure du complexe Asf1(1-156)/H3(122-135), nous avons utilisé le peptide H3(122-135) marqué au ^{15}N pour réaliser son attribution. Celle-ci a été déterminée grâce à une succession de spectre NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC et HSQC-TOCSY réalisés à pH 4,6 et 283K. Dans ces conditions de pH, les échanges des protons amides avec l'eau sont minimisés ce qui permet d'optimiser l'intensité des signaux. La Figure 3-2 donne la séquence peptidique de H3(122-135) et illustre le spectre HSQC de H3 (122-135) attribué, le tableau des déplacements chimiques est reporté en annexe.

Séquence peptidique de H3(122-135) : GAMG-K₁₂₂DIQLARRIGERA₁₃₅

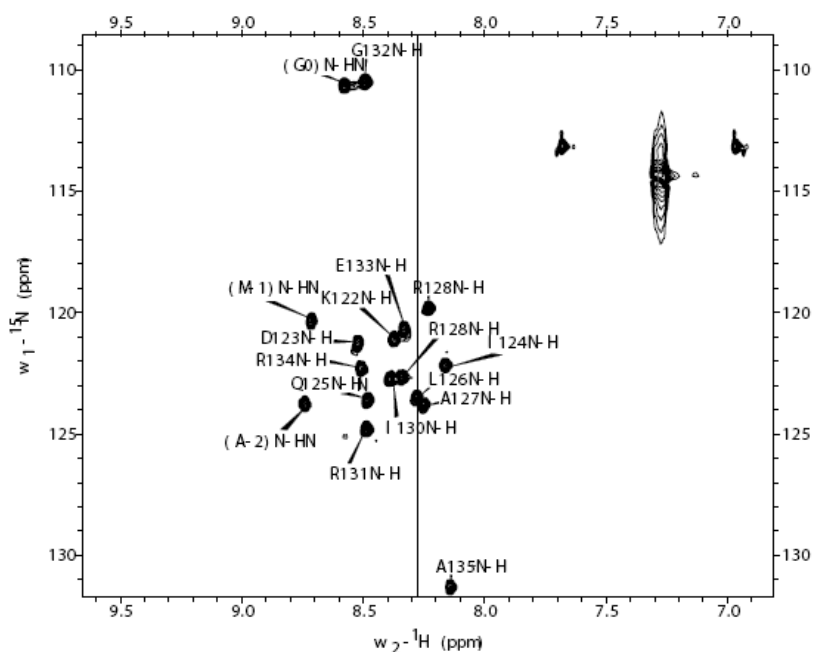


Figure 3-2 Spectre ^1H - ^{15}N HSQC attribué du peptide H3 (122-135)

La séquence peptidique du peptide H3(122-135) est indiquée au-dessus du spectre. Les résidus, GAMG, sont ajoutés en N-terminal pour des raisons liées à son clonage dans le vecteur d'expression. Spectre ^1H - ^{15}N HSQC du peptide H3 (122-135) (pH 4,6, 283K, 600MHz, Tampon H₂O, NaN₃, DSS, EDTA 0,2mM, D₂O 10%). Sur le spectre, les résidus GAMG en position N-terminale sont numérotés G-3, A-2, M-1 et G0. G-3 n'est pas observé

La faible dispersion spectrale des signaux observés sur le spectre HSQC suggère que le peptide ne contient pas de structure secondaire. Pour vérifier cette hypothèse, l'index des déplacements chimiques a été calculé. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent de méthodologie RMN, l'index des déplacements chimiques indique la propension locale de la chaîne à former préférentiellement une structure secondaire. Les profils des index de déplacements chimiques traduisent la différence entre les valeurs de déplacements chimiques observés pour chacun des noyaux et leur valeur « *random coil* » (valeur de déplacement chimique mesurée dans des peptides non structurés) (Ikura et al., 1991; Wishart et al., 1991; Wishart et al., 1992). Pour un noyau H^α , une différence négative indique la présence d'une structure secondaire résiduelle de type hélice α (à l'inverse, une différence positive indique une structure résiduelle en brin β). La Figure 3-3 présente les index de déplacement chimique des noyaux H^α du peptide H3 (122-135). Ces valeurs sont faiblement négatives et s'échelonnent entre 0 et -0.2. Par comparaison, *hAsf1*, qui possède une majorité de feuillet β , présente un profil d'index de déplacements chimiques s'échelonnant de -1.3 à 1.3 pour les noyaux H^α avec une valeur moyenne de 0,5.

Les faibles valeurs obtenues pour le peptide H3 (122 - 135) sont en accord avec le fait que ce fragment ne contient que peu de structures secondaires résiduelles. Remarquons cependant que les scores pour l'ensemble des résidus sont négatifs, ce qui traduit une faible propension du peptide adopter une structure hélicoïdale.

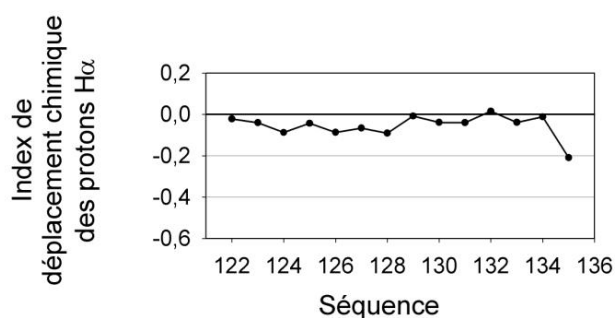


Figure 3-3 : Index de déplacement chimiques des protons H^α du peptide H3 (122-135)

Index de déplacement chimiques des protons H^α du peptide H3 (122-135) à 283°C et pH 4.6

2.3.2. Evolution des signaux de H3 (122-135) en fonction du pH

Le pH de solubilité maximale d'Asf1 est de 7,4. Pour cette raison, l'ensemble des expériences ultérieures nécessaires à la résolution structurale du complexe Asf1(1-156)/H3(122-135) ont été réalisées à un pH de 7,4. Or l'attribution des signaux du fragment de H3 a été obtenue à partir de spectres réalisés à pH4,6. Sachant qu'une variation de pH peut induire des variations de déplacements chimiques, nous avons étudié l'évolution des signaux HSQC du peptide H3(122-135) en fonction du pH. La Figure 3-4 montre le spectre HSQC du peptide H3 réalisé à pH4,6 en rouge superposé au spectre HSQC réalisé à pH7,4 en noir.

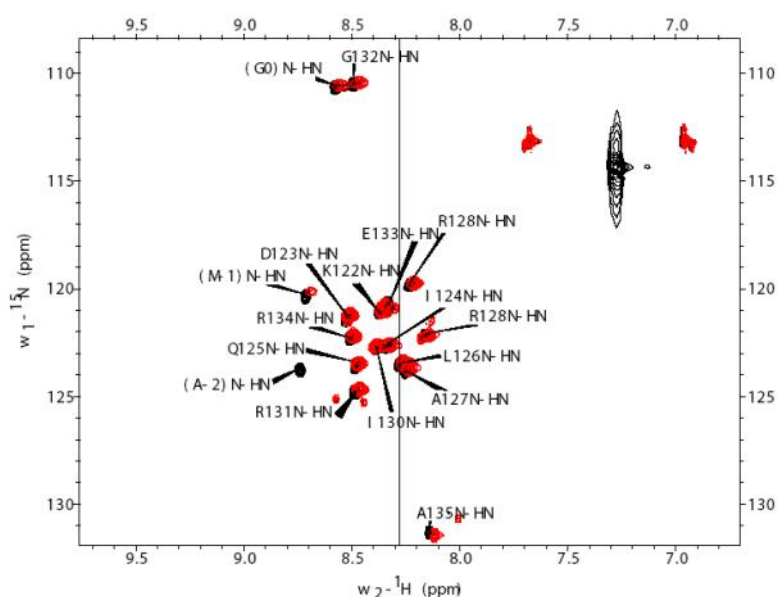


Figure 3-4 : Spectres HSQC ^1H - ^{15}N attribués de H3 (122-135) à différents pH

Superposition des spectres HSQC ^{15}N de H3 (122-135) à pH4,6 en noir et 7,4 en rouge. (Tampon H_2O , NaN_3 , DSS, EDTA 0,2mM, D_2O 10%, 600MHz, 283K)

Nous remarquons que l'augmentation du pH a conduit à une baisse globale de l'intensité des signaux voire une disparition complète du pic de corrélation dans le cas de A-2. Cette diminution de l'intensité des pics est due à l'augmentation de la vitesse d'échange proton-deutérium lorsque le pH augmente. Par contre les valeurs de déplacements chimiques ne sont que faiblement affectés par l'augmentation de pH.

2.4. Optimisation des conditions expérimentales en vue de l'étude structurale du complexe Asf1/(H3/H4)

Les spectres RMN contiennent énormément de signaux qu'il faut attribuer. Il est donc nécessaire de disposer de spectres de bonne résolution pour pouvoir distinguer la présence de plusieurs signaux dans un amas de signaux et un bon rapport signal sur bruit pour distinguer un signal caractéristique de la protéine étudiée d'un signal issu du bruit de l'expérience. Nous avons donc cherché à optimiser les conditions expérimentales telles que le pH, la température et la force ionique de l'échantillon. Nous avons vu précédemment que le pH de solubilité maximale de Asf1(1-156) est de 7,4, nous avons donc réalisé l'ensemble des expériences à ce pH. Nous avons optimisé la force ionique en réalisant une titration sur la concentration en sel NaCl de 0 à 250mM. A mesure que la concentration augmente, les signaux du complexe disparaissent. Nous nous sommes donc placés dans des conditions non salines pour l'ensemble des expériences réalisées. Nous avons également fait varier la température pour des spectres HSQC ¹⁵N pour chacun des partenaires. En effet, la température agit sur plusieurs facteurs. Plus la température est élevée, plus les raies sont fines, les hautes températures peuvent cependant déplier la protéine ou accélérer le processus de dégradation. La température peut également agir sur le ratio entre le peptide lié et libre puisque la constante de dissociation varie avec la température. Enfin, la température influence aussi le régime d'échange entre la forme libre et la formelié du signal RMN. Sur une gamme de température de 284K à 303K, les signaux les plus résolutifs sont obtenus à 303K pour *hAsf1* (1-156) et à 295,5K pour l'histone H3.

Notons qu'au cours des expériences hétéronucléaires en trois dimensions qui peuvent durer jusqu'à quatre jours nous avons observé une dégradation du peptide H3 (112-135). Un spectre HSQC ¹H-¹⁵N de l'échantillon après chaque expérience nous a permis de connaître l'état de dégradation du peptide. En effet, lorsque le peptide se dégrade, des signaux caractéristiques de l'état déplié apparaissent sur le spectre HSQC ¹⁵N du peptide en complexe avec Asf1(1-156). La présence de signaux sur les spectres de Asf1(1-156) correspondant à ceux de la protéine libre nous a également permis de détecter que le peptide se dégradait au sein de l'échantillon. Pour limiter les signaux de la protéine (¹³C-¹⁵N)Asf1 (1-156) nous nous sommes placés en léger excès d'histones H3(122-135), inversement, pour limiter les signaux du peptide (¹³C-¹⁵N)H3(122-135) libres, nous nous sommes placés en léger excès de *hAsf1*.

Au cours de cette étude, les expériences hétéronucléaires en trois dimensions HCCH-TOCSY, HCCH-COSY et NOESY-HSQC ^{13}C -filtré du complexe protéique ont présenté des spectres de faible rapport signal sur bruit et de nombreux artefacts avec l'eau. Afin d'optimiser le rapport signal sur bruit et la résolution de ces spectres, nous avons :

- utilisé des échantillons très concentrés du complexe (supérieurs au millimolaire),
- enregistré ces spectres sur des échantillons lyophilisés et solubilisés dans du D₂O,
- réalisé les spectres NOESY-HSQC ^{13}C et NOESY-HSQC ^{15}N sur un spectromètre de 800MHz avec un grand nombre de points dans la dimension indirecte.

2.5. Etude du peptide H3 (122-135) en interaction avec hAsf1

Cette section est consacrée à l'étude du comportement du peptide H3(122-135) en interaction avec Asf1(1-156) à partir des données RMN.

Afin de connaître le régime d'échange du peptide d'histone en interaction avec *hAsf1* (1-156) nous avons réalisé une titration par RMN. Cette expérience consiste à enregistrer des spectres HSQC d'échantillons d'histone H3(122-135) $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ en présence de quantité croissante de *hAsf1* (1-156). Au cours de cette titration, nous observons que l'ajout de Asf1 (1-156) à l'échantillon de H3 (122-135) $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ conduit à la disparition des signaux du peptide et à l'apparition simultanée de nouveaux signaux correspondant au peptide en interaction avec Asf1(1-156). Ce phénomène est caractéristique d'un régime d'échange lent par rapport à l'échelle de la RMN (supérieur à la milliseconde). Les signaux du peptide « libre » disparaissent totalement lorsque les deux partenaires sont en quantité équimolaire.

Compte tenu de la qualité des spectres obtenus, nous avons entrepris d'attribuer le squelette peptidique de H3(122-135) en interaction avec Asf1 (1-156) (Figure 3-5). Nous avons alors enregistré les spectres NOESY-HSQC et HSQC-TOCSY. Nous avons également cherché à obtenir un spectre TOCSY-HSQC mais celui-ci ne contenait aucun signal. C'est une difficulté souvent rencontrée dans l'étude de complexes (également rencontré pour l'analyse du complexe Rad53/Asf1) probablement relié au fait qu'il existe des phénomènes d'échanges qui pourraient défavoriser les transferts de type TOCSY. La Figure 3-5 présente la superposition des spectres HSQC attribués de H3 (122-135) enregistrés en absence et en présence de *hAsf1* (1-156).

Nous avons ensuite utilisé l'ensemble des données RMN obtenues précédemment pour en extraire des informations structurales sur le comportement de celui-ci lorsqu'il interagit avec Asf1 (1-156). Nous avons tout d'abord calculé l'index des variations de déplacements chimiques des protons H^α . Nous avons constaté que les résidus du fragment K122-I130 présentent des valeurs négatives avec une valeur moyenne de $-0,28 \pm 0,08$ ppm. Ces valeurs présentes sur la Figure 3-6 indiquent la présence d'une structure hélicoïdale entre les résidus K122 et I130

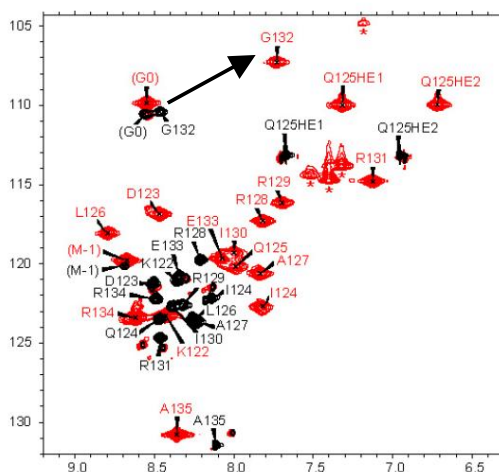


Figure 3-5 : Spectres attribués HSQC 1H - ^{15}N de H3(122-135)

Spectres HSQC ^{15}N de H3(122-135) en absence (en noir) et en présence (en rouge) de *h*Asf1 (1-156). (Tampon H_2O , NaN_3 , DSS, EDTA 0,2mM, D_2O 10%, 600MHz, 283K, pH7.4). La flèche noir indique la variation du déplacement chimique de la Glycine G132 de l'état déplié vers son état replié.

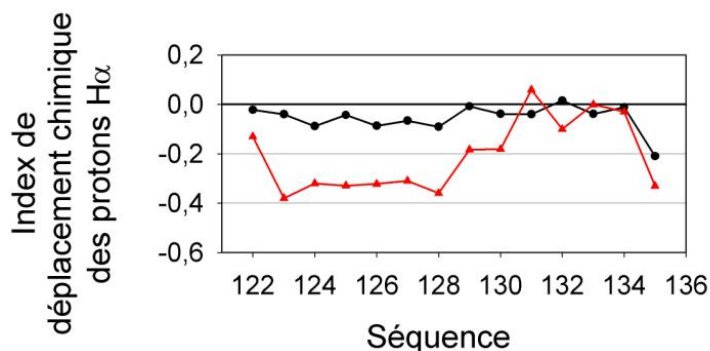


Figure 3-6 : Index de déplacement chimique des protons H^α du peptide H3 (122-135)

Index de déplacement chimiques des protons H^α du peptide H3 (122-135) libre en noir et en présence de hAsf1(1-156) en rouge.

La présence d'une hélice résiduelle avait déjà été observée pour le peptide isolé, il semble donc qu'Asf1 stabilise fortement cette conformation. Notons que les variations de déplacements chimiques illustrées sur la Figure 3-7 montrent que les résidus R131 et G132 subissent des perturbations importantes alors que les valeurs proches de zéros de leur index de déplacement chimique des protons H_α indiquent qu'ils n'appartiennent pas à l'hélice. Cette différence entre les données de l'index de déplacement chimique et les variations moyennes des déplacements chimiques provient du fait que ces dernières valeurs moyennent les valeurs de déplacements chimiques des H_αi avec les valeurs des protons H_iNi et de l'azote NiH_i. Ainsi, les variations moyennes des déplacements chimiques permettent de détecter les résidus affectés par un changement dans leur environnement. Nous pouvons donc déduire des valeurs moyennes des déplacements chimiques des résidus R131 et G132 que ceux-ci n'ont pas nécessairement une conformation aléatoire comme le suggère les données de l'index de déplacement chimique.

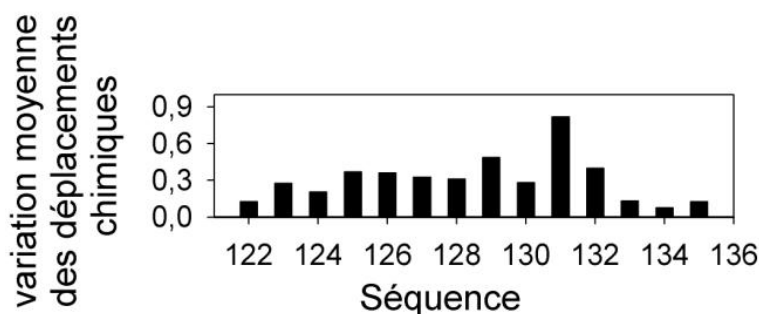


Figure 3-7 Variation moyenne des déplacements chimiques des protons HN, NH et H_α

$\Delta\delta_{\text{moy}} = (|\delta_{\text{HN}}^c - \delta_{\text{HN}}^f| + |\delta_{\text{H}\alpha}^c - \delta_{\text{H}\alpha}^f| + |\delta_{\text{NH}}^c - \delta_{\text{NH}}^f|/10)/3$, ou l'indice c correspond à la valeur de déplacement chimique mesurée pour la forme complexée et pour la forme libre.

Pour compléter ces informations, nous avons étudié la dynamique du peptide H3 (122-135) en complexe avec Asf1. L'expérience de mesure des nOes hétéronucléaires permet d'obtenir cette information car cette mesure est sensible à des mouvements dans la gamme de la picoseconde à la centaine de picosecondes. La Figure 3-8 présente les mesures des nOes hétéronucléaires des résidus de H3 (122-135).

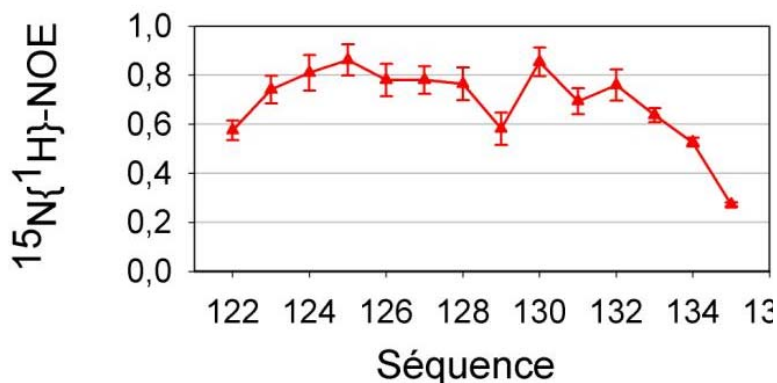


Figure 3-8 : Transfert de saturation $^{15}\text{N} \{^1\text{H}\}$ -nOe de H3 (122-135) complexé à Asf1 (1-156)

La valeur limite attendue pour un vecteur NH complètement rigide est de 0,82. Nous constatons que la valeur moyenne pour le fragment K122-G132 qui comprend l'hélice K122-I130 ainsi que les deux résidus R131 et G132 est de 0.74 ± 0.09 . Ce résultat confirme que le segment K122-G132 est fortement immobilisé dans le complexe avec Asf1 alors que les trois derniers résidus E133, R134 et R135 présentent une flexibilité plus importante, quoique limitée.

En résumé, l'ensemble de ces résultats montre qu'au contact de la protéine *hAsf1* (1-156), le peptide de H3 (122-135) se structure et adopte une conformation hélicoïdale des résidus K122 à I130 comme le schématise la Figure 3-9. Ces résultats préliminaires encourageant nous ont permis d'entreprendre la détermination à haute résolution du complexe entier *hAsf1* (1-156)/H3 (122-135).

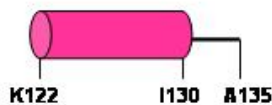


Figure 3-9 : Structure secondaire de H3(122-135) en complexe avec *hAsf1*(1-156)

L'hélice α_3 du peptide d'histone H3(122-135) qui se structure au contact de *hAsf1*(1-156) est représentée en rose. Elle comprend les résidus K122 à I130. La queue C-terminale composée des résidus R131 à A135 qui n'est pas repliée sous la forme d'hélice α et est représentée par un trait noir.

2.6. Détermination des distances intra- et inter-moléculaires du complexe Asf1(1-156)/H3(122-135)

Rappelons que pour entreprendre la détermination structurale à résolution atomique d'un complexe, il est nécessaire de disposer du plus grand nombre possible de distances inter-protons. Pour cela, il est nécessaire d'attribuer au préalable l'ensemble des protons du complexe et de corrélations nOes inter- et intra-moléculaires. Dans cet objectif, nous avons enregistré des expériences de HCCH-TOCSY, HCCH-COSY, NOESY-HSQC ¹⁵N, NOESY-HSQC ¹³C et NOESY-HSQC ¹³C-filtré sur des échantillons *h*Asf1/(¹³C/¹⁵N)H3 et (¹³C/¹⁵N)*h*Asf1/H3. Ces expériences ainsi que les informations structurales obtenues précédemment permettent d'attribuer les déplacements chimiques des protons des chaînes latérales puis d'extraire des distances intra- et inter-moléculaires. Ces distances servent ensuite de contraintes spatiales pour générer des modèles structuraux par le logiciel ARIA suivant un processus itératif.

L'ensemble des étapes nécessaires à la détermination des distances du complexe Asf1(1-156)/H3(122-135) est détaillé dans les paragraphes suivants.

2.6.1. Détermination des distances intra-moléculaires de H3 (122-135) en interaction avec Asf1 (1-156)

La Figure 3-10-A illustre l'attribution d'un résidu de l'histone H3 (122-135), le glutamate E133 à partir des spectres HCCH-TOCSY et HCCH-COSY. Dans cet exemple, si les signaux ont une résolution suffisante pour permettre leur attribution et ne se superposent à aucun autre signal, ce n'est pas le cas pour tous les résidus du peptide d'histone H3(122-135). En effet, malgré l'optimisation des conditions expérimentales décrites précédemment, les signaux des spectres HCCH-TOCSY et HCCH-COSY de l'histone H3 (122-135) en complexe avec *h*Asf1 (1-156) demeurent très larges et de nombreuses superpositions existent ce qui rend l'attribution des corrélations difficile.

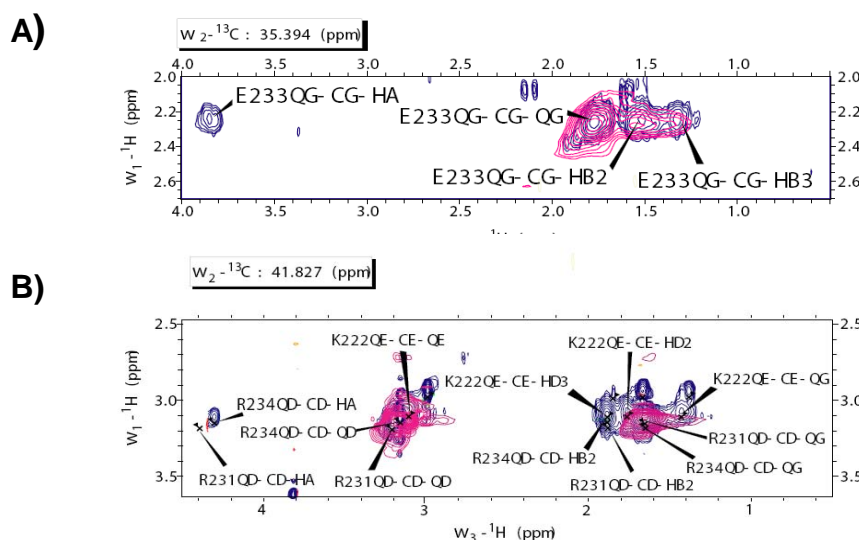


Figure 3-10 : Attribution des chaînes latérales

Superposition des spectres HCCH-COSY (en rose) et HCCH-TOCSY (en bleu) du peptide H3(122-135) utilisés pour l'attribution des chaînes latérales du peptide en interaction avec Asf1(1-156). La raison pour laquelle les résidus du peptide d'histone sont numérotés de 222 à 235 au lieu de 122 à 135 est expliquée ultérieurement.

A) Cas de l'attribution des protons H α , H β 2 et H β 3 glutamate E133 à partir du plan H γ -C γ : Trois types de protons caractéristiques d'un glutamate E sont observés sur ce spectre, le proton α (HA), les protons β 2 (HB2) et β 3 (HB3) et les protons γ (QG). Sur le plan H-H du carbone C γ , le signal correspondant à la corrélation QG-CG-QG est situé sur la diagonale du spectre. En partant de ce signal, sur une ligne horizontale se trouvent les corrélations du couple QG-CG avec les autres protons de la chaîne latérale du glutamate E133. Sur le spectre HCCH-COSY, seuls deux signaux sont présents, il s'agit des signaux correspondants aux protons situés sur les carbones adjacents au carbone C γ c'est à dire les protons H β 2 et H β 3. Sur le spectre HCCH-TOCSY, trois signaux sont présents en plus du signal de la diagonale, dont deux se superposent très bien aux signaux H β 2 et H β 3 présents dans le spectre HCCH-TOCSY. Par déduction et connaissant les déplacements caractéristiques des protons des glutamates, le troisième signal a pu être attribué au proton H α . Dans ce cas, les signaux observés sont suffisamment bien résolus pour permettre leur attribution complète. B) Exemple d'attribution délicate : sur le plan ^1H - ^1H du carbone C δ des arginines 131 et 134 sont superposés les signaux de deux arginines, R131 et R134, et de la lysine K122. De plus la faible résolution des signaux ne facilite pas l'attribution.

En particulier, l'attribution des déplacements chimiques des arginines s'est avérée délicate car ces résidus possèdent une chaîne latérale longue et la séquence du peptide H3 (122-135) en contient quatre. La Figure 3-10-B illustre la proximité des corrélations des arginines R131, R134 et de la lysine K122 sur le plan ^1H - ^1H du carbone C δ des arginines 131 et 134.

Pour faciliter cette attribution nous avons cherché à enregistrer des spectres CBCA(CO)NH. En effet, la connaissance des C α et C β de chaque résidu constitue un point de départ très utile dans l'attribution des chaînes latérales. Cependant, très peu de signaux sont présents sur le spectre et leur attribution a révélé que les corrélations correspondaient à celles du fragment de H3 (122-135) déplié et/ou dégradé.

Compte tenu de la faible sensibilité de cette expérience, nous avons testé différentes stratégies qui ont consisté à enregistrer plusieurs spectres plus sensibles pour obtenir les déplacements chimiques des $C\alpha$. Nous avons alors réalisé des expériences HNCOCA d'une part, HNCO et COCA d'autre part, pour obtenir les déplacements chimiques de l'ensemble des $C\alpha$. L'expérience HNCOCA est une expérience hétéro-nucléaire à trois dimensions qui permet de corrélérer via le groupement CO, le proton amide HN(i) au carbone $C\alpha(i-1)$. Les expériences HNCO et COCA permettent d'obtenir la même information mais en deux étapes successives : l'expérience HNCO permet de corrélérer le proton amide HN(i) au carbone CO (i-1), l'expérience COCA permet de corrélérer le carbone CO (i-1) attribué précédemment au carbone $C\alpha$ (i-1). Ici encore aucune de ces expériences classiques en RMN n'a donné de signal pour le peptide H3 (122-135) en interaction avec *hAsf1*(1-156). En revanche, le spectre NOESY-HSQC ^{13}C est de très bonne qualité. Ce spectre ainsi que le spectre du NOESY-HSQC ^{13}C -filtré dans le cas de *hAsf1* nous a permis de lever certaines ambiguïtés d'attribution.

Les attributions des chaînes latérales de l'histone H3(122-135) sont présentées sur le spectre HSQC ^{13}C ci-dessous :

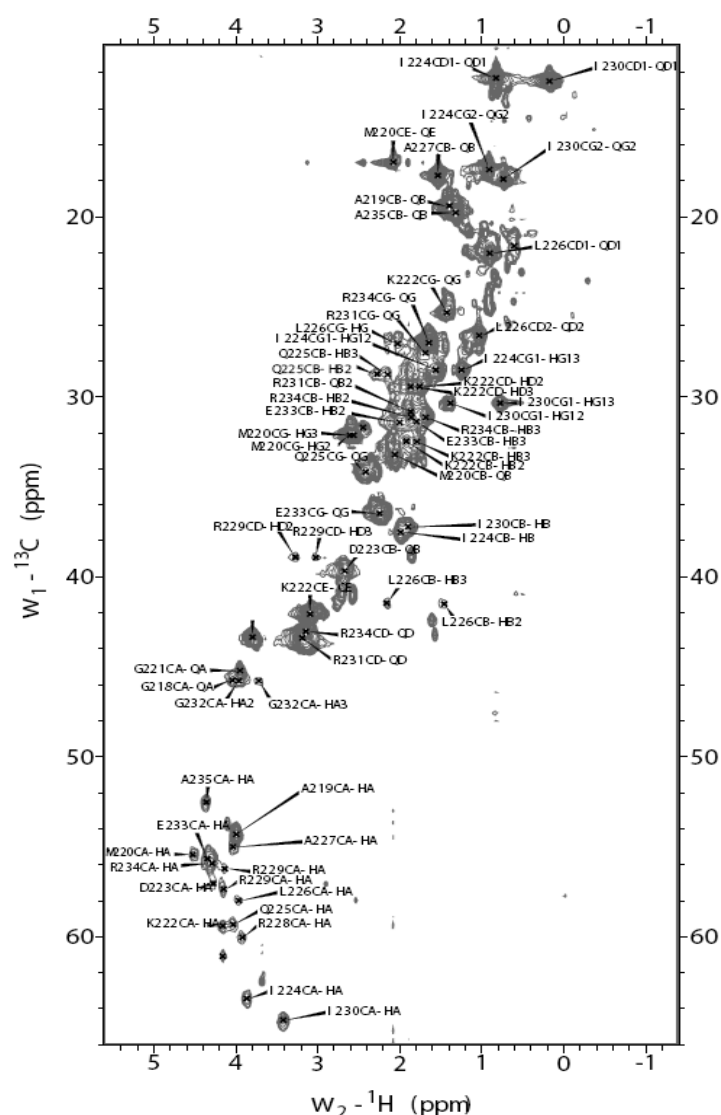


Figure 3-11 : Spectre HSQC ^{13}C centré sur les aliphatiques de l'histone H3 (122-135) et attribué.

Les signaux non attribués correspondent soit à des signaux issus des produits de dégradation du peptide soit à des signaux pour lesquels aucune correspondance n'a été trouvée dans les autres spectres enregistrés. La raison pour laquelle les résidus du peptide d'histone sont numérotés de 222 à 235 au lieu de 122 à 135 est expliquée ultérieurement.

2.7. Détermination des distances intra-moléculaires de *Asf1*(1-156) en interaction avec H3 (122-135)

De même que pour le peptide H3 (122-135), nous avons réalisé les expériences HCCH-TOCSY, HCCH-COSY, CBCA(CO)NH et NOESY-HSQC ^{13}C de *hAsf1* (1-156) marquée $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ en complexe avec le peptide H3(122-135) non marquée et solubilisée dans du D_2O .

Si les carbones $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ sont sensibles à la structure secondaire de la protéine, ils sont en revanche peu sensibles à un changement dans leur environnement. Nous avons donc utilisé l'attribution des déplacements chimiques des carbones $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ de la protéine *hAsf1* (1-156)

libre réalisée par F. Mousson lors de sa thèse pour guider l'attribution du complexe. Ainsi, nous avons pu attribuer 80% des C α et 70% des C β de *hAsf1* (1-156) en complexe. Cependant, cette attribution ne permet pas d'attribuer un nombre suffisamment important de protons de chaînes latérales de *hAsf1*(1-156) pour réaliser la modélisation ultérieure du complexe. Nous avons constaté que les protons qui ne se situent pas dans l'interface et ne sont pas directement affectés par l'interaction avec le peptide H3 (122-135) ont un déplacement chimique très proches de ceux de la forme libre. Notre stratégie a donc consisté à conserver l'attribution des protons de la forme libre de *hAsf1* ne participant pas à l'interaction avec le peptide H3 et à attribuer uniquement les protons des résidus impliqués dans la région d'interaction déterminée préalablement par F. Mousson et A. Lautrette au laboratoire (Figure 3-12). Ainsi, nous nous sommes focalisés sur l'attribution des résidus D88-V113 et P144-N152 de *hAsf1* (1-156) situés au cœur et au proche voisinage de la région d'interaction avec l'histone H3. Le spectre HSQC ^{13}C de la Figure 3-13 reporte ces attributions.

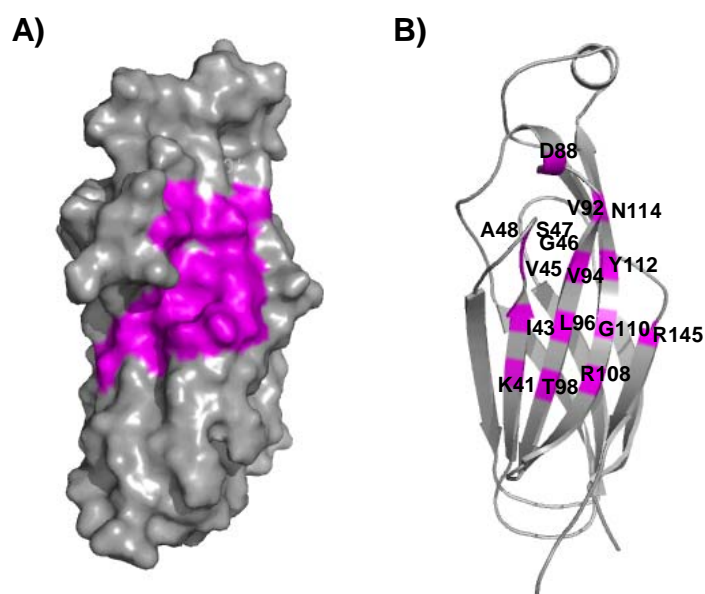


Figure 3-12 : Résidus de *hAsf1*(1-156) participant à l'interaction avec l'histone H3 (122-135).

A) Représentation de la surface de *hAsf1*(1-156), B) représentation de *hAsf1*(1-156) en ruban. Les résidus d'Asf1 affectés par la présence de H3 (122-135) sont indiqués et colorés en magenta. Les autres résidus d'Asf1 sont en gris.

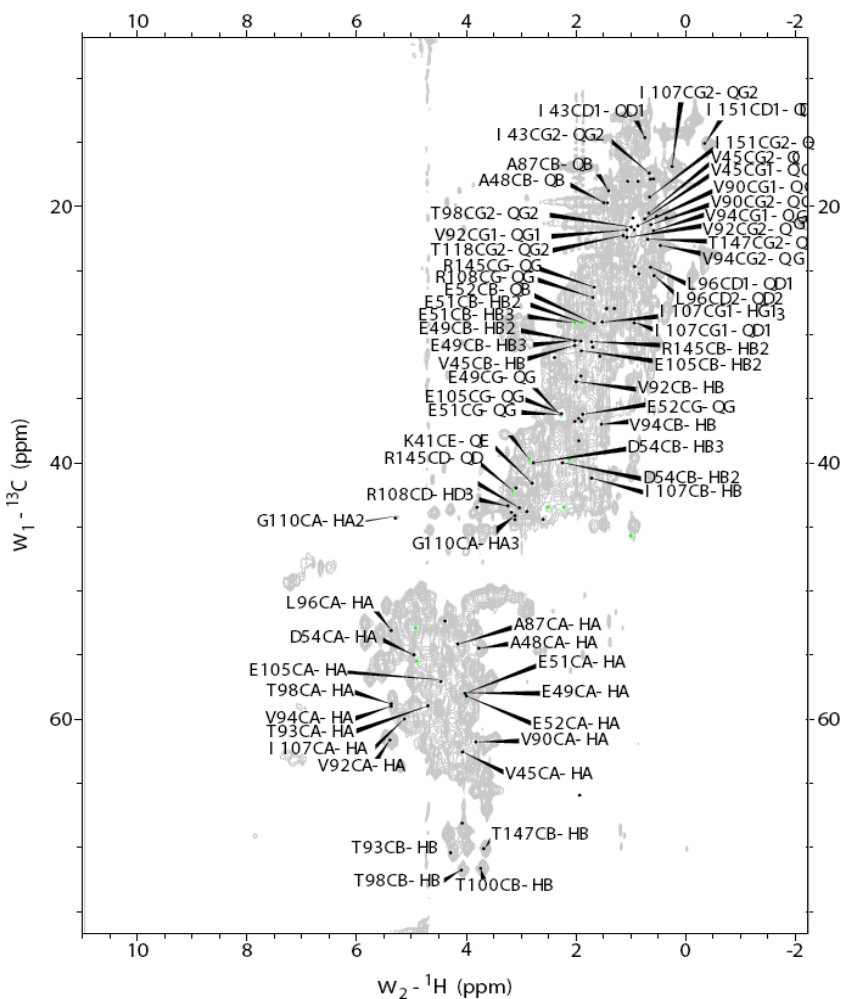


Figure 3-13 : Spectre HSQC ^{13}C de *hAsf1* (1-156) centré sur les aliphatiques

Attribution des chaînes latérales des résidus au niveau et au voisinage de l'interface.

2.8. Détermination des distances inter-moléculaires du complexe *Asf1*(1-156)/H3(122-135)

Sur les spectres NOESY-HSQC ^{13}C filtrés qui permettent d'obtenir des corrélations inter-moléculaires, nous avons observé la présence de signaux sur la diagonale. Or peu de signaux sont attendus à cette position. Ces signaux pourraient correspondre à une corrélation impliquant un proton de la protéine *hAsf1*(1-156) qui serait proche de celle du peptide de H3(122-134) ayant exactement le même déplacement chimique. Il est plus probable que ces signaux soient dus à des imperfections du filtre ^{13}C . Pour repérer les signaux intra-moléculaires résiduels, nous avons réalisé deux expériences filtrées ^{13}C , l'une pour laquelle le ^{13}C est découplé lors de l'étiquetage des déplacements chimiques des protons de la dimension indirecte et l'autre pas. Lorsque le ^{13}C n'est pas découplé, les protons reliés à un ^{13}C qui n'ont pas été filtrés présentent un dédoublement du pic de

corrélation avec un écart correspondant à la constante de couplage J_{CH} . En comparant les deux spectres, découplé et non découplé, nous pouvons distinguer les couples ^{13}C - 1H qui n'ont pas été correctement filtrés lors de l'expérience et qui présentent des corrélations intramoléculaires. Un exemple est présenté sur la Figure 3-14. Sur le plan 1H - 1H du carbone $C\delta$ de l'arginine R108 *hAsf1*(1-156) le signal situé sur la diagonale est dédoublé en absence de découplage en ^{13}C n'a pas lieu. Le signal correspond donc à une corrélation intra-moléculaire résiduelle. En revanche, la corrélation avec le proton $H\delta$ de l'arginine R108 de *hAsf1*(1-156) n'est pas dédoublée en absence de découplage ^{13}C . Il s'agit donc bien d'une corrélation inter-moléculaire, elle a été attribuée aux protons γ de l'arginine R131 du peptide de l'histone H3.

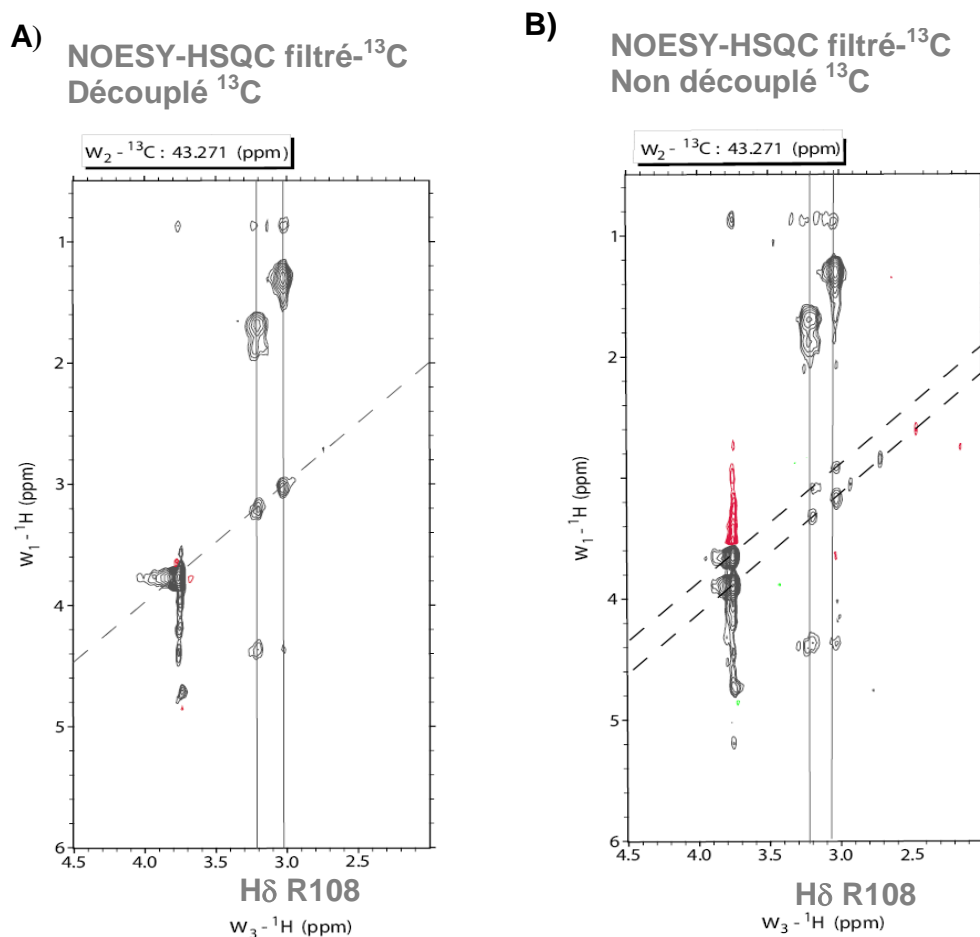


Figure 3-14 : Effet du découplage en ^{13}C pendant l'acquisition

Spectres NOESY-HSQC filtré ^{13}C sur Asf1 A) sans découplage ^{13}C pendant l'acquisition, B) avec découplage. Les signaux qui se dédoublent lorsqu'il n'y a pas de découplage lors de l'étiquetage des déplacements chimiques sont dus à des protons reliés à un ^{13}C qui n'a pas été correctement filtré. Le plan représenté est le plan 1H-1H correspond au déplacement chimique du carbone $C\delta$ du résidu R108 de Asf1(1-156). Dans cet exemple, les corrélations de la diagonale se dédoublent, ce qui indique que, dans ce cas, la totalité de l'aimantation des protons reliés à un ^{13}C n'a pas été filtré. Les tirets gris indiquent la diagonale du spectre.

Lors du traitement de ces spectres, nous avons constaté que certains groupes méthyles des alanines et des valines présentent des signaux correspondants à des corrélations intermoléculaires de très fortes intensités voire des traînées. La Figure 3-15 montre les corrélations obtenues sur le proton H β -C β de l'alanine A48 de *hAsf1* (1-156). L'intensité des corrélations étant importante, les contraintes de distances qui en résultent correspondent à des distances très faibles qui ne peuvent être respectées lors de la modélisation moléculaire. Nous avons cependant conservé ces contraintes car elles se sont révélées être essentielles à la convergence du modèle structural.

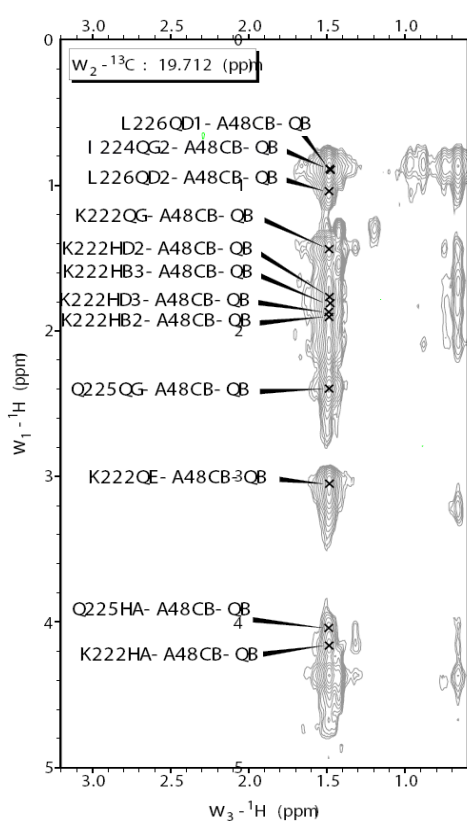


Figure 3-15 : Superposition de signaux dans les spectres NOESY-HSQC ^{13}C

Exemple de l'alanine *hAsf1*-A48 Vue du plan 1H-1H β -C β correspondant à l'alanine A48 de *hAsf1* (1-156).

Nous avons également constaté que les spectres NOESY-HSQC ^{13}C -filtré présentent des variations d'intensité de signal en fonction du partenaire observé. En effet, les signaux du spectre NOESY-HSQC ^{13}C -filtré réalisé sur le peptide H3 (122-135) sont moins nombreux et de plus faible intensité que ceux du spectre NOESY-HSQC ^{13}C -filtré réalisé sur la protéine *hAsf1* (1-156).

Afin de minimiser les erreurs d'attributions, nous avons choisi de considérer uniquement les signaux qui présentent un signal symétrique dans les deux séries d'expériences filtrées réalisées avec respectivement *hAsf1* (1-156) et H3 (122-135) marqués. En effet si un proton de l'histone H3 (122-135) (noté $^1\text{H}(\text{H3})$) est proche d'un proton de *hAsf1* (noté $^1\text{H}(\text{Asf1})$) au niveau de l'interface, la corrélation $^1\text{H}(\text{H3})$ - $^1\text{H}(\text{Asf1})$ doit être présente à la fois sur le spectre NOESY-HSQC ^{13}C -filtré réalisé sur le peptide H3 (122-135) marqué et sur le spectre NOESY-HSQC ^{13}C -filtré réalisé sur la protéine *hAsf1* (1-156) marquée.

L'exemple de la corrélation entre les protons H δ 1 de la leucine L96 de *hAsf1* (L96QD1) et le proton H α de l'isoleucine I130 de l'histone H3 (I230HA) est illustré sur la Figure 3-16. Nous constatons que sur le spectre NOESY-HSQC ^{13}C -filtré (Figure 3-16-B) de *hAsf1* (1-156), les protons L96 $^1\text{H}\delta$ 1 de déplacement chimique 0.6ppm présentent une corrélation avec un proton de l'histone H3 de déplacement chimique 3.4ppm. S'il s'agit effectivement d'une corrélation inter-moléculaire, un signal ^1H - ^1H de coordonnées 0.6ppm-3.4ppm doit être observé sur le spectre NOESY-HSQC ^{13}C -filtré (Figure 3-16-C) de l'histone H3 (122-135). Un tel signal est effectivement présent dans le plan H-H du C α et la valeur de 3,4ppm correspond bien au déplacement chimique conventionnel du proton H α de l'isoleucine I130 de l'histone H3 (122-135) préalablement attribué. Il est intéressant de noter que la corrélation I130H α -L96H δ 1 est également présente sur les spectres NOESY-HSQC ^{13}C de *hAsf1* (1-156) et de l'histone H3 (122-135) (respectivement Figure 3-16-A et D). Pour éviter la redondance des attributions, nous n'avons donc pas cherché à attribuer dans ces spectres les signaux pour lesquels il existe un signal dans les spectres filtrés.

Une première analyse manuelle de l'ensemble de ces spectres nous a permis d'attribuer 91 contacts inter-moléculaires

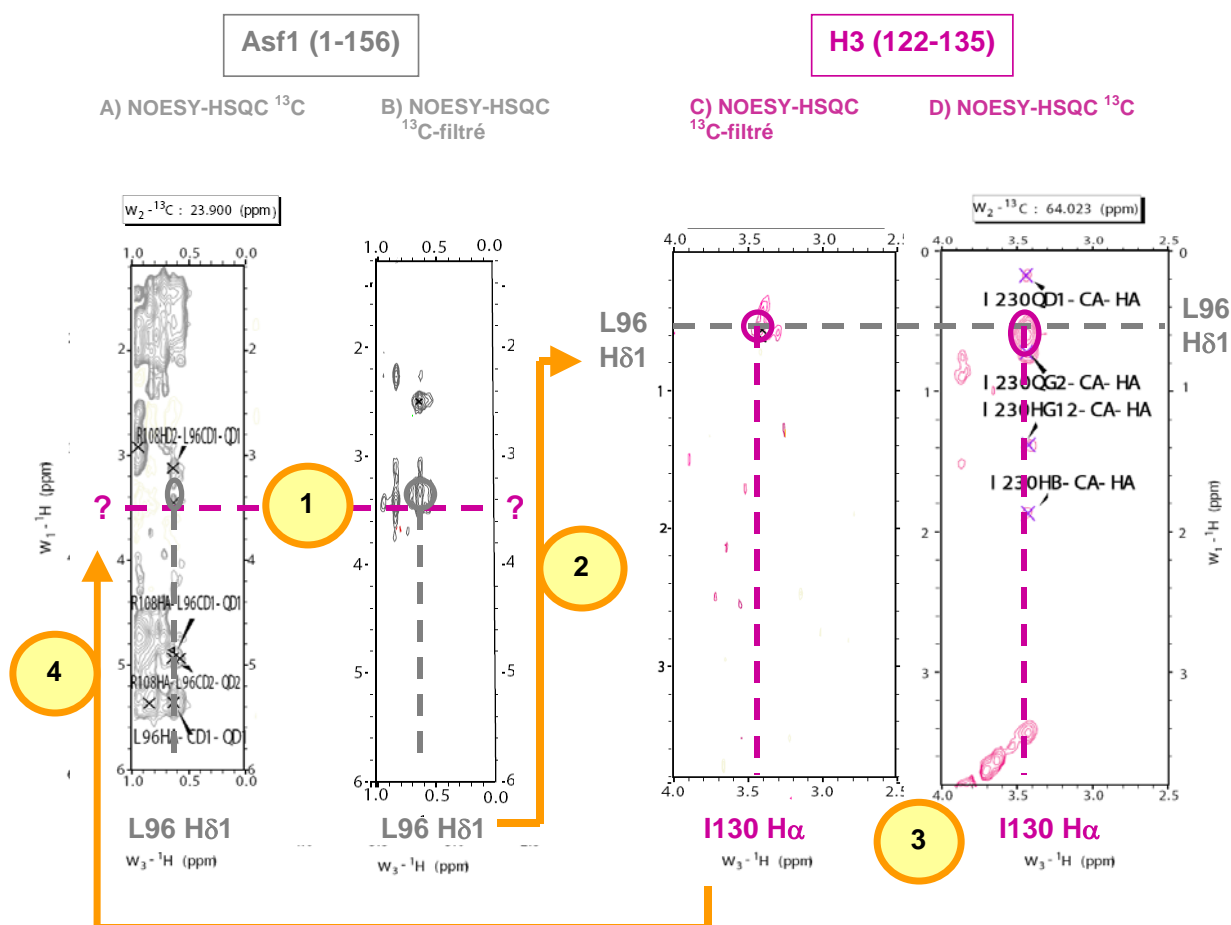


Figure 3-16 : Attributions initiales des corrélations inter-moléculaires

Exemple d'attribution des corrélations intermoléculaires entre les protons $H\alpha$ -I130 de l'histone H3 (122-135) et $H\delta$ L96 de Asf1(1-156) à partir de l'attribution de L96 $H\delta$ -C δ 1. Les spectres NOESY-HSQC ^{13}C et NOESY-HSQC ^{13}C -filtré obtenus pour *h*Asf1 (1-156) sont en gris (figure A) et B) respectivement), ceux de l'histone H3 (122-135) sont en magenta (figure C) et D)). Les indications jaunes indiquent les étapes de l'attribution.

Le point de départ est une corrélation présente à la fois sur les spectres NOESY-HSQC ^{13}C et sur le NOESY-HSQC ^{13}C -filtré au niveau du plan 1H - 1H correspondant au déplacement chimique du carbone C δ 1 du résidu L96 de Asf1(1-156) et non attribué (1). Ensuite, nous avons recherché sur les plans 1H - 1H du spectre NOESY-HSQC ^{13}C -filtré du peptide H3(122-135), une corrélation ayant le même déplacement chimique que le proton L96 $H\delta$ de Asf1(1-156), également présent dans le spectre NOESY-HSQC ^{13}C du peptide et non attribué (2). Nous avons trouvé en corrélation correspondante avec le proton $H\alpha$ -I130 de l'histone H3 (122-135) au niveau du plan 1H - 1H correspondant au déplacement chimique du carbone C α du résidu I130 de l'histone H3 (3). Nous avons donc pu attribuer cette nouvelle corrélation dans l'ensemble des spectres (4).

Cette méthode d'attribution a également été utilisée pour attribuer des corrélations inter-moléculaires à partir d'un résidu du peptide H3 (122-135) attribué.

2.9. Modélisation moléculaire du complexe Asf1 (1-156)/ H3(122-135)

Nous avons choisi d'utiliser le logiciel ARIA pour réaliser la modélisation moléculaire du complexe *hAsf1*(1-156)/H3(122-135). Ce logiciel associe à chaque spectre NOESY-HSQC un ensemble de distances inter-protons calculés à partir de l'intensité des signaux. Un total de sept spectres a été utilisé pour la détermination de modèles structuraux du complexe *hAsf1*(1-156)/H3(122-135). Quatre spectres ont été réalisés sur la protéine *hAsf1*(1-156) marquée $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ en complexe : un spectre NOESY-HSQC ^{15}N , deux spectres NOESY-HSQC ^{13}C l'un centré sur les aromatiques et l'autre sur les aliphatiques, et un spectre NOESY-HSQC ^{13}C -filtré. Les mêmes spectres ont été réalisés sur les peptides H3(122-135) marqué $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ en complexe avec Asf1 à l'exception du spectre NOESY-HSQC ^{13}C centré sur les aromatiques car le peptide ne contient pas de résidus aromatiques. Les spectres NOESY-HSQC et NOESY-HSQC filtré- ^{13}C ont fourni les corrélations nOes intra- et inter-moléculaires respectivement.

Par ailleurs, le logiciel ARIA a initialement été conçu pour générer des modèles structuraux de protéines isolées et non de complexes. Certaines modifications au niveau des fichiers de données expérimentales nous ont permis d'utiliser le logiciel ARIA pour résoudre la structure de complexes protéiques. En particulier, la numérotation des résidus du peptide H3 (122-135) a été modifiée de 222 à 235 pour qu'il n'y ait aucune confusion avec les résidus 122 à 135 d'Asf1 (1-156). Les deux partenaires ont donc été présentés sous la forme de deux domaines d'une même chaîne peptidique. Le logiciel considère donc *hAsf1* (1-156) et H3(222-235).

A partir des spectres fournis et des listes de déplacements chimiques partiellement attribués, le logiciel ARIA calcule des contraintes de distance et génère des modèles structuraux. De façon surprenante, lors des premiers essais de modélisation, nous avons constaté qu'au cours du processus raffinement, *hAsf1* (1-156) et H3 (122-135) s'éloignaient l'un de l'autre. Ce phénomène peut s'expliquer par le mode d'attribution des corrélations par le logiciel ARIA (cf. Figure 2-12). En effet, lors de la première étape du processus de raffinement ARIA génère un premier modèle structural à partir duquel de nouvelles contraintes de distances inter-atomiques sont générées. Ces nouvelles contraintes de distances et les déplacements chimiques de chaque atome permettent au logiciel ARIA de discriminer entre plusieurs possibilités et ainsi d'attribuer de nouvelles corrélations. Cependant, comme les répartitions

spectrales des déplacements chimiques des protons des deux partenaires se superposent, le logiciel ARIA se base surtout sur le respect des contraintes de distance pour discriminer entre les différentes corrélations possibles. Or, lors des premières itérations, ce sont l'interaction entre des protons intra-moléculaires qui respectent le mieux ces contraintes. Ainsi, lorsqu'une ambiguïté entre deux protons, l'un intra- et l'autre inter-moléculaire, se présente pour l'attribution d'une corrélation, le logiciel favorisera les corrélations intra-moléculaires. Tout se passe donc comme si les deux partenaires se structuraient l'un à côté de l'autre sans aucune interaction inter-moléculaire.

Nous avons résolu ce problème en forçant le logiciel à considérer uniquement des possibilités de contacts inter-moléculaires pour les signaux issus des spectres filtrés des deux protéines. Pour cela, nous avons artificiellement augmenté les déplacements chimiques des protons de l'histone H3 (122-135) de 200 ppm dans les listes de déplacements chimiques associées aux spectres de filtre isotopique. Ainsi, au cours de l'attribution de nouvelles corrélations par le logiciel ARIA, il n'y a plus d'ambiguïté sur la nature intra- ou inter-moléculaire de la corrélation.

Nous avons ensuite évalué les modèles structuraux et les nouvelles attributions fournies par ARIA. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur le respect des contraintes de distances inter-protons et la structure du complexe généré par le logiciel ARIA. Une macro, conçue par R. Guérois, nous a permis de visualiser le degré de violation des contraintes de distances extraites du logiciel ARIA sur le logiciel d'attribution Sparky et sur le logiciel de représentation graphique des protéines Pymol par l'intermédiaire d'un code couleur. La Figure 3-17 illustre l'utilité d'une telle macro. Sur le spectre NOESY-HSQC ¹³C-filtré de *hAsf1* (1-156), quatre corrélations ont été attribuées soit manuellement soit par le logiciel ARIA. La corrélation R131H α -L96C δ 2-H δ 2 est colorée en rouge, ce qui indique que la distance entre le proton H α de l'arginine R131 de l'histone H3 et le proton H δ 2 de la leucine L96 de *hAsf1* (1-156), calculées à partir de l'intensité du nOes, ne sont pas respectées dans la structure (Figure 3-17-B) modélisée par ARIA. Dans ce cas, une réattribution du pic de corrélation est nécessaire. Cette réattribution peut se faire à partir du modèle structural généré par ARIA grâce auquel il est possible de repérer les protons de l'histone H3 proches dans l'espace du proton H δ 2- L96. Sachant également que le déplacement chimique vers 4ppm du pic de

corrélation considéré est dans la gamme des valeurs conventionnelles des $H\alpha$, une nouvelle attribution peut être proposée puis traitée par le logiciel ARIA. Les deux autres corrélations I123H γ 13-L96C δ 2-H δ 2 et I123H γ 12-L96C δ 2-H δ 2 colorées en jaune, et la corrélation I130H α -L96C δ 2-H δ 2 colorée en bleu ont une intensité qui est en accord avec les distances interproton au sein du modèle structural. Ces attributions peuvent donc être conservées pour les modélisations suivantes.

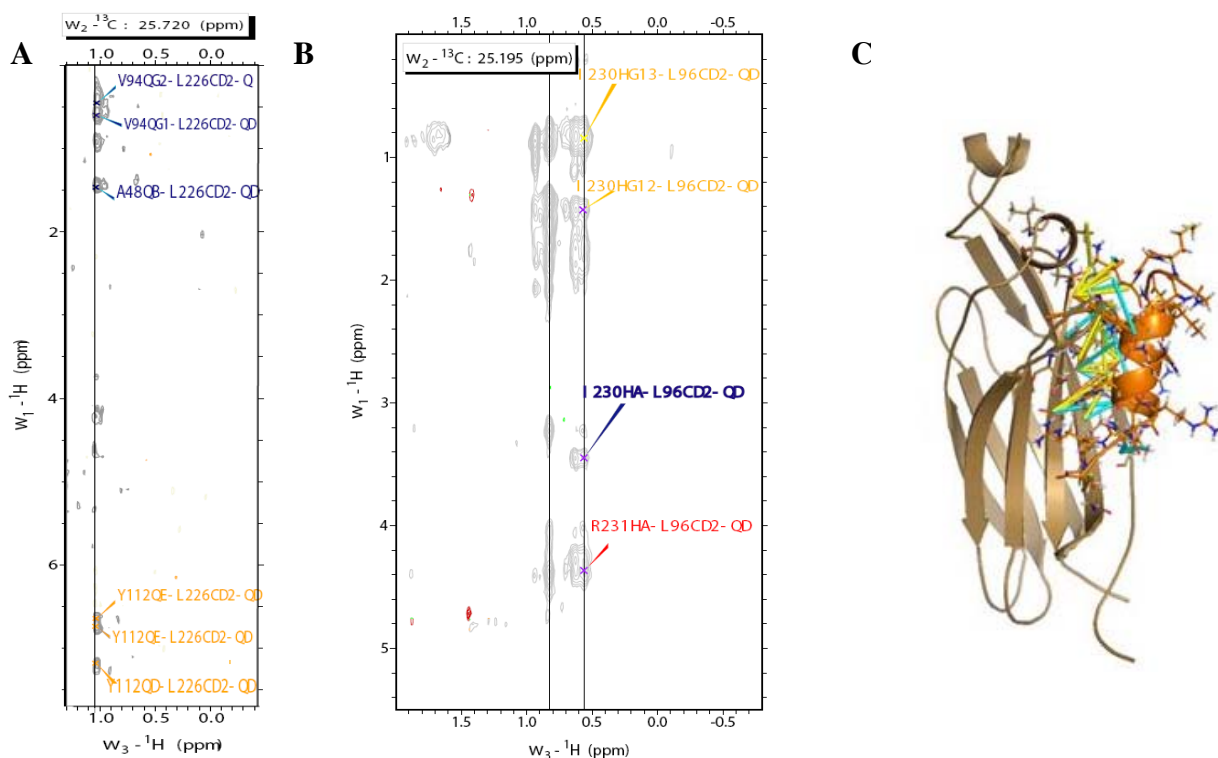


Figure 3-17 : Prise en compte des distances inter-moléculaires dans la génération de modèles.

A) et B) Spectres NOESY-HSQC filtré ^{13}C du fragment H3(122-135) et de la protéine *hAsf1* (1-156) respectivement. A la suite du processus de modélisation moléculaire d'ARIA, les degrés de violation des contraintes de distances issus des expériences RMN sont indiqués par un code de couleur : en bleu les distances respectées, en jaune les distances moyennement respectées et en rouge les distances non respectées. Les corrélations indiquées sont attribuées soit manuellement soit par le logiciel ARIA. Si les distances inter-atomiques calculées à partir de ces corrélations (en rouge) ne peuvent être respectées lors de la modélisation, leur attribution doit être reconsidérée. Pour la raison citée dans le paragraphe 2.9 de ce chapitre, les résidus du peptide d'histone H3 sont numérotés de 222 à 235 au lieu de 122-135. C) Représentation de la structure du complexe *hAsf1*(1-156) / H3(122-135) en cours de raffinement : La protéine *hAsf1*(1-156) est représentée en marron, le peptide H3(122-135) en orange. Les traits entre les deux partenaires indiquent les distances intermoléculaires, la couleur est fonction du respect des contraintes expérimentales qui ont servi à la modélisation moléculaire par ARIA ; en bleu les distances respectées, en jaune les distances moyennement respectées et en rouge les distances non respectées. A partir de cette représentation, il est possible de vérifier le respect des distances interatomique et de proposer de nouvelles attributions dans le cas où deux atomes sont proches dans le modèle calculé et qu'une corrélation correspondant à leur déplacement chimique est observée dans les spectres.

Au fur et à mesure que les spectres NOESY-HSQC ont été complétés, les contraintes de distance sont plus nombreuses et les modèles générés par ARIA convergent vers un ensemble de structures qui respectent les contraintes expérimentales. De cette façon, nous avons attribué un total de 145 contacts inter-moléculaires qui ont permis de positionner et d'orienter le peptide H3 (122-135) et *hAsf1* (1-156) l'un par rapport l'autre. Les 20 structures de plus basses énergies générées par le logiciel ARIA sont représentées sur la Figure 3-18.

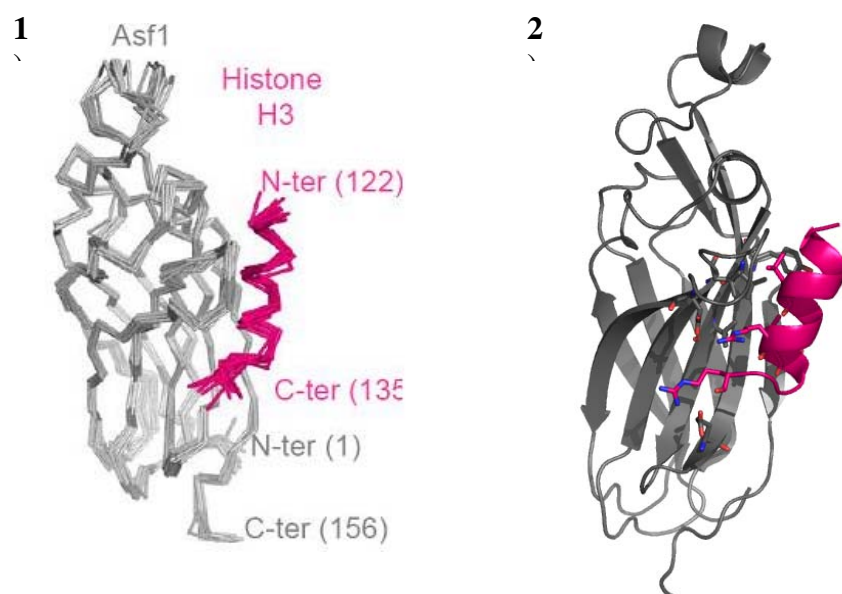


Figure 3-18 : Représentation de la structure du complexe *hAsf1*(1-156)/H3(122-135) générée par ARIA

- 1) Superposition des 20 squelettes peptidiques des structures de plus basse énergie, en gris la protéine *hAsf1* (1-156), en rose le peptide H3 (122-135)
- 2) Représentation en ruban de la structure la plus représentative du complexe reflétant la structure moyenne.

Le rmsd (*root-mean-square-deviation*) correspondant aux variations des atomes du squelette peptidique entre toutes ces structures est de 0,74Å. Cette valeur est faible et indique une convergence des calculs de modélisation du complexe par ARIA. Cependant, les deux derniers résidus de l'histone H3, E134 et A135, sont plus flexibles et présentent un rmsd sur le squelette peptidique de 2,06Å. Ces données sont compatibles avec l'étude dynamique de l'histone H3 (122-135) en complexe avec *hAsf1* (1-156) réalisé au paragraphe 2.4, la mesure des $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ nOes montraient que la partie C-terminale du peptide est plus dynamique que la partie hélicoïdale. En accord avec la cartographie des variations de déplacement chimique établie par F. Mousson, le peptide H3 (122-135) interagit avec les résidus hydrophobes de *hAsf1*(1-156) centrées autour de la valine V94 et conservés au court de l'évolution et exposés

au solvant. Cette surface d'interaction est large puisqu'elle s'étend sur 430 Å, elle comprend un enchevêtrement de résidus hydrophobes ainsi qu'un réseau de ponts salins visible sur la Figure 3-18.

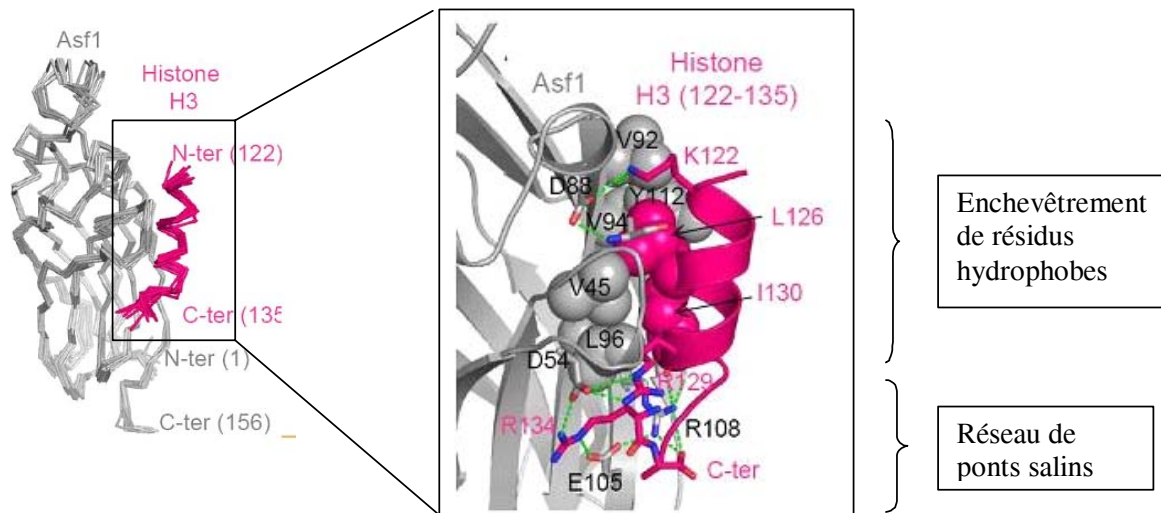


Figure 3-19 : Caractéristiques de l'interface Asf1(1-156)/H3(122-135)

Représentation de l'interface entre *hAsf1*(1-156), colorée en gris, et H3(122-135), colorée en rose. L'interface se caractérise par un enchevêtrement de résidus hydrophobes stabilisé par un réseau de pont-salins au niveau de la queue C-terminale de H3(122-135). Les résidus impliqués dans l'interaction sont indiqués. Les chaînes latérales des résidus impliqués dans le réseau de ponts salins sont représentées par des bâtonnets, celles des résidus hydrophobes sont sous forme de sphère. Les pont-salins sont représentés par des tirets verts.

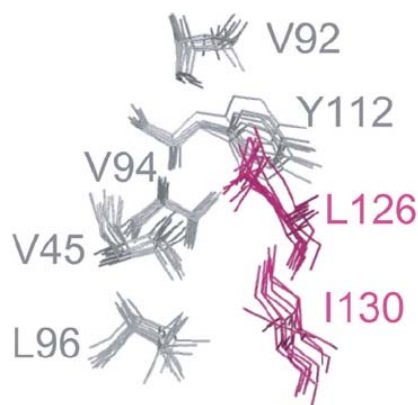


Figure 3-20 : Enchevêtrement des résidus hydrophobes de l'interface

Superposition des chaînes latérales des résidus hydrophobes impliqués dans l'enchevêtrement de résidus hydrophobes de l'interface des 20 structures de plus basse énergie obtenues. Les résidus de *hAsf1A* sont représentés en gris, ceux de l'histone H3 en magenta.

L'enchevêtrement de résidus hydrophobes représenté sur la Figure 3-20 comprend les chaînes latérales de deux résidus de l'histone H3, L126 et I130, entouré par les résidus hydrophobes d'Asf1 : V45, V92, V94, L96 et Y112.

Ces résidus sont très conservés au cours de l'évolution comme l'atteste l'alignement de séquence des protéines Asf1 et H3, présenté dans l'introduction.

Les résidus impliqués dans le réseau de pont salin au niveau de l'interface sont également conservés au cours de l'évolution, il s'agit des résidus D54, E105 et R108 de *hAsf1* et des résidus R129, R134. Les pont-salins D54/R129 et E105/R134 sont présents dans l'ensemble des 20 structures calculées, ils sont donc probablement formés et contribuent à la stabilisation du complexe.

Enfin, la conformation adoptée par la lysine K122 de l'histone H3 est également intéressante. En effet, la partie hydrophobe de K122 interagit avec le groupement méthyle de A48 et V92 de *hAsf1A* alors que son groupement guanidinium forme un pont salin avec le résidu D88 de *hAsf1A*. Notons que D88 est un résidu très conservé de la protéine Asf1 mais qui, dans la forme libre de Asf1 humaine et de levure, est enfoui (Daganzo et al., 2003; Mousson et al., 2005).

2.10. Modélisation du complexe *hAsf1(1-156)/(H3/H4)*

Dans le modèle du complexe que nous avons obtenu, la structure de *hAsf1A(1-156)* reste pratiquement inchangée par rapport à sa forme non complexée (rmsd sur le squelette peptidique de 1,38 Å) et le fragment de H3 adopte une structure hélicoïdale superposable à l'hélice α_3 observée dans le complexe H3/H4 au sein du nucléosome comme l'illustre la Figure 3-21.

A partir de ces résultats, nous avons construit un modèle d'*hAsf1A* en interaction avec le complexe H3/H4 entier, représenté sur la Figure 3-22. Ce modèle a été obtenu par simple superposition de l'hélice α_3 (122-131) de l'histone H3 en complexe avec *hAsf1A* (1-156) avec le fragment correspondant de l'histone H3 dans le complexe H3/H4 au sein du nucléosome (PDB ID code 1EQZ) (Harp, et al., 2000). De façon remarquable, aucun clash stérique n'est observé entre les atomes du squelette peptidique de *hAsf1A* (1-156) et du dimère d'histone

H3/H4, une simple minimisation d'énergie permet de relâcher les clashes stériques entre les chaînes latérales du complexe.

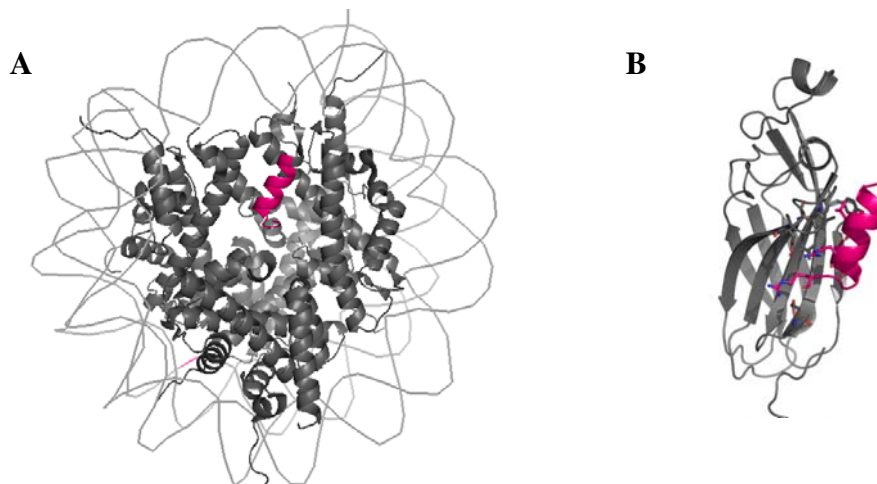


Figure 3-21 : Structure de l'histone H3(122-135) au sein du nucléosome et en interaction avec *hAsf1A* (1-156)

Le fragment H3(122-135) en complexe avec *Asf1* adopte une structure hélicoïdale superposable à l'hélice $\alpha 3$ observé dans le complexe H3/H4 au sein du nucléosome. A) Représentation du nucléosome (PDB ID code 1EQZ) (Harp et al., 2000). Les résidus 122-135 de l'histone H3 sont colorés en magenta, les autres résidus de l'histone H3 ainsi que les histones H3', H4, H4' et l'ADN sont colorés en gris. B) Modèle de la structure du complexe *hAsf1A* (1-156)/ H3(122-135) que nous avons obtenu, *hAsf1A* (1-156) est colorée en gris, le fragment H3(122-135) en magenta

Dans ce modèle de *hAsf1A*(1-156) en complexe avec l'hétérodimère d'histones H3/H4, les résidus 122-135 de l'hélice $\alpha 3$ de l'histone H3 couvrent 85% de la région d'interaction entre les deux partenaires. Les 15% restants mettent principalement en jeu les résidus H113, C110 et D106 situés au niveau de l'hélice $\alpha 2$ de l'histone H3. Ces résidus interagissent avec Y112, L140 et R145 de *hAsf1A*(1-156), qui sont également conservés au cours de l'évolution.

En revanche, l'interface entre *hAsf1A*(1-156) et l'histone H3 est incompatible avec une interaction de *hAsf1A*(1-156) avec l'histone H3 au sein de l'hétérotétramère d'histones (H3/H4). En effet, la surface de l'histone H3 impliquée dans l'interaction avec H3' au sein de l'hétérotétramère H3/H4 correspond à celle impliquée dans l'interaction avec la protéine *hAsf1A*(1-156). Plus particulièrement, les résidus I130 et L126 qui sont impliqués dans l'empilement hydrophobe de l'interface avec *hAsf1A*(1-156) stabilisent aussi le « four-helix bundle » de l'interface entre les deux histones H3 et H3' au sein de l'hétérotétramère H3/H4 (Harp et al., 2000) (Figure 3-22-C). Ainsi, comme l'illustrent les Figure 3-22-B et D, *hAsf1A*(1-

156) se place au niveau du deuxième dimère d'histone (H3/H4) et ne peut interagir avec la forme hétérotétramérique (H3/H4)₂.

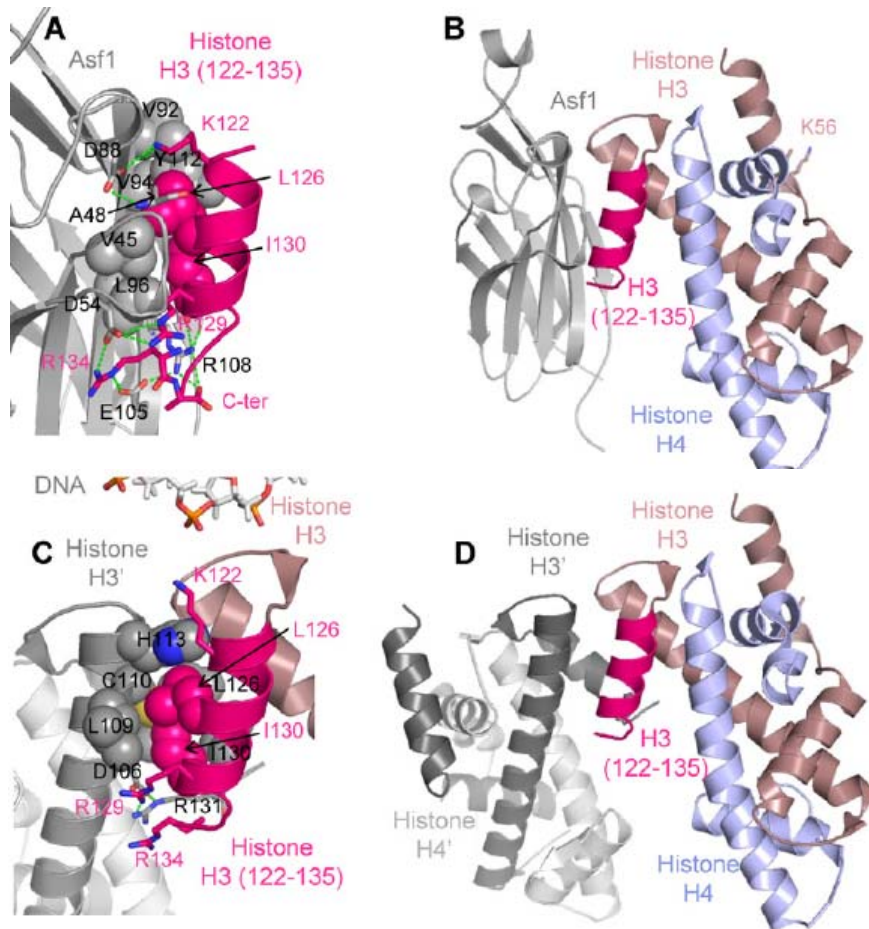


Figure 3-22 : Modèle du complexe *hAsf1*(1-156) / (H3/H4).

Dans toutes les figures, l'orientation du fragment 122-135 de l'histone H3 est identique :

A) Agrandissement de l'interface entre *hAsf1A*(1-156) et le fragment d'histone H3(122-135), les résidus hydrophobes sont représentés par des sphères, en gris les résidus de *hAsf1A*(1-156), en magenta les résidus de H3(122-135). Les résidus dont les chaînes latérales sont représentées par des bâtonnets sont impliqués dans le réseau de ponts salins.

B) Schéma en ruban de *hAsf1A*(1-156) en complexe avec le dimère d'histone (H3/H4). La région (122-135) de l'histone H3 du complexe H3/H4 (Protein Data Bank (PDB) ID : 1EQZ) (Harp et al., 2000) a été superposée aux résidus 122-135 de l'histone H3 en interaction avec *hAsf1A*(1-156). *hAsf1A*(1-156) est en gris, les résidus 122-135 de l'histone H3 sont en magenta, les autres résidus sont en gris-rose, l'histone H4 est en bleu pale. La position de H3-K56 est indiquée.

C) Agrandissement de l'interface entre H3 et H3' au sein de l'hétérotétramère (PDB ID code 1EQZ) (Harp et al., 2000). Les résidus 122-135 de l'histone H3 sont en magenta, les autres résidus sont en gris-rose, l'histone H3' est en gris pale et l'histone H4' en gris foncé. Les chaînes latérales de *hAsf1A*(1-156) et de H3(122-135) sont représentées par des sphères et des bâtonnets comme en A). D) Représentation en ruban de l'hétérotétramère (H3/H4)₂ (PDB ID code 1EQZ) (Harp et al., 2000). En magenta sont représentés les résidus 122-135 de l'histone H3, les autres sont en rose-gris, l'histone H4 es représenté en bleu, les histones H3' et H4' sont en gris foncé et gris pale respectivement.

3. Etude fonctionnelle de l'interaction Asf1/(H3/H4) *in vivo*

Afin de déterminer l'importance de la capacité d'Asf1 à lier les histones pour ses différentes fonctions, C. Mann (CEA-Saclay) a étudié le phénotype de levure portant la mutation V94R d'Asf1. Cette mutation abroge *in vitro* et *in vivo* l'interaction entre Asf1 et l'histone H3. Les résultats obtenus ont montré que l'interaction entre Asf1 et les histones (H3/H4) est nécessaire à pratiquement l'ensemble des fonctions d'Asf1, notamment à la résistance aux dommages de l'ADN et à la régulation de la transcription de certains gènes (Mousson PNAS 2005).

De façon complémentaire à cette étude, la connaissance de la structure du complexe entre hAsf1(1-156) et le peptide d'histone H3(122-135) nous permet de concevoir des mutations ponctuelles de l'histone H3(122-135) de façon à abroger spécifiquement l'interaction Asf1/(H3/H4) et d'en étudier les effets *in vivo*.

3.1. Conception de mutants

Afin d'étudier uniquement la fonction chaperon de Asf1, nous avons cherché à concevoir des mutants de l'histone H3 qui perturbent uniquement l'interaction entre Asf1 et l'histone H3.

Dans cet objectif, nous avons dans un premier temps repéré les résidus du peptide de H3 impliqués dans l'interface du complexe. Il s'agit de la leucine L126, l'isoleucine I130, la lysine K122, et des arginine R129, R131 et R134.

Dans un deuxième temps nous avons regardé lesquels parmi ces résidus sont impliqués dans la stabilisation du nucléosome, de l'hétérotétramère (H3/H4)₂ ou de l'hétérodimère (H3/H4) (Figure 3-22). Ces résidus ne pourront pas être mutés car ils pourraient perturber la structure de la chromatine. Or, les résidus L126 et I130 sont impliqués dans le cœur hydrophobe de l'interface, ils stabilisent le « four-helix bundle » à l'interface entre les deux histones H3 et H3' au sein de l'hétérotétramère (H3/H4)₂. Il en est de même avec le résidu K122 dont le groupement guanidinium semble interagir avec l'ADN au sein du nucléosome (Figure 3-22). Une mutation de l'un de ces résidus pourrait donc affecter la stabilité soit de l'hétérotétramère soit du nucléosome. Ainsi, les seules mutations pouvant abroger de façon

spécifique l'interaction Asf1/(H3/H4) concernent les arginines R129, R131 et R134. Les résidus R129 et R134 forment des pont-salins avec *hAsf1* mais aucun au sein de l'hétérotétramère ni du nucléosome (Harp et al., 2000). La mutation de ces arginines soit en alanine soit en glutamate devrait déstabiliser le réseau de ponts salins de l'interface Asf1/(H3/H4) sans affecter la formation du nucléosome. Les mutants H3-R129A+R131A+R134A (H3-R3A), H3-R129E, H3-R129A, H3-R129A+R134E (H3 RA/RE) ont été co-exprimés avec une protéine fluorescente, la GFP, de façon à observer *in vivo*, leur assemblage ou non en chromatine dans des cellules humaines HeLa pendant la réplication. Cette étude a été réalisée par J.Y. Thuret et R. Courbeyrette. Ces mutants ont également été exprimés chez la levure *S. Cerevisiae* afin d'étudier leur phénotype. Cette étude a été réalisée par C. Mann.

3.2. Validation des mutants

La première étape est de vérifier si ces mutants abrogent effectivement l'interaction Asf1/Histones *in vivo*. La co-immunoprécipitation est une technique qui permet d'obtenir cette information. En effet, la co-immunoprécipitation permet d'extraire des cellules les protéines associées à une protéine cible et de les identifier. La protéine-cible est taguée avec un épitope ou une autre protéine telles que la GFP (ou Myc) pour permettre sa fixation sur des colonnes de co-immunoprécipitation par des anticorps anti-GFP (ou anti-myc par exemple). Les protéines co-immunoprécipitées avec la protéine-cible sont séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane, les protéines incluses dans le complexe sont détectées par western-blot . Cette expérience est schématisée sur la Figure 3-23.

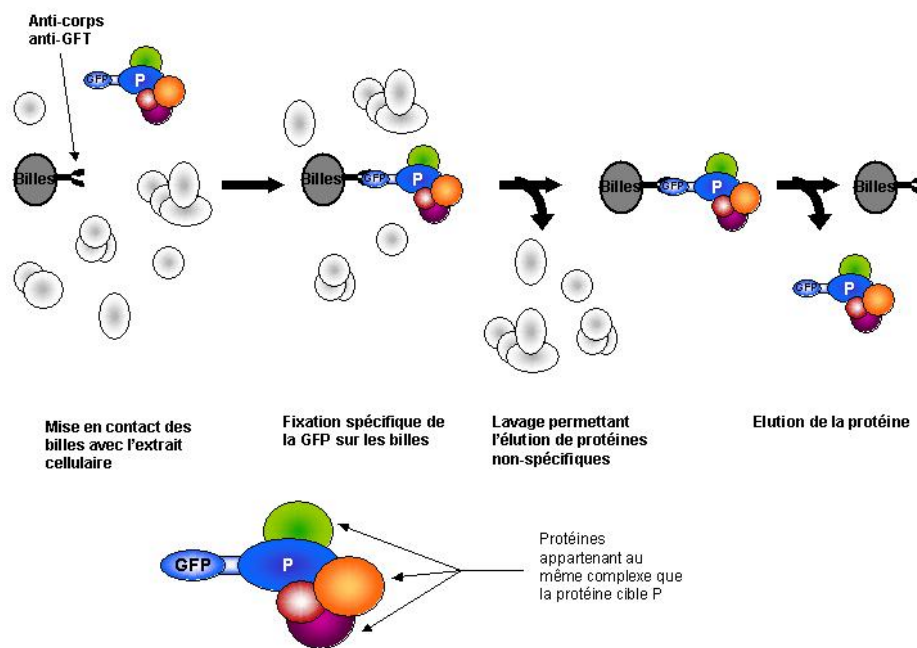


Figure 3-23 : Représentation schématique de la co-immunoprécipitation

La protéine cible P est co-exprimé dans les cellules avec la GFP. L'extrait cellulaire qui contient l'ensemble des complexes protéiques des cellules est mis en contact avec des billes reliées à un anticorps anti-GFP. Cet anticorps retient la GFP-P et les protéines appartenant au même complexe. Des lavages successifs permettent d'éliminer les autres complexes protéiques. Finalement, une élution permet de récupérer l'ensemble des protéines interagissant avec la protéine cible P. Leur identification est ensuite révélée par western-blot.

Rappelons que le variant d'histone H3.1 est déposé sur l'ADN lors de processus réplication-dépendant par des complexes de prédisposition contenant les protéines chaperons Caf-1 et Asf1. Ainsi, pour étudier *in vivo* le rôle de l'interaction Asf1/Histones sur la formation de la chromatine lors de la réplication, ce sont les mutants H3.1-R129A+R131A+R134A (R3A), H3.1-R129E (R129E), H3.1-R129A (R129A), H3.1-R129A+R134E (RA/RE) qui ont été introduits dans des cellules humaines HeLa. Une co-immunoprécipitation a été réalisée pour chacun de ces mutants et les protéines H3, Asf1A et B (homologues humains de Sc. Asf1) et Caf-1-p60 sont détectées par des anticorps spécifiques. Les résultats obtenus, présentés sur la Figure 3-24, montrent que, *in vivo* et dans les cellules humaines HeLa en cours de réplication, la protéine Caf-1p60 (puits 1 à 5) co-immunoprécipite avec les histones H3.1-WT, H3.1-R3A, H3.1-R129A et H3.1-RA/RE. Ce résultat est en accord avec la fonction de chaperon d'histone de la protéine Caf-1 lors de la réplication et avec le fait que les régions d'interactions de Caf-1 et Asf1 sont distinctes (Tagami et al., 2004). Nous pouvons également remarquer que les protéines *hAsf1A* et *hAsf1B* sont présentes dans le complexe de pré-déposition des histones H3.1-WT mais aussi, à plus faible concentration, dans les complexes

de pré-déposition H3.1-R129A et H3.1-RA/RE (puits 1, 4 et 5). Par contre, le complexe de pré-déposition des histones H3.1-R3A et H3.1-R129E ne contient ni *hAsf1A* ni *hAsf1B*. Ainsi, il apparaît que les mutants H3.1-R129A et H3.1-RA/RE affaiblissent l'interaction avec Asf1 contrairement aux mutants H3.1-R3A et H3.1-R129E qui semblent abolir totalement cette interaction dans des cellules humaines HeLa.

Le mutant H3-R129E a également été introduit chez la levure *S. Cerevisiae* et son interaction pour Asf1 vérifiée par co-immunoprécipitation. Ici encore, comme l'illustre la Figure 3-25, le mutant H3-R129E est totalement absent de l'immunoprécipitat *ScAsf1-myc*. De même que chez les cellules humaines le mutant H3-R129E semble abolir totalement l'interaction Asf1/(H3/H4) chez la levure

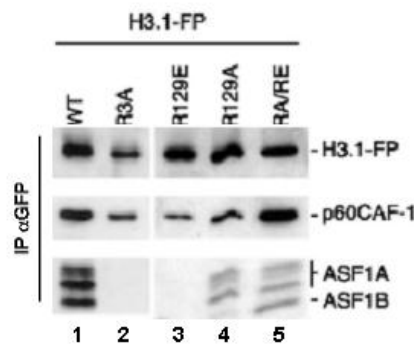


Figure 3-24 : Capacité de mutant de H3.1 à lier *hAsf1* dans des cellules HeLa humaine

Expérience de co-immunoprécipitation des protéines Caf-1p60 et *hAsf1A*, *hAsf1B* en complexe avec l'histone H3.1 dans des cellules humaines HeLa exprimant l'histone H3.1 sauvage (WT, puits 1) et mutées H3-R129A+R131A+R134A (R3A, puits 2), H3-R129E (R129E, puits 3), H3-R129A (R129A, puits 4), H3-R129A+ R134E (RA/RE, puits 5) exprimées dans des cellules HeLa humaines.

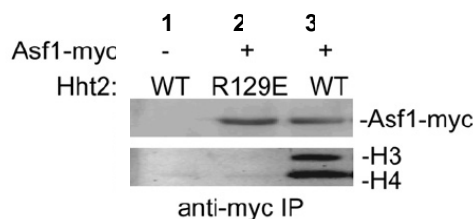


Figure 3-25 : capacité du mutant H3-R129E à lier Asf1 chez la levure.

Expérience de co-immunoprécipitation d'Asf1 en complexe avec les histones dans des souches de levures exprimant soit H3 sauvage (puits 3), soit le mutant H3-R129E (puits 2). Asf1-myc a été détecté par un anticorps anti-myc, H3 et H4 par des anticorps anti-H3 et anti-H4 respectivement. Une souche qui n'exprime pas Asf1-myc a été utilisée comme contrôle de la co-immunoprécipitation anti-myc (WT, puits 1).

3.3. Rôle biologique de l'interaction Asf1/(H3/H4)...

3.3.1. ... Lors de la réplication

Au cours de la réplication, les histones H3.1 nouvellement synthétisées sont déposées sur l'ADN au niveau des fourches de réplication. Nous avons donc cherché à visualiser la présence des histones H3.1 sauvage et du mutant H3.1R3A au niveau de ces fourches. Cette étude a été réalisée par J.Y. Thuret et R. Courbeyrette (CEA Saclay). Ils ont observés par microscopie de fluorescence la localisation nucléaire de protéines H3 sauvage et mutées couplée à la GFP. Lors de ces expériences, Caf-1p150 a servi de marqueur de positionnement des foyers de réplication. En effet, lors de la réplication, la sous-unité p150 du chaperon d'histones Caf-1 colocalise avec les foyers de réplication via son interaction avec PCNA (Krude, 1995). La Figure 3-26 montre la localisation des histones en vert et de Caf-1p150 en rouge dans un noyau de cellule humaine en cours de réplication. Nous pouvons observer que l'histone H3.1 sauvage (H3 WT) colocalise parfaitement avec les foyers de réplication alors que le mutant H3.1-R3A est uniformément réparti dans le noyau et ne colocalise pas avec les foyers de réplication.

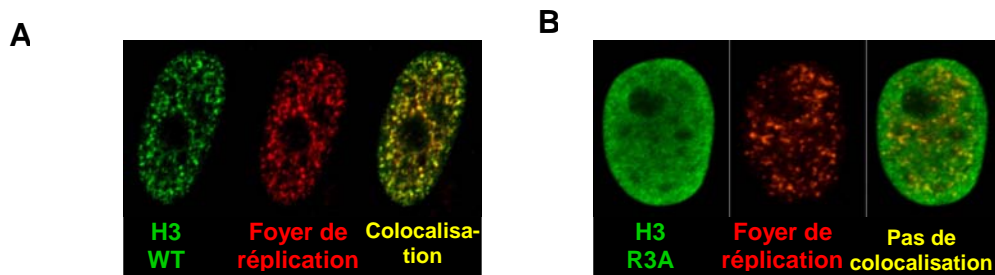


Figure 3-26 : Assemblage de l'histone H3 au niveau des fourches de réplication.

Localisation dans les noyaux de cellules humaines HeLa en cours de réplication des histones H3 A) sauvages (WT) B) mutées R129A R131A R134A (R3A) par microscopie de fluorescence. Les histones H3 révélées par la fluorescence de la GFP en vert et les foyers de réplication sont révélés par fluorescence dans en le rouge, la superposition de deux signaux qui colocalisent donne un signal jaune.

Ces résultats montrent une très bonne corrélation entre la perte d'interaction entre Asf1 et les histones H3/H4 et l'absence d'assemblage des histones H3.1 nouvellement synthétisées sur l'ADN. Ainsi, l'interaction Asf1/Histones permet l'assemblage de la chromatine lors de la réplication.

3.3.2. ... Lors de la réparation des dommages de l'ADN

Chez *S. cerevisiae*, les cellules pour lesquelles le gène d'Asf1 a été supprimé (*Asf1Δ*) sont viables mais très sensibles aux agents produisant des dommages de l'ADN tels que des cassures double brins (Emili et al., 2001). Afin d'étudier le rôle de l'interaction Asf1/(H3/H4) dans la réponse aux dommages de l'ADN, C. Mann et J. Chen ont analysé une étude phénotypique de levures présentant des mutations de l'histone H3 qui affecte sa liaison avec Asf1. Ils ont analysé le taux de survie de cellules soumises à différents stress génotoxiques. Les tests de résistance aux stress génotoxiques incluent trois types d'agents induisant des dommages de l'ADN : i) la camptothécine (CPT), inhibiteur de la topoisomérase I, ii) l'hydroxyurée (HU), inhibiteur de la ribonucléase qui induit un stress lors de la réplication en réduisant le pool de dNTP et iii) le méthyl-méthane-sulfonate (MMS), agent alkylant de l'ADN qui induit le mésappariement des bases et bloque la réplication.

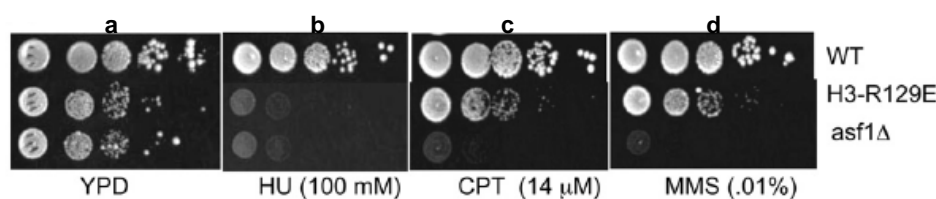


Figure 3-27 : Sensibilité des cellules *Asf1Δ* et *H3R129E* face aux agents génotoxiques.

Les souches *Asf1Δ* et *H3R129E* sont transfectées avec un plasmide pDM9 qui porte ou non le gène d'Asf1 sous contrôle de son promoteur endogène. Les cellules sont cultivées dans un milieu synthétique CAW dépourvu en tryptophane afin de maintenir la sélection du plasmide jusqu'à une phase stationnaire. Des dilutions au dixième, centième, millième et millionième des cultures sont déposées sur un milieu de culture solide composé d'extraits de levure, de peptone et de dextrose (YPD) (a) et contenant (b) 100mM d'hydroxyurée (HU) (c) 14μM de camptothécine (CPT) et (d) 0.01% de méthyl-méthane-sulfonate (MMS). Les cellules sont alors incubées à 30°C pour tester leur sensibilité aux stress génotoxiques.

Les panneaux b, c et d de la Figure 3-27 illustrent le défaut de croissance des cellules *Asf1Δ* traitées à l'hydroxyurée, à la camptothécine ou au méthyl-méthane-sulfonate respectivement. Tout comme les cellules *Asf1Δ*, les cellules exprimant l'histone mutée H3-R129A présentent des défauts de croissance suite à un traitement à l'hydroxyurée. Cependant, de façon surprenante, les cellules H3-R129A sont partiellement résistantes à la camptothécine et au méthyl-méthane-sulfonate et restent viables.

3.3.3. ... Dans l'acétylation de la lysine H3-K56

Des études publiées en 2005 et 2006 ont montré que la protéine Asf1 est nécessaire à l'acétylation de la lysine K56 de l'histone H3 (H3K56Ac) et que cette acétylation est nécessaire à la résistance aux stress génotoxiques des levures (Recht et al., 2006). De plus, des mutants de l'histone H3 qui affectent la région d'interaction avec Asf1 ont un taux d'acétylation plus faible que les histones sauvage. Nous avons donc décidé de vérifier s'il existe effectivement une corrélation entre la force de l'interaction Asf1/H3 et l'acétylation du résidu H3-K56. Nous avons également voulu savoir si c'est ce défaut d'acétylation qui est responsable de la sensibilité des cellules à certains stress génotoxiques lorsque l'interaction Asf1/(H3/H4).

Dans cet objectif, nous avons dans un premier temps mesuré le taux d'acétylation H3-K56 dans des cellules de levure exprimant des mutants de Asf1 pour lesquels la capacité d'interaction avec les histones H3/H4 est connue (Mousson et al., 2005). Sur la Figure 3-28, nous pouvons noter que les cellules exprimant le mutant Asf1-V94R, incapable de lier les histones H3/H4, perdent l'acétylation sur H3-K56 de même qu'une délétion totale du gène d'Asf1 (Asf1 Δ). Au contraire, les cellules exprimant les mutants Asf1-D54R et Asf1-R108E qui déstabilisent faiblement l'interaction Asf1/(H3/H4) présentent une baisse d'acétylation. Enfin, le double mutant Asf1-D54R+R108E a un phénotype intermédiaire entre le mutant Asf1-V94R et les simples mutants Asf1-D54R et Asf1-R108E. En accord avec leur affinité pour Asf1, le taux d'acétylation de H3-K56 est compris entre celui du mutant Asf1-V94R et des mutants Asf1-D54R et Asf1-R108E.

Ainsi, de façon remarquable, le taux d'acétylation de la lysine H3-K56 corrèle parfaitement avec l'intensité de l'interaction Asf1/(H3/H4). Au vu de ces résultats, nous pouvons proposer que la mesure du taux d'acétylation de H3-K56 soit un bon outil de mesure *in vivo* de l'affinité entre Asf1 et le complexe H3/H4.

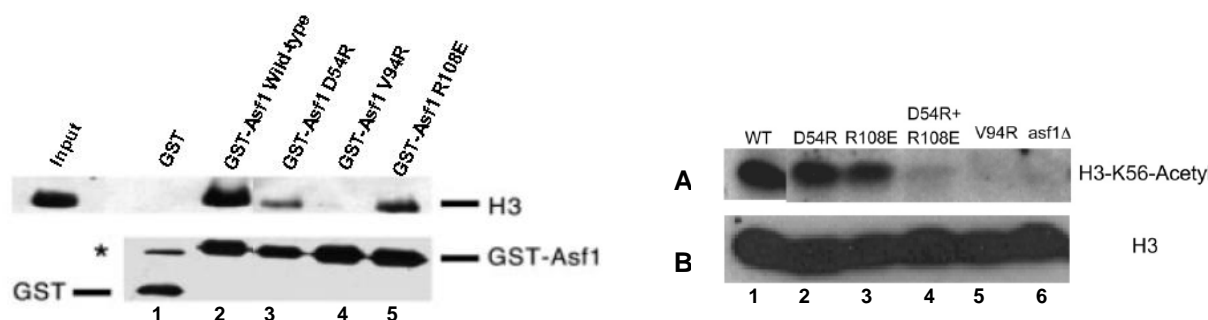


Figure 3-28 : corrélation entre l'interaction Asf1-histones et l'acétylation de la lysine H3-K56

A gauche, capacité d'interactions de mutants d'Asf1 à interagir avec les histones (H3/H4) entières. Les expériences d'interaction réalisées par A. Lautrette au laboratoire sont des expériences de GST-pulldown dont les échantillons sont révélés par western-blot. L'input correspond au dépôt des histones initiales. Les puits 1 à 5 correspondent aux échantillons des expériences d'interaction entre la GST, la GST-Asf1 sauvage, la GST-Asf1-D54R, la GST-Asf1-V94R et la GST-Asf1-R108E respectivement. L'histone H3 est révélée par un anticorps reconnaissant la partie C-terminale de l'histone H3 (panneau du haut). Les protéines de fusion (His)₆-GST sont révélées avec un anticorps anti-(His)₆.

A droite, quantification par western-blot de l'acétylation K56 des histones H3 (H3-K56-Acétyl) extraites de cellules de levures préparé à partir de souche sauvages (WT, puits1), mutées Asf1 D54R, Asf1R108E, Asf1 D54R+Asf1R108E, Asf1 V94R, Asf1Δ (puits 2 à 6). A) Quantité d'histones H3-K56-Acétyl contenue dans ces échantillons révélée avec un anticorps anti-H3-K56-acétyl B) Quantité totale d'histone H3 contenus dans les mêmes échantillons révélée avec un anticorps anti-H3-C-terminal (100-135).

Nous avons donc utilisé cette mesure pour savoir si la résistance du mutant H3-R129E au méthyl-méthane-sulfonate et à l'hydroxyurée, observé précédemment (Figure 3-27), pouvait s'expliquer par une interaction résiduelle des histones avec Asf1. Le résultat présenté sur la Figure 3-29 montre effectivement que le mutant H3-R129E a une plus faible acétylation du résidu H3K56 que l'histone H3 sauvage mais qui n'est pas totalement abolie comme dans le cas d'Asf1Δ. Ainsi la mutation R129E réduit l'affinité du mutant pour Asf1 mais n'est pas suffisante pour l'abolir. La mesure du taux d'acétylation de H3-K56 pour détecter la fonctionnalité partielle de certains mutants est donc nettement plus sensible que la co-immunoprécipitation.

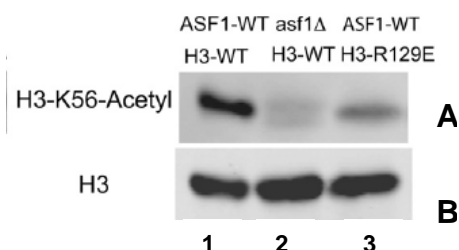


Figure 3-29

Quantification par western-blot de l'acétylation K56 des histones H3 (H3-K56-Acétyle) extraites de cellules de levures préparé à partir de souche sauvages (Asf1-WT H3-WT, puits 1), Asf1Δ – H3 WT (puits 2), Asf1 WT-H3R129E (puits 3). A) Quantité d'histones H3-K56-Acétyle contenue dans ces échantillons révélée avec un anticorps anti-H3-K56-acétyle B) Quantité totale d'histone H3 contenus dans les mêmes échantillons révélée avec un anticorps anti-H3-C-terminal (100-135).

3.3.4. Interaction Asf1/(H3/H4), acétylation de la lysine H3K56 et résistance aux dommages de l'ADN

Deux mutants permettent d'étudier l'implication de l'acétylation H3-K56 dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN : le mutant H3-K56Q, qui mime l'acétylation sur la lysine K56 et le mutant H3-K56R qui lui n'est pas acétylable. Des souches de levure pour lesquelles le gène d'Asf1 (Asf1Δ) est supprimé et exprimant le gène de H3-K56Q présentent un faible défaut de croissance mais de façon remarquable, leur sensibilité à l'hydroxyurée est nettement meilleure que les cellules Asf1Δ (Schneider et al., 2006). Ces mêmes souches de levures Asf1Δ exprimant le gène de H3-K56R sont sensibles à l'hydroxyurée, à la camptothécine et au méthyl-méthane-sulfonate (Recht et al., 2006).

Nous avons donc cherché à savoir si cette propriété remarquable du mutant H3-K56Q peut se généraliser pour d'autres stress génotoxiques tels que la camptothécine ou le méthyl-méthane-sulfonate. Nous avons alors réalisé une étude phénotypique sur des levures délétées du gène d'Asf1 (Asf1Δ) et exprimant le gène de H3-K56Q ou de H3-K56R sous contrôle d'un promoteur HHT2 endogène (Figure 3-30). Nous observons que l'expression du mutant H3-K56Q dans des levures Asf1Δ supprime la sensibilité à la camptothécine et au méthyl-méthane-sulfonate mais conserve sa sensibilité à l'hydroxyurée. En revanche, aucun effet n'est observé dans le cas de cellules Asf1Δ exprimant l'histone H3 sauvage ou le mutant H3-K56R qui mime une forme non-acétylable de l'histone H3.

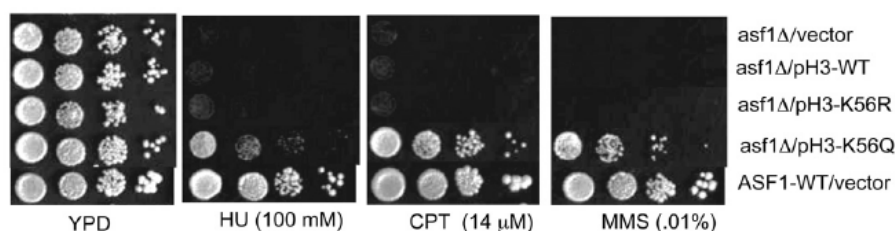


Figure 3-30 : Sensibilité des cellules *Asf1*Δ exprimant les mutants K56R ou K56Q de l'histone H3.

Les souches *Asf1*Δ sont transfectées avec un plasmide pRS414 centromérique vide (vector, ligne 1), ou avec ce même plasmide portant les gènes de H3/H4 sauvage (pH3-WT, ligne 2), de H3-K56R (pH3-K56R, ligne3), de H3-K56Q (pH3-K56Q, ligne4) sous contrôle du promoteur HHT2. Les conditions expérimentales sont identiques à celles indiquées Figure 3-27.

Ces résultats suggèrent que le mime d'un groupement acétyle apporté par la mutation K56Q est suffisant pour permettre aux cellules de résister à la camptothécine et au méthyl-méthane-sulfonate mais pas à l'hydroxyurée. Peut-être qu'un taux d'acétylation plus élevé est nécessaire pour conserver la résistance à l'hydroxyurée ou qu'un autre partenaire est nécessaire.

En résumé, nous avons montré que la fonction chaperon d'*Asf1* est nécessaire pour l'assemblage des histones (H3/H4) sur l'ADN au niveau des foyers de réplication de cellules humaine HeLa. Nous avons également mis en évidence l'existence d'une forte corrélation entre la force de l'interaction entre *Asf1* et les histones (H3/H4) et l'acétylation de la lysine H3-K56. Enfin, nous avons montré que cette corrélation est responsable de la sensibilité à certains agents génotoxiques des cellules pour lesquelles *Asf1*/(H3/H4) a été abolie.

4. Discussion

Au début de cette étude aucune information structurale à haute résolution sur le mode d'interaction entre un chaperon d'histone et les histones n'était disponible, probablement parce que ces interactions sont transitoires et dynamiques et donc difficiles à caractériser. Nous avons cherché à caractériser l'interaction entre *hAsf1* et les histones entières. Dans cet objectif, nous avons obtenu un modèle du complexe *hAsf1*/(H3/H4) à partir de la structure de *hAsf1*(1-156)/ H3(122-135) que nous avons résolu par RMN.

Cette discussion s'attache donc dans un premier temps à rapporter les caractéristiques structurales importantes de ce complexe. Par la suite, nous verrons en quoi ces données sont extrêmement intéressantes sur plusieurs aspects. Notamment nous verrons en quoi la connaissance de l'interface entre *Asf1*(1-156) et le peptide H3(122-135) un est un point de

départ pour caractériser de façon plus globale les régions d'interaction des chaperons d'histones avec leur cible. Puis nous proposerons à partir des données stœchiométriques du complexe Asf1/(H3/H4) de nouveaux mécanismes d'assemblage et de désassemblage des histones de l'ADN. Enfin, lors de notre étude, nous avons également abordé la question du rôle fonctionnelle de cette interaction. Suite aux résultats obtenus, nous verrons en quoi la corrélation entre l'acétylation de la lysine H3K56 et la force de l'interaction entre Asf1 et les histones (H3/H4) est une piste prometteuse pour comprendre le rôle de la protéine Asf1 dans la signalisation des dommages de l'ADN.

4.1. Aspects structuraux

Nous disposons désormais d'une information structurale à l'échelle atomique de l'interface entre Asf1 et les histones (H3/H4). Cette structure révèle que le fragment H3 (122-135) adopte une structure hélicoïdale lorsqu'il se lie à hAsf1 et que l'interface se compose i) d'un enchevêtrement de résidus hydrophobes entouré de résidus chargés, ii) d'un réseau de pont-salins au niveau de la queue C-Terminale de l'histone H3. Nos résultats montrent que l'interface entre hAsf1 et le fragment d'histone H3 (122-135), majoritairement composée de résidus hydrophobes, est spécifique et fait intervenir un agencement particulier de chaînes latérales apolaires et chargées et non des interactions électrostatiques non-spécifiques. Nous pouvons désormais comprendre d'un point de vue structural les résultats de biochimie montrant que les mutants hAsf1D54R et hAsf1R108E affectent moins l'interaction entre hAsf1 et le complexe H3/H4 que le mutant hAsf1V94R (Mousson et al., 2005). En effet, la valine V94, très proche des résidus I130 et L126 de l'histone H3, est au cœur même de l'interface hydrophobe. Sa mutation en arginine introduit à la fois une gêne stérique et électrostatique au centre de cette interface et déstabilise très fortement l'interaction Asf1/(H3/H4). Les résidus D54 et R108 sont quant-à eux impliqués dans le réseau de pont-salins, leur mutation en résidu de charge opposée perturbe la formation de tels pont-salins mais n'empêcherait pas les chaînes latérales d'adopter une autre conformation. Ces mutations occasionnent donc de faibles perturbations de l'interaction avec les histones (H3/H4).

La stœchiométrie du complexe entre Asf1 et les histones H3/H4 est un aspect important pour la compréhension des mécanismes moléculaires associés à la régulation des histones *in vivo*. Notre modèle indique clairement qu'Asf1 interagit avec la forme hétérodimérique des histones (H3/H4). Pourtant, dans des conditions physiologiques, les histones sont plus

stables sous leur forme hétérotétramérique (H3/H4)₂ et dans les cellules mammifères, le tétramère nucléosomal (H3/H4)₂ est rarement dissocié en hétérodimère (H3/H4) (Annunziato, 2005). Ce n'est que récemment que des études ont pu déceler la présence de dimères d'histones dans des complexes de pré-déposition d'histones H3/H4 purifiés à partir de cellules HeLa humaines (Tagami et al., 2004). Un an plus tard, l'équipe de J. Tyler montrait que la co-expression du domaine N-terminal de la protéine Asf1 de levure avec les histones H3/H4 aboutit à la formation d'un complexe hétérotrimérique 1/1/1 d'Asf1 avec l'hétérodimère (H3/H4) (English, et al., 2005). Notre modèle apporte des données structurales à ces dernières observations. En effet, nos résultats montrent que Asf1 et le deuxième hétérodimère (H3/H4)' interagissent avec l'hétérodimère (H3/H4) via le même site d'interaction. Ainsi, nous pouvons supposer que dans une solution où les formes hétérotétramérique et hétérodimérique des histones (H3/H4) sont en équilibre dynamique, Asf1 aie une affinité suffisante pour déplacer cet équilibre vers la formation du complexe Asf1/(H3/H4). Une étude récente de T. Senda (Natsume, et al., 2007) montrant que Asf1 est capable de dissocier l'hétérotétramère d'histone (H3/H4)₂ conforte notre modèle.

Conjointement à la résolution de la structure du complexe *h*Asf1(1-156)/H3(122-135) par RMN (Agez, et al., 2007), les équipes de J. Tyler et T. Senda ont déterminé la structure de Asf1 en complexe avec l'hétérodimère (H3/H4) par cristallographie (English et al., 2005; Natsume et al., 2007).

Les deux structures sont très proches, ce qui valide notre démarche consistant à obtenir un modèle du complexe entre Asf1 et les histones H3/H4 entières à partir de la structure RMN de *h*Asf1(1-156)/H3(122-135). En effet, comme l'illustre la Figure 3-31, les deux structures présentent une interaction entre Asf1 et l'hétérodimère d'histone (H3/H4) et l'orientation globale des deux partenaires l'un par rapport à l'autre est similaire quelque soit la méthode utilisée (le rmsd calculé sur les atomes du squelette peptidique incluant les résidus Asf1 (1-156), H3(60-134) et H4(31-93) est de 3.84 Å). L'interaction de Asf1 avec l'hélice α_2 de l'histone H3 prédit par notre modélisation est également présente dans les structures cristallographiques.

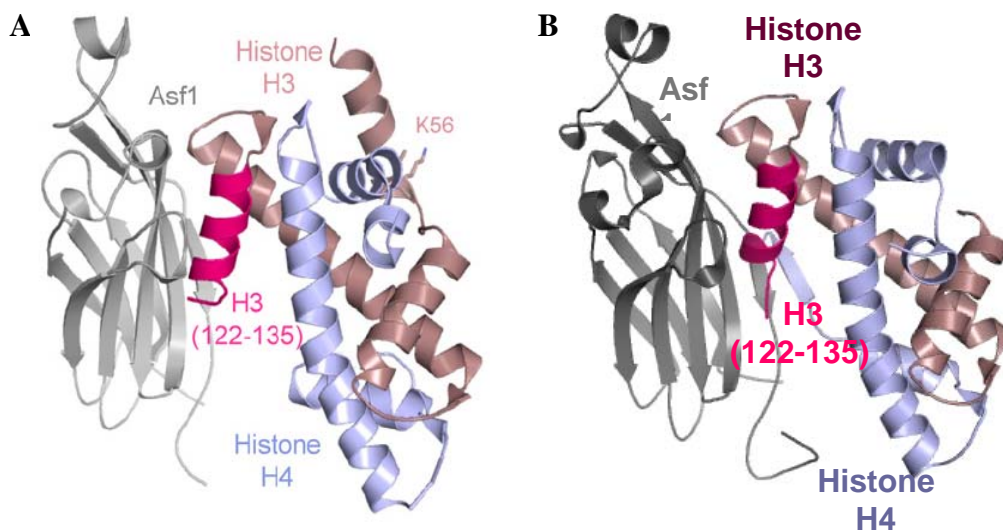


Figure 3-31 : Structure du complexe Asf1(1-156)/(H3/H4)

Structure obtenue par A) RMN (Agez et al 2007), B) Cristallographie (English et al., 2005). Asf1 (1-156) est représenté en gris, l'histone H4 en bleu clair, le peptide H3 (122-135) en magenta, les autres résidus de l'histone H3 son en gris-rose.

Par contre les structures cristallographiques révèlent la présence d'un autre site d'interaction. Le brin β C-terminal de l'histone H4 interagit avec le brin β_9 de Asf1 complétant ainsi l'un de ces feuillets β . En comparant la conformation de l'histone H4 en interaction avec Asf1 et sa conformation au sein de l'hétérotétramère (H3/H4)₂, visibles sur la Figure 3-32, il apparaît que l'interaction entre l'histone H4 et Asf1 nécessite un changement conformationnel important que nous ne pouvons pas prédire avec notre approche.

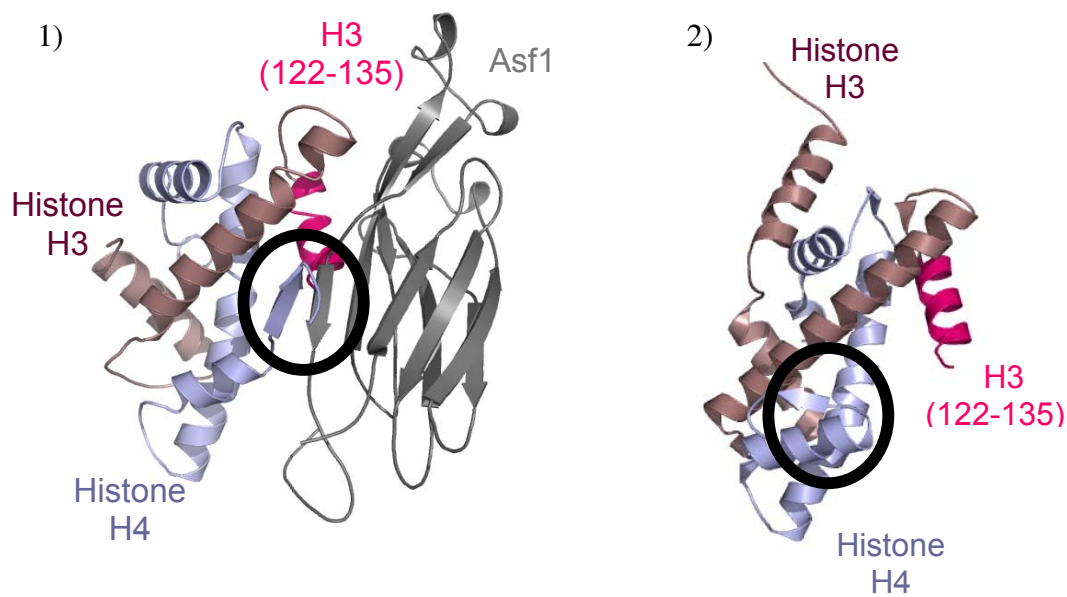


Figure 3-32 : Conformation du brin β C-terminal de l'histone H4

1) Au sein du complexe *hAsf1*/(H3/H4), le brin β C-terminal de l'histone H4 vient compléter le feuillet β de *hAsf1*, 2) au sein du nucléosome, il interagit avec l'hélice α3 de l'histone H4. Dans les deux structures, l'orientation du dimère (H3/H4) est identique. Les cercles noirs indiquent la localisation du brin β C-terminal de l'histone H4.

En effet, au sein du nucléosome, le brin β C-terminal l'histone H4 est normalement parallèle à l'histone H2A (Luger et al., 1997). Cette conformation permet de stabiliser l'interaction entre l'hétérotétramère d'histones (H3/H4)₂ et les hétérodimères d'histones H2A/H2B dans le nucléosome. Or, pour adopter sa conformation dans le complexe avec Asf1 le brin β C-terminal doit effectuer une rotation de 180°. Aucune donnée expérimentale ne nous permettait de prédire un tel changement de conformation.

L'équipe de J.Tyler a montré que la délétion de la partie C-terminale de l'histone H4 perturbe fortement l'interaction entre l'hétérodimère (H3/H4) et Asf1 (English et al., 2005). Cette région d'interaction supplémentaire contribue donc significativement à la forte affinité d'Asf1 avec les histones H3/H4. Le gain d'affinité, par rapport à une région d'interaction ne comprenant que l'hélice α3 de l'histone H3, est en accord avec la capacité d'Asf1 à dissocier le tétramère d'histone (H3/H4)₂.

4.2. Implication sur la caractérisation de la région d'interaction des chaperons d'histones avec leur cible

In vitro, lorsque l'ADN, chargé négativement, et les histones, chargées positivement, sont mélangés dans un tampon à faible concentration saline, il se forme un précipité insoluble, c'est à dire, des interactions ADN-histones non spécifiques. Pourtant, la présence de peptides polyacides ou un gradient de concentration en sel permet d'obtenir des nucléosomes, c'est à dire la formation d'un complexe protéine-ADN structuré (Akey and Luger, 2003). Etant donné qu'un grand nombre de protéines chaperons d'histones sont des protéines acides et que plusieurs d'entre elles possèdent de grandes régions composées quasi exclusivement de résidus acides comme c'est le cas pour ScAsf1, il était communément admis que l'action des chaperons d'histones consistait à neutraliser les charges positives des histones pour empêcher leur association non spécifique avec l'ADN. Cependant, les domaines acides retrouvés dans les chaperons d'histones comme Nap-I, la nucléoplasmine et ScAsf1 ne sont pas essentiels pour leur fonction de chaperons d'histones (Akey and Luger, 2003; Daganzo et al., 2003; McBryant et al., 2003; Umehara et al., 2002)].

Lorsque la région d'interaction d'Asf1 avec les histones a été découverte, il était donc surprenant de noter que celle-ci est majoritairement constituée non pas de résidus acides mais hydrophobes. Depuis, de nombreuses études biochimiques ainsi que la résolution de la structure du complexe entre Asf1 et les histones (H3/H4) ont confirmé que cette région d'Asf1 est bien spécifique à l'interaction avec l'histone H3 et que celle-ci fait intervenir des résidus très conservés au cours de l'évolution. Il est très intéressant de noter que de telles caractéristiques ont également été observées sur Nap-1 (Muto et al., 2007). La présence d'un patch hydrophobe comprenant de résidus conservés au cours de l'évolution pourrait donc être un critère dans la recherche de la région d'interaction d'un chaperon d'histone avec sa cible.

Parmi les résidus de Asf1 en interaction avec l'histone H3, deux résidus acides conservés R108 et D54 stabilisent l'interaction. Nous proposons que ces résidus soient importants pour orienter correctement l'hélice de l'histone H3 par rapport à Asf1. Il s'agit d'une idée intéressante mais il n'est pas possible à ce jour de savoir si cette propriété pourrait se généraliser à d'autres complexes chaperons d'histones/histones car aucune autre structure de complexe n'est connue.

Nous avons vu dans la section précédente que lorsque les histones (H3/H4) interagissent avec Asf1, le brin β C-terminal de l'histone H4 vient se coller au brin β 9 de Asf1 qui se trouve exposé au solvant de façon à compléter le feuillet β de Asf1. Or, de façon remarquable, tout comme Asf1, les protéines chaperons d'histones dont la structure est connue présentent des structures en feuillet β dont certains brins sont exposés au solvant. C'est le cas de Nap1 et la nucléoplasmine (Park and Luger, 2006). Il est intéressant de noter que le feuillet β exposé de Np présente également des résidus acides. Cette particularité en fait un site favorable à l'ajout d'un brin β provenant soit de l'histone H4 soit de l'histone H2A (Namboodiri, et al., 2003), ces deux histones ayant en effet la capacité de former un brin β au niveau de leur C-terminal (Luger et al., 1997). De plus, au voisinage du monomère Np se trouve une poche hydrophobe. Cette poche hydrophobe qui contient de nombreux résidus conservés (F30, L47, L45, I94, W19 et F102) ressemble à celle d'Asf1 dans laquelle se positionne l'extrémité C-terminale de l'histone H4. Les structure précises des sous-unités RbpA48 et p60 de CAF-1 (Kaufman, et al., 1995) et du chaperon d'histone HIRA (DeSilva, et al., 1998) ne sont pas connues mais l'analyse de leur séquence montre qu'ils sont majoritairement composés de feuillets β . Il serait intéressant de savoir quels brins β sont exposés au solvant et constituent potentiellement une région d'interaction avec les histones.

L'ensemble de ces caractéristiques structurales communes aux chaperons d'histones suggère que leurs modes d'interaction avec les histones sont très proches. L'interaction entre les chaperons d'histones se caractériserait par deux régions d'interaction :

- l'une, interagissant avec une hélice des histones, composées de résidus hydrophobes conservés permettant l'ancrage de l'hélice et de résidus acides conservés permettant d'orienter celle-ci,
- l'autre, interagissant avec le brin β de l'histone H4 ou de l'histone, H2A composé d'un patch de résidus hydrophobes situé au niveau d'un brin β du chaperon d'histone exposé au solvant.

4.3. Implication sur les mécanismes d'assemblage et de désassemblage de la chromatine

Le deuxième site d'interaction entre Asf1 et l'histone H4 implique un changement de conformation conséquent du brin β C-terminal de l'histone H4 par rapport sa conformation au sein du nucléosome ou de l'octamère d'histone. Cette découverte laisse à penser que Asf1 pourrait dissocier l'hétérotétramère d'histone en utilisant la queue C-terminale de l'histone H4 comme accroche. Cette capture pourrait être la première étape du désassemblage des histones par Asf1. Cette question sera l'objet du chapitre suivant.

La structure du complexe Asf1/(H3/H4) montre également qu'Asf1 interagit avec l'hétérodimère (H3/H4) bloquant la formation de l'hétérotétramère (H3/H4)₂. Cette découverte nous amène à nous interroger sur le mécanisme d'assemblage de l'hétérotétramère (H3/H4)₂ au sein du nucléosome. Trois mécanismes, illustrés sur la Figure 3-33, peuvent être envisagés : soit l'hétérotétramère (H3/H4)₂ est formé avant d'être déposé sur l'ADN, ou les hétérodimères (H3/H4) sont déposés successivement ou bien simultanément sur l'ADN.

Dans chacune des hypothèses, Asf1 pourrait être assisté d'un autre chaperon d'histone. En effet, l'équipe de G. Almouzni a montré que les complexes de prédisposition des histones incluaient Asf1 mais également les chaperons d'histones CAF-1 ou HIRA selon que l'assemblage du nucléosome soit ou non dépendant de la réplication (Tagami et al., 2004). Cette hypothèse est confortée par la résolution de la structure du complexe Asf1/HIRA(425-472) qui montre que la région d'interaction entre Asf1 et HIRA est commune avec CAF-1 et que ces deux interactions exclusives sont compatibles avec une interaction simultanée avec l'hétérodimère (H3/H4)₂ (Tang et al., 2006).

Chacun des mécanismes proposés nécessite de perturber l'interaction Asf1/H3 pour permettre la dimérisation H3:H3'. Il est possible que cette perturbation provienne de la présence d'ADN uniquement ou soit provoquée par d'autres chaperons d'histones tels CAF-1 ou HIRA.

Aucune donnée actuelle ne permet de conclure sur le mécanisme précis de l'assemblage de la chromatine. Nous avons donc entrepris d'étudier *in vitro* le mode d'assemblage des histones H3/H4 sur l'ADN par Asf1, cette étude fait l'objet du Chapitre 4 :

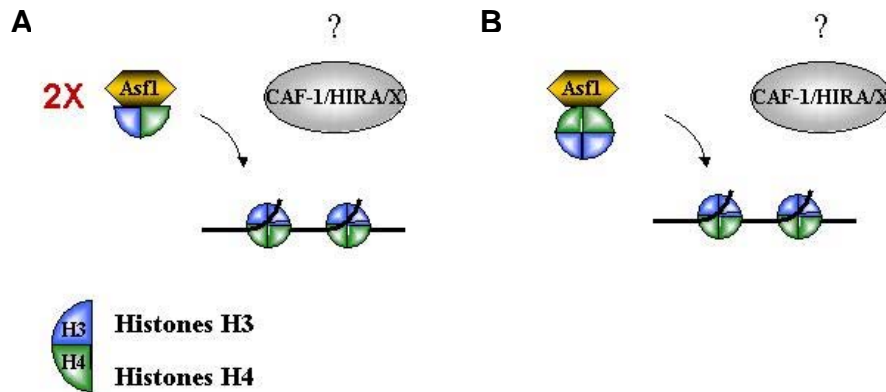


Figure 3-33 : Modèles d'assemblage des histones H3/H4 sur l'ADN par Asf1

A) Les dimères d'histones sont déposés soit l'un après l'autre soit simultanément sur l'ADN, B) Le tétramère est formé avant d'être déposé sur l'ADN. Dans les deux mécanismes, le mode d'action des autres chaperons d'histone n'est pas connu.

Une conséquence importante de cette découverte concerne le mécanisme de transmission de l'information épigénétique portée par les histones lors de la réplication. Auparavant, l'hétérotétramère d'histone (H3/H4)₂ était considéré comme une entité non divisible (Moss, et al., 1976) et seul un modèle de type conservatif, illustré sur la Figure 3-34-A, pouvait être envisagé. Dans ce modèle, les histones parentales et nouvellement synthétisées sont déposées sous leur forme hétérotétramérique par deux voies distinctes (Jackson, 1988). Les nucléosomes des brins d'ADN filles sont alors composés soit uniquement d'histones parentales soit uniquement d'histones nouvellement synthétisées. Dans ce modèle, la transmission de l'information épigénétique pourrait se faire d'un nucléosome à l'autre.

Nos résultats montrent que les deux hétérodimères dimères d'histones (H3/H4) pourraient être assemblés indépendamment sur l'ADN. Un même nucléosome peut donc contenir un hétérodimère d'histones (H3/H4) parentale et un hétérodimère d'histones (H3/H4) nouvellement synthétisées, il s'agit d'un modèle semi-conservatif. Dans ce cas, chaque nucléosome nouvellement formé serait porteur de l'information épigénétique comme l'illustre la Figure 3-34-B. Pourtant, jusqu'à ce jour, seuls des nucléosomes homogènes dans leur composition en histone H3 après réplication ont été détectés (Tagami et al., 2004). Il est

possible que la formation de nucléosomes mixtes en histones H3 soit seulement transitoire et donc difficilement observable.

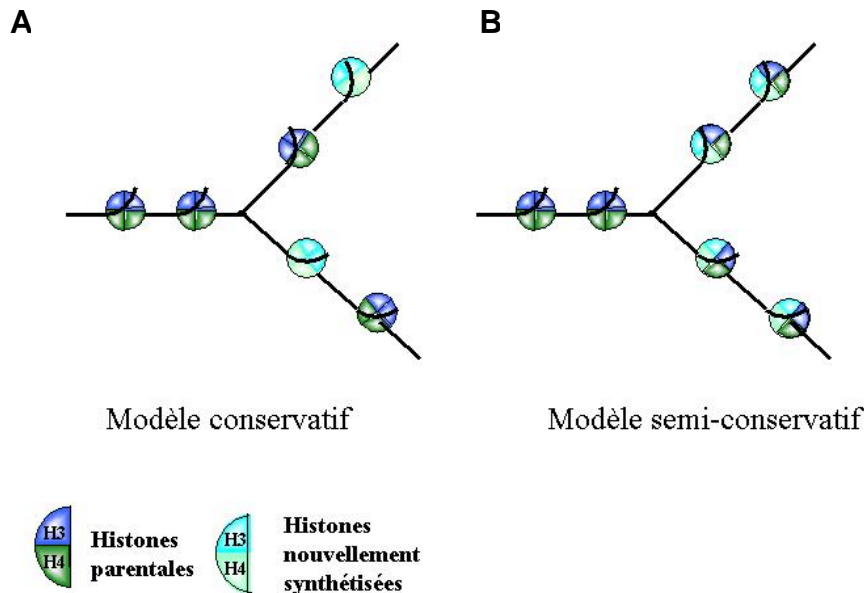


Figure 3-34 : Mécanismes de transmission des informations épigénétiques pendant la réplication

Modèles de transmission des informations épigénétiques portées par les histones H3 et H4 parentales au niveau des fourches de réplifications, A) modèle conservatif : les tétramères d'histones (H3/H4)₂ parentaux et nouvellement synthétisés sont répartis aléatoirement sur les brins filles, B) modèle semi-conservatif : les dimères d'histones (H3/H4) sont répartis aléatoirement sur les brins filles, les nucléosomes peuvent contenir des histones parentales et nouvellement synthétisées. Les dimères d'histones (H3/H4) sont représentés par des arcs de cercle de couleur bleu et vert foncé pour les histones H3 et H4 parentales respectivement, et bleu et vert clair pour les histones nouvellement synthétisées H3 et H4 respectivement. L'ADN est représenté par un trait noir. Pour des raisons de clarté, les histones H2A/H2B ne sont pas représentées.

4.4. Implication biologique de la fonction chaperon d'histone d'*Asf1*

Asf1 interagit avec de nombreux partenaires dont le nombre croît depuis la découverte du gène d'*Asf1*. L'identification de ces multiples partenaires pose la question de leur rôle dans les différentes voies impliquant *Asf1*. De façon remarquable, la plupart de ces partenaires sont également impliqués dans la répression de la transcription des gènes, la réponse aux dommages de l'ADN ou la réplication de l'ADN. Il est donc difficile d'attribuer une fonction spécifique à chaque interaction qu'établit *Asf1* avec ses partenaires uniquement sur la base d'études phénotypiques. Une approche permettant une description plus précise des fonctions d'*Asf1* est l'identification et l'étude de mutants qui affectent spécifiquement l'interaction d'*Asf1* avec un partenaire déterminé. Sur la base des structures de nucléosomes (Luger et al., 1997) et du complexe d'*Asf1* avec les histones H3/H4 que nous avons résolue, nous avons conçus des mutants de l'histone H3 qui affectent spécifiquement l'interaction *Asf1*/(H3/H4). Ainsi, nous avons pu montrer que des histones H3/H4 ne pouvant interagir

avec Asf1 ne sont pas assemblés en nucléosome lors de la réplication. L'interaction Asf1-histones semble donc primordiale pour le bon déroulement de l'assemblage de la chromatine lors de la réplication. D'ailleurs, en janvier 2008, l'équipe de G. Almouzni a observé la présence de Asf1 sur des fourches de réplication dans des cellules humaine HeLa et a caractérisé un complexe dans lequel Asf1 et les hélicases MCM2-7 sont connecté via leur interaction respective aux histones au niveau du réplisome. Les auteurs proposent qu'Asf1, en tant qu'accepteur et donneur d'histones, prenne en charge les histones parentales et les histones nouvellement synthétisées. Asf1 permettrait donc une régulation très fine de la progression de la fourche de réplication via l'intermédiaire Asf1-(H3/H4)-MCM2-7 (Groth et al., 2007).

4.4.1. Asf1 et l'acétylation de la lysine K56 sur l'histone H3

Nos résultats ont mis en évidence le rôle essentiel de la protéine Asf1 pour l'acétylation de la lysine H3K56. Le mécanisme par lequel cette acétylation favorise la résistance des cellules aux stress génotoxiques reste encore indéterminé. La lysine K56 est proche du squelette phosphodiester de l'ADN au niveau de ses points d'entrée et de sortie du nucléosome. L'acétylation de la lysine K56 neutralise la charge positive et est supposée affaiblir l'association du nucléosome avec l'ADN (Masumoto et al., 2005). Suite à un dommage de l'ADN, le maintien de l'acétylation de la lysine H3K56 sur les nucléosome pourrait permettre de conserver la chromatine sous une conformation flexible. Ainsi, la chromatine et l'ADN seraient accessibles aux protéines de remodelage et/ou de réparation de l'ADN. L'absence d'acétylation de la lysine K56 dans les cellules dépourvues d'Asf1 pourrait entraîner une diminution de l'accessibilité de l'ADN à certains facteurs de réparation.

L'année dernière l'acétyltransférase responsable de l'acétylation de la lysine H3-K56 chez *S. cerevisiae* et *S. Pombe*, a été identifiée, il s'agit de la protéine Rtt109 et de son homologue SpRtt109 respectivement (Schneider et al., 2006).

Depuis, l'équipe de Z. Zhang a fait des découvertes très intéressantes sur la coopération entre Rtt109, Asf1 et les histones (H3/H4) chez *S. Cerevisiae*. D'une part, ils ont montré que l'interaction entre Asf1 et les histones est un pré-requis pour que Rtt109 puisse interagir avec Asf1 chez *S. Cerevisiae*. Cela fournit une explication sur la perte d'acétylation de la lysine H3-

K56 des cellules exprimant le mutant Asf1 V94R (Han, et al., 2007). De plus, cette même équipe a montré que Asf1 et Rtt109 appartiennent à la même voie génétique pour la résistance des cellules suite à l'action d'agents génotoxiques. Enfin, ils ont observé que Rtt109 et l'acétylation de la lysine H3-K56 sont tous deux requis pour le recrutement de PCNA et d'autres protéines de réplication au niveau des fourches de réplication.

L'hypothèse actuelle suppose donc qu'un des rôles de Asf1 est de présenter les histones H3/H4 à Rtt109 pour permettre l'acétylation de H3-K56 par cette acétyltransférase, cette acétylation étant requise pour une réplication et une réparation de l'ADN effective.

Chapitre 4 : Etude du mode d'action du chaperon d'histone Asf1

1. Introduction

Les expériences décrites dans le chapitre précédent ont montré le rôle central de la fonction chaperon d'histone de Asf1 lors de la réplication et de la réponse aux dommages de l'ADN. Grâce à la résolution structurale du complexe *hAsf1/(H3/H4)*, nous savons que Asf1 interagit préférentiellement avec la forme dimérique des histones H3/H4. De nombreuses questions restent pourtant ouvertes quant-au mode d'action du chaperon Asf1 : Comment Asf1 assemble les histones (H3/H4) sur l'ADN ? Sous forme de dimères, de tétramères ? Quelles sont les étapes ? Comment Asf1 participe au désassemblage des nucléosomes ? S'agit-il d'une action directe ou indirecte ? Et quel est le rôle de la queue C-terminale acide de Asf1 ?

Nous nous sommes intéressés à ces questions. Ce chapitre porte donc sur l'étude du mécanisme moléculaire d'assemblage et de désassemblage des nucléosomes par le chaperon Asf1.

2. Stratégie

Afin de mener cette étude, nous avons cherché un type d'expérience qui permette d'observer des phénomènes d'assemblage et de désassemblage de chromatine, autrement dit de surenroulement et ou de relâchement de la chromatine.

Les expériences communément utilisées pour caractériser la fonction de chaperon d'histone d'une protéine sont des expériences de surenroulement d'ADN plasmidique. Cette technique consiste à pré-incuber les histones avec la protéine puis à mettre ce complexe de pré-déposition des histones en présence de l'ADN plasmidique relâché (c'est à dire sans surenroulement). Si la protéine est effectivement un chaperon d'histone, celle-ci est capable de déposer les histones sur l'ADN ce qui entraîne la formation d'un surenroulement du plasmide. Comme la migration de l'ADN dans un gel agarose dépend de son surenroulement, il est alors possible, d'avoir une information directe sur le taux de surenroulement de l'ADN. Ce test a été réalisé par l'équipe de M. Horikoshi sur la protéine GST-Asf1 et montre bien que *in vitro*, GST-Asf1 peut assembler les histones (H3/H4) sur l'ADN (Munakata et al., 2000). Nous avons donc dans un premier temps, tenté de reproduire ces expériences avec la protéine GST-Asf1(1-156) et Asf1(1-56). Nous n'avons pas observé de

surenroulement de l'ADN plasmidique après incubation avec les histones Asf1 (données non montrées). Depuis, une autre équipe a mis en évidence que cette expérience est très peu sensible et que dans ce cas là, un surenroulement n'est observé que dans le cas où Asf1 se trouve en présence d'un autre chaperon d'histone tel CAF-1 ou HIR (Green et al., 2005)

Nous avons alors cherché une autre technique qui soit plus sensible et nous permette de détecter la formation de nucléosomes et des intermédiaires réactionnels. Il s'est avéré que la méthode des mini-cercles d'ADN remplit ces critères. Comme il s'agit d'expériences assez techniques qui nécessitent un matériel particulier que nous ne disposons pas au laboratoire, nous avons mis en place une collaboration avec l'équipe de « Biochimie de la chromatine » dirigée par A. Prunell à l'Institut Jacques Monod. Grâce à cette collaboration nous avons étudié l'assemblage par Asf1 de nucléosomes sur des mini-cercles d'ADN et testé la déstabilisation par Asf1 de nucléosomes reconstitués *in vitro* sur des mini-cercles d'ADN par la méthode du « Salt-jump » (Prunell, et al., 1999).

Cette méthode, décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes, se base sur la nature électrostatique de l'interaction ADN/Histones. En effet, à forte concentration saline, cette interaction est affaiblie par la force ionique du tampon. Une dialyse contre un tampon non salin diminue progressivement la force ionique ce qui permet aux histones de se déposer lentement sur l'ADN. Cette technique permet également d'assembler des tétramères d'histones (H3/H4)₂ sur l'ADN pour former des tétrasomes. Les histones sont ainsi assemblées sur des mini-cercles d'ADN. L'utilisation de mini-cercles d'ADN est particulièrement adaptée à l'étude des mécanismes moléculaires impliquant les nucléosomes. En effet, les mini-cercles d'ADN ont une taille d'environ 350 paires de bases ce qui permet d'obtenir majoritairement un seul nucléosome par mini-cercle d'ADN sur la séquence positionnante « 5S » (Simpson and Stafford, 1983). Enfin, selon le topoisomère utilisé, il est possible d'obtenir des nucléosomes plus ou moins stables. Ces topoisomères se caractérisent par la valeur de la contrainte de surenroulement (ΔLk) et peuvent être obtenus de manière spécifique durant leur synthèse (cf. le chapitre Matériels et Méthodes). Dans le cas des ADN circulaires, la contrainte de surenroulement peut se traduire par des contraintes de vrillages (Wr) et/ou de torsions (Tw), comme l'illustre la Figure 4-1 pour le topoisomère -3. Ainsi, un même topoisomère a plusieurs conformations possibles.

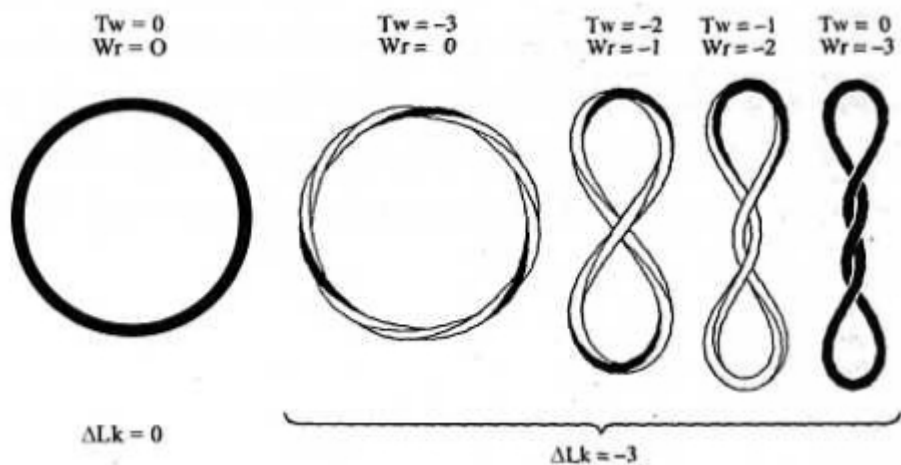


Figure 4-1 : Représentation du surenroulement d'un ADN circulaire.

Répartition de la contrainte de surenroulement (ΔLk) en contrainte de vrillage (Wr) et ou de torsion (Tw) : conformations adoptées pour un topoisomère de contrainte de surenroulement $\Delta Lk=-3$.

Selon les topoisomères utilisés, les tétrasomes et les nucléosomes obtenus par « Salt-jump » adoptent des conformations différentes. Le tableau de la Figure 4-2-A schématise les tétrasomes et les nucléosomes majoritairement obtenus pour les topoisomères 0, ± 1 et -2. Pour simplifier la représentation des topoisomères, seules les conformations en vrillage sont représentées. Ainsi, un nucléosome obtenu à partir d'un topoisomère -1 aura une conformation ouverte (pas de croisement des brins entrant et sortant du nucléosome) alors qu'un nucléosome formé à partir d'un topoisomère -2 aura une conformation croisée négative (croisement négatif des brins entrant et sortant du nucléosome). Le nucléosome le plus stable est le nucléosome de contrainte de surenroulement $\Delta Lk=-2$, cette structure correspond à celle de la structure cristallographique. Dans ce cas, 147 paires de bases d'ADN sont enroulées autour des histones et l'ADN interagit avec les histones au niveau de chaque SHL (*Super-Helix Location*). Sur les nucléosomes -1, les SHL +6.5 et -6.5 sont rompus et seulement 120 paires de bases d'ADN forment le nucléosome, il s'agit de la conformation ouverte. Cette conformation est énergétiquement moins stable que la conformation croisée négative. Enfin, les nucléosomes présentant des croisements positifs au niveau des ADN sortant et entrant sont les moins favorables en termes d'énergie.

Par électrophorèse sur gel polyacrylamide non dénaturant, il est ensuite possible de séparer et d'identifier la nature des complexes formés comme l'illustre la Figure 4-2-B. Les minicercles d'ADN étant marqués au phosphore radioactif (^{32}P), la détection se fait sur film radiosensible.

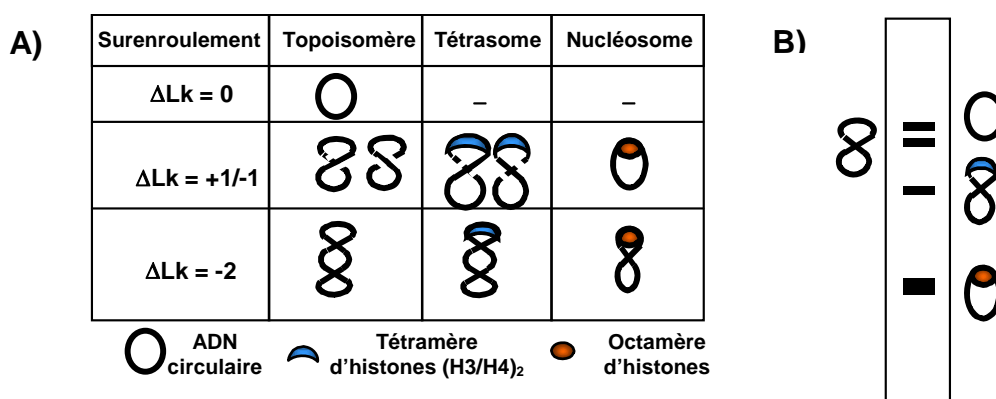


Figure 4-2 : Représentation des conformations adoptées par l'ADN en fonction du surenroulement et de la présence ou non des histones

- A) Tableau de topoisomères d'ADN circulaire : le nombre surenroulement de l'ADN, le schéma du topoisomère et les schémas des tétrasomes ainsi que des nucléosomes obtenus par « Salt-jump » sont indiqués dans chacun des cas.
- B) Schéma d'un gel polyacrylamide non dénaturant de nucléosomes et de tétrasomes reconstitués par la méthode du « Salt-jump » sur des mini-cercles d'ADN.

3. Mécanisme de désassemblage de nucléosomes par Asf1

Récemment, l'équipe de A. Prunell a montré que *in vitro* le chaperon d'histones NAP-1 pouvait dissocier un seul des dimères d'histones H2A/H2B du nucléosome pour former des hexasomes comprenant le tétramère d'histones (H3/H4)₂ et un seul dimère d'histones (H2A/H2B) (Conde e Silva, et al., 2007). Ils ont également observé que la dissociation des dimères d'histones (H2A/H2B) par l'héparine est successive. Ces résultats montrent que des deux dimères (H2A/H2B) n'ont pas la même affinité pour le tétrasome. Pour déterminer si le chaperon d'histone Asf1 est suffisant pour déstabiliser le nucléosome et pour connaître les étapes de ce processus, nous avons réalisé des expériences similaires avec la protéine humaine *hAsf1* entière. Nous avons incubé des nucléosomes obtenus par la méthode de « salt-jump » avec des quantités croissantes de *hAsf1* dans des conditions physiologiques de sel (100mM). Comme *hAsf1* est un chaperon spécifique des histones H3/H4, nous avons utilisé le topoisomère-1 car celui-ci abouti à la formation d'un nucléosome de conformation ouverte (Figure 4-2-A). Cette conformation est stable et a l'avantage de présenter des histones H2A/H2B plus flexibles et donc plus facilement dissociables du nucléosome.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 4-3-A. Aucune déstabilisation n'est observée. L'interaction des dimères d'histones (H2A/H2B) avec les tétramères d'histones (H3/H4)₂ et l'ADN reste trop forte pour être affaiblie par la seule présence d'Asf1. Sachant que *in vitro* et dans des conditions équimolaires *hAsf1* peut dissocier le tétramère d'histones

(H3/H4)₂ (Natsume et al., 2007), nous avons réalisé la même expérience que précédemment mais sur des tétrasomes reconstitués par la méthode du « Salt-jump ». Les résultats, présentés sur la Figure 4-3-B montrent que seul, *hAsf1* ne peut dissocier des tétramères d'histones (H3/H4)₂ au sein du tétrasome.

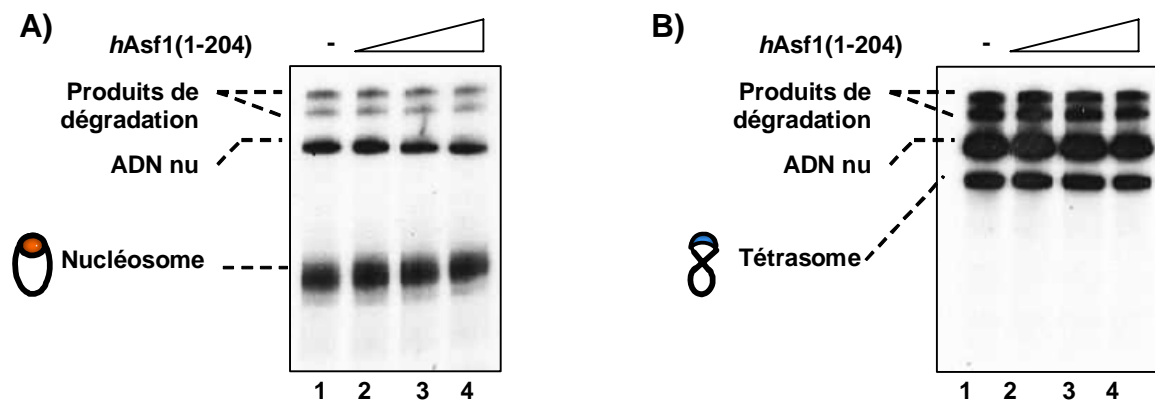


Figure 4-3 : Expériences de désassemblage par *hAsf1*(204) de nucléosomes et de tétrasomes

Electrophorèse des échantillons contenant

- A) Des nucléosomes de surenroulement $\Delta Lk = -1$ incubés avec des quantités croissantes de *hAsf1* (1-204) : pas de *hAsf1* (puits 1), 1 protéine *hAsf1* pour 1 dimère d'histones (H3/H4) (1 : 1) (puits 2), 4 : 1 (puits 3), 10 : 1 (puits 4).
- B) Des tétrasomes de surenroulement $\Delta Lk = -1$ incubés avec des quantités croissantes de *hAsf1* (1-204) : pas de *hAsf1* (puits 1), 1 protéine *hAsf1* pour 1 dimère d'histones (H3/H4) (1 : 1) (puits 2), 4 : 1 (puits 3), 10 : 1 (puits 4).

Rappelons que l'homologue de levure de *hAsf1*, *ScAsf1*, possède une queue C-terminale acide présente dans de nombreux autres chaperons d'histones telles que NAP-1. Plusieurs études montrent que la queue C-terminale acide de NAP-1, n'est pas utile pour l'assemblage des histones (H2A/H2B) sur l'ADN, mais est en revanche nécessaire à leur dissociation. Une hypothèse serait que cette queue acide neutraliserait la queue basique C-terminale de l'histone H3 (Fujii-Nakata, et al., 1992). Par analogie avec la déstabilisation de nucléosomes par de l'héparine (polymère acide), il est possible que la queue acide de NAP-1 déstabilise le point d'ancrage de l'histone H3 sur l'ADN (Conde e Silva et al., 2007). Nous avons alors voulu savoir si la queue C-Terminale de *ScAsf1* a également la capacité de déstabiliser le nucléosome. Nous avons donc testé la capacité de *ScAsf1* entier à stabiliser les tétrasomes dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment.

Dans cet objectif, nous avons entrepris de purifier la protéine entière *ScAsf1*. Nous avons utilisé le même protocole que pour la purification de la protéine humaine *hAsf1*(1-156). Or, il s'est avéré que la queue C-terminale *ScAsf1* a entièrement été dégradée. Nous avons dû

prendre des précautions particulières qui ont notamment consisté à rajouter des inhibiteurs de protéases lors de la resuspension du culot de bactéries et travailler constamment à 4°C pour limiter la protéolyse. Ces modifications nous ont permis d'obtenir suffisamment de protéines entières *Sc. Asf1*.

Nos expériences montrent que, de façon surprenante, la protéine entière *ScAsf1* ne permet pas de dissocier les histones H3/H4 de l'ADN (Figure 4-4). Elle suggère donc que dans le cas de *ScAsf1*, la queue acide C-terminale n'intervient pas ou n'est pas suffisante pour désassembler le tétrasome.

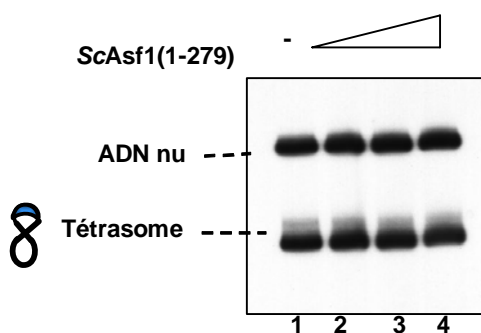


Figure 4-4 : Désassemblage de nucléosome par *ScAsf1*(1-179)

Electrophorèse des échantillons contenant des nucléosomes de surenroulement $\Delta Lk = -1$ incubés avec des quantités croissantes de *ScAsf1* (1-279) : puits 1 à 4.

La transcription ou d'autres processus faisant intervenir des ensembles macromoléculaires le long de la double hélice d'ADN induisent un surenroulement local que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Ainsi, en aval de l'ARN polymérase, l'ADN présente des surenroulements positifs (Giaever and Wang, 1988). Les nucléosomes présentant un surenroulement positif sont moins stables ce qui pourrait favoriser leur dissociation par les protéines chaperons. Par conséquent, nous avons réalisé une déstabilisation par *hAsf1* de nucléosomes obtenus à partir de topoisomères +1. Les conditions expérimentales sont identiques aux expériences précédentes. Ici encore aucune déstabilisation n'est observée dans ces conditions (Figure 4-5).

Ces expériences montrent que, dans les conditions testées, la protéine chaperon *Asf1* seule ne peut dissocier les histones (H3/H4) de l'ADN.

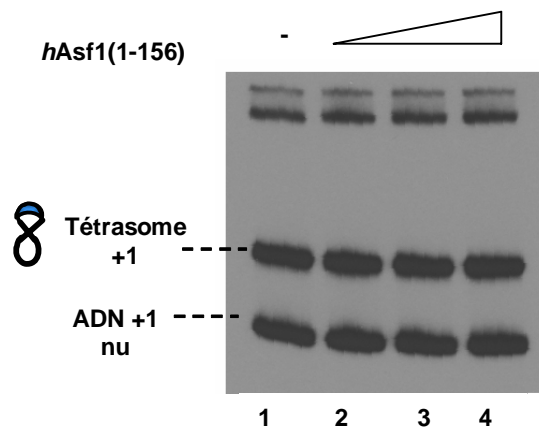


Figure 4-5 : Désassemblage de tétrasomes +1 par *hAsf1(1-156)*

Electrophorèse des échantillons contenant des tétrasomes de surenroulement $\Delta Lk = +1$ incubés avec des quantités croissantes de *hAsf1* (1-1-156) : puits 1 à 4. Contrairement aux tétrasomes de surenroulement -1 , les tétrasomes de surenroulement $+1$ migrent moins vite que l'ADN nu.

4. Mécanisme d'assemblage de nucléosomes par Asf1

4.1. Conditions expérimentales

Pour étudier le mécanisme d'assemblage de nucléosome par Asf1, nous avons mis au point un protocole inspiré des expériences de surenroulement d'ADN sur des plasmides (Munakata et al., 2000) en collaboration avec N. Conde Silva (équipe de A. Prunell, Institut Jacques Monod). Lors d'une première étape, *hAsf1* est pré-incubée avec les octamères d'histones dans des conditions salines physiologiques, c'est à dire 100mM de sel. Dans ces conditions salines, l'octamère d'histones est dissocié et les dimères d'histones (H3/H4) sont en équilibre avec la forme tétramérique (Banks and Gloss, 2004). Cet équilibre est schématisé sur la Figure 4-6.

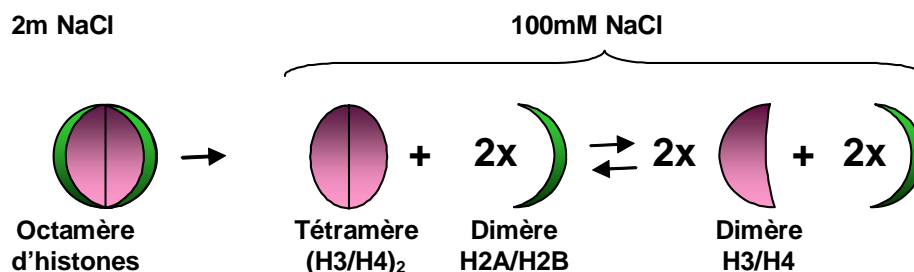


Figure 4-6 : Effet de la concentration saline sur les histones.

A forte concentration saline, 2M NaCl, les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment un octamère d'histone. A faible concentration saline, l'octamère d'histone est dissocié. A 100mM NaCl, les histones H2A et H2B se trouvent sous une forme dimérique (H2A/H2B) et les histones H3 et H4 sont en équilibre entre leur forme dimérique (H3/H4) et leur forme tétramérique (H3/H4)₂.

L'objectif de cette pré-incubation est de former un complexe de pré-déposition des histones, qui serait constitué de Asf1 en interaction avec les histones (H3/H4). La seconde étape consiste à ajouter l'ADN à l'échantillon et laisser incuber pour permettre la formation de tétrasomes par Asf1 puis de nucléosomes. Nous supposons que Asf1 va assembler les histones H3 et H4 sur l'ADN. En effet, il a été montré que si le tétrasome est formé, les dimères d'histones (H2A/H2B) peuvent former un nucléosome sans nécessiter la présence de chaperons (Kireeva et al., 2002). Cette expérience est schématisée sur la Figure 4-7.

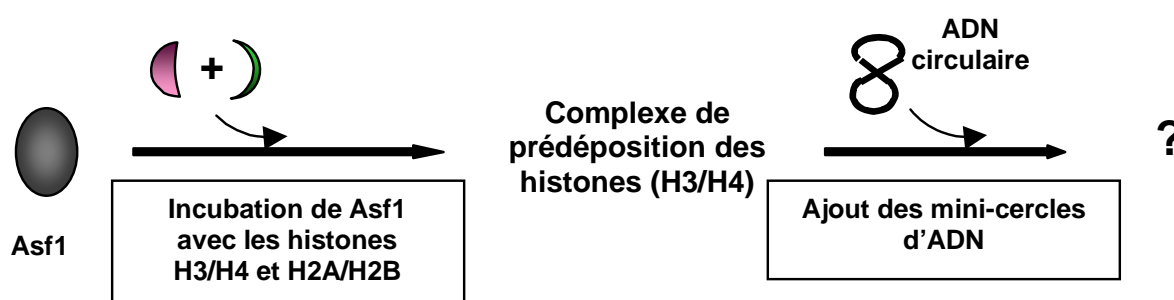


Figure 4-7 : Représentation schématique du protocole d'assemblage de nucléosomes par Asf1.

Le protocole se divise en deux étapes. La première étape consiste à incuber Asf1 avec les histones H3, H4, H2A, H2B dans des conditions salines physiologiques, soit 100mM NaCl, pour former un complexe de pré-déposition des histones (H3/H4) comprenant Asf1 et les histones (H3/H4). Lors de la deuxième étape est ajouté l'ADN circulaire pour permettre la formation de nucléosomes.

L'échantillon est ensuite déposé sur gel retard non dénaturant et les complexes formés sont identifiés en fonction de leur migration. Pour connaître la migration des nucléosomes sur les gels retards, un échantillon de ce complexe obtenu par « Salt-jump » est également déposé. Dans cette expérience, deux rapports sont importants, le rapport histones/ADN et la stoechiométrie entre *hAsf1* et les dimères d'histones (H3/H4). Ces deux rapports déterminent la quantité d'histones libres dans l'échantillon et modulent donc la formation d'agrégats. La pré-incubation de *hAsf1* avec les histones est donc également nécessaire pour neutraliser les charges et limiter le phénomène d'agrégation dans les conditions physiologiques. Lorsque les histones et l'ADN sont agrégés, les agrégats formés ne migrent pas dans le gel polyacrylamide durant l'électrophorèse. Cet ADN est détecté sur le film radiosensible au niveau des puits de chargement, et est indiqué pour chacune des expériences.

Les rapports histones/ADN et hAsf1/dimères d'histones (H3/H4) doivent être très précis pour ces expériences. Or, malgré la connaissance des concentrations de chaque protéine, les volumes utilisés sont extrêmement faibles et les volumes exacts calculés sont en dessous de l'erreur de pipetage. Une gamme est alors préalablement réalisée pour chaque nouvel échantillon pour déterminer les conditions de reconstitution et de reproductibilité optimales.

Au cours de ces expériences nous nous sommes heurtés à des difficultés liées à la formation plus ou moins importante d'agrégats d'ADN avec les histones. Ce phénomène est peu expliqué et dépend beaucoup de la manipulation des histones lors des expériences. Par exemple, si les histones ont subi au cours de leur traitement une baisse de concentration saline de leur tampon, elles peuvent être assemblées en tétrasomes par la technique du « salt-jump » mais, curieusement, elles ne sont plus compétentes pour être assemblées par Asf1. Elles ont tendance à s'agréger avec l'ADN.

4.2. Etude du mécanisme d'assemblage d'octamères d'histones en présence d'Asf1

Nous avons réalisé une première expérience d'assemblage des histones sur l'ADN par hAsf1 (1-156). Plusieurs contrôles ont été réalisés. Le contrôle positif qui nous permet de connaître la migration des nucléosomes consiste à assembler les octamères d'histones sur l'ADN par « Salt-jump ». Les contrôles négatifs sont au nombre de quatre. Il s'agit du même protocole que pour l'assemblage des histones sur l'ADN par hAsf1, en absence de certains composants. Ainsi, un premier contrôle est réalisé sans histones ni Asf1, un autre avec histones mais sans Asf1, le troisième avec les histones mais sans Asf1 et le quatrième avec le mutant Asf1(1-156)V94R. Le contrôle avec le mutant hAsf1 (1-156) V94R qui abroge de façon spécifique l'interaction Asf1/(H3-H4) est extrêmement important. Il permet de vérifier que l'assemblage des histones par Asf1 observé dans cette expérience est dû à l'interaction spécifique de Asf1 avec les histones ou s'il s'agit uniquement d'un effet électrostatique non spécifique comme celui observé avec l'héparine, composé chimique acide, qui est capable d'assembler seul des nucléosomes grâce uniquement à ses interactions électrostatiques avec les histones.

Le résultat de ces expériences est représenté sur la Figure 4-8. L'ensemble des contrôles négatifs sont corrects et des nucléosomes ont bien été formés par « Salt-jump » (puits 1, 3, 4, 5 et 6). De plus il y a bien formation d'un complexe ADN-protéine par hAsf1(1-156), mais, de

façon surprenante, sa migration est différente de la migration des nucléosomes obtenus par « Salt-Jump ». Il ne s'agit donc pas de nucléosomes. Ce complexe est pourtant spécifique de l'interaction Asf1/(H3/H4) puisqu'aucun complexe n'est observé dans l'échantillon contenant le mutant *hAsf1* (1-156) V94R. Il est possible que ce complexe contienne le tétrasome mais cette expérience ne nous permet pas de connaître sa composition exacte.

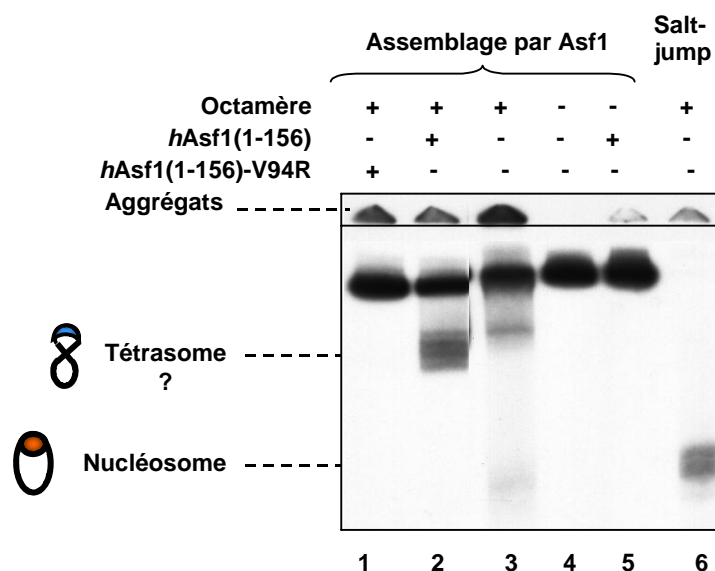


Figure 4-8 : Assemblage des histones par *hAsf1*(1-156) sur l'ADN

Gel polyacrylamide non dénaturant des échantillons d'assemblage de nucléosomes par *hAsf1* (1-156) V94R (puits 1), par *hAsf1* (1-156) (puits 2), sans *hAsf1* et sans histones (puits 3), sans *hAsf1*(1-156) (puits4), sans histones (puits 5), par « Salt-jump » (puits 6).

Il est possible que *hAsf1* (1-156) permette la formation de tétrasomes mais qu'une fois libéré de son interaction avec les histones H3/H4, *hAsf1*(1-156) neutralise les charges du tétrasome empêchant ainsi l'assemblage des dimères d'histones (H2A/H2B). Pour tester cette hypothèse, nous avons testé la capacité du dimère d'histones (H2A/H2B) à s'associer avec des tétrasomes formés par *hAsf1*(1-156). Pour cela, nous avons pré-incubé des tétramères d'histones (H3/H4)₂ avec *hAsf1*, puis nous avons ajouté l'ADN de façon à former des tétrasomes. Nous avons ensuite incubé les tétrasomes avec des concentrations croissantes de dimères (H2A/H2B). Les résultats sont présentés sur la Figure 4-9. Nous observons que *hAsf1* est capable de déposer les histones (H3/H4) seul sur l'ADN pour former des tétrasomes (puits 1). Ce résultat a été obtenu à plusieurs reprises mais avec des rendements plus ou moins élevés selon les rapports ADN/Histones et Asf1/(H3/H4) utilisés. Après ajout des histones (H2A/H2B), nous pouvons constater la diminution de tétrasomes et la présence d'un autre complexe ADN/Histones non identifié (puits 2 et 3). La position

intermédiaire de ce complexe sur le gel entre le tétrasome et le topoisomère d'ADN -1 suggère qu'il pourrait s'agir d'un hexasome, c'est à dire de l'association de l'ADN avec un tétramère d'histones (H3/H4)₂ et d'un dimère d'histones (H2A/H2B) (Belotserkovskaya et al., 2003).

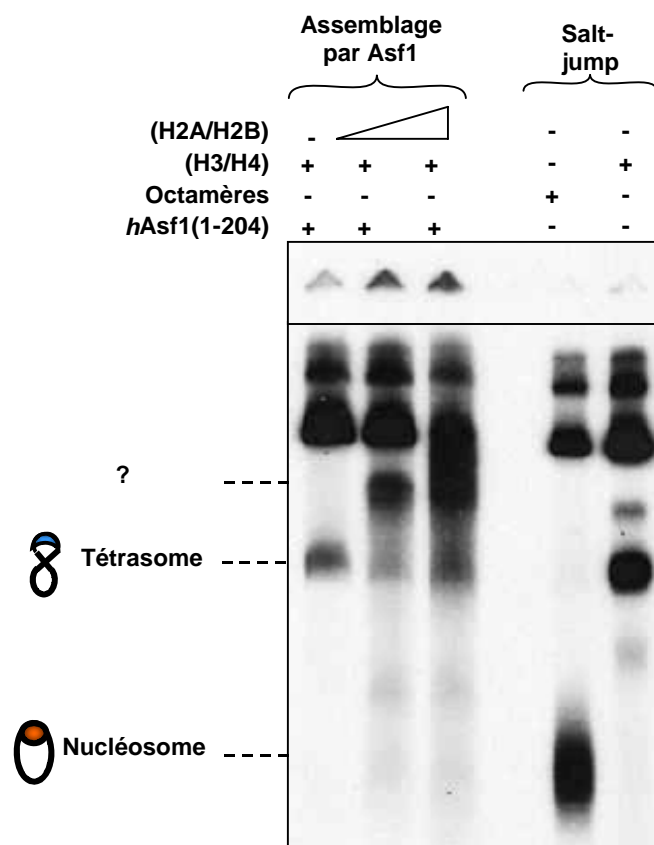


Figure 4-9 : Mise en évidence de la formation d'un complexe ADN-protéine intermédiaire par *hAsf1*(1-204)

Gel polyacrylamide non dénaturant d'échantillons d'assemblage de tétrasomes par *hAsf1*(puits 1), puis incubé avec des quantités croissantes de dimères (H2A/H2B) (Puits 2). Puits 3 et 4, nucléosome et tétramère respectivement, obtenus par « Salt-jump ».

La formation d'un complexe ADN/Histones non identifié ainsi que l'impossibilité de former des nucléosomes en présence de *hAsf1* suggèrent que *hAsf1* pourrait rester en interaction avec les histones (H3/H4) sous forme d'hétérotétramère et empêcher le dépôt d'un des dimères d'histones (H2A/H2B). Cette hypothèse n'est pas en contradiction avec les résultats présentés précédemment. En effet, l'interaction de Asf1 avec la forme hétérodimérique des histones (H3/H4) est majoritaire mais aucune expérience n'a prouvé l'existence du complexe Asf1/(H3/H4)₂. De plus, au cours de sa thèse, A. Lautrette a montré que *in vitro* *hAsf1*(1-156) est capable de se lier au complexe (H3/H4) hétérotétramérique. Il est donc possible que le

complexe $hAsf1/(H3/H4)_2$ soit une forme intermédiaire lors de l'assemblage des nucléosomes *in vivo*.

Afin d'étudier la présence de $hAsf1$ sur le complexe ADN/Histone, nous avons incubé le complexe formé par $hAsf1(1-204)$ avec des quantités croissantes d'anticorps anti-Asf1. Vu le poids moléculaire élevé de l'anticorps anti-Asf1, environ 150kDa, sa fixation sur un complexe ADN/ $Asf1/(H3/H4)_2$ devrait entraîner une différence de migration lors de l'électrophorèse. Nous pouvons observer sur la Figure 4-10 une déviation de la migration du complexe lors de l'ajout de l'anticorps (puits 4 et 5). Cependant, cette variation de migration pourrait être également due à une différence de polymérisation du gel car la bande caractéristique du topoisomère nu est également élargie. dans les puits 4 et 5.

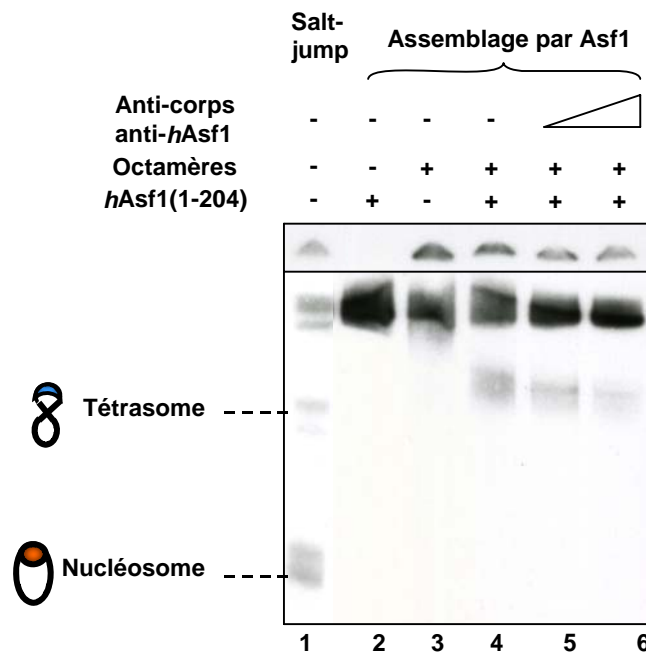


Figure 4-10 : Test de présence de $hAsf1(1-204)$ sur le complexe ADN-protéine intermédiaire formé

Gel polyacrylamide d'échantillons d'assemblage d'histones obtenu par « Salt-jump » (puits 1), par $hAsf1(1-204)$ mais sans octamères d'histones (Puits 2), sans $hAsf1(1-204)$ (Puits 3), par $hAsf1(1-204)$ (Puits 4), par $hAsf1(1-204)$ puis incubé avec 3 équivalents d'anticorps anti- $hAsf1$ pour un équivalent de $hAsf1$ (Puits 5), par $hAsf1(1-204)$ puis incubé avec 10 équivalents d'anticorps anti- $hAsf1$ pour un équivalent de $hAsf1$ (Puits 6).

Ce résultat ne nous permet donc pas encore de conclure sur la présence ou non de $hAsf1(1-204)$ sur le complexe intermédiaire formé. Il est également possible que la région de reconnaissance de l'anticorps sur $hAsf1$ soit aussi masquée dans le complexe que nous cherchons à caractériser et soit donc inaccessible à l'anticorps anti- $hAsf1$.

4.3. Etude de l'assemblage de tétramères d'histones sur l'ADN en présence d'Asf1

Nous avons cherché à aller plus loin dans l'analyse des différents mécanismes envisageables pour l'assemblage du nucléosome par Asf1 : soit les dimères d'histones H3/H4 sont déposés successivement ou simultanément sur l'ADN par Asf1, soit le tétramère d'histone (H3/H4)₂ est formé préalablement à son dépôt par Asf1 sur l'ADN (cf. Figure 3-33). La présence d'un autre chaperon d'histone tel que CAF-1 ou HIRA ainsi que la présence de l'ADN pourrait favoriser l'interaction Asf1/(H3/H4)₂. En conséquence, nous avons testé la capacité de *hAsf1* à déposer des tétramères d'histones (H3/H4)₂ sur des mini-cercles d'ADN.

Pour cela nous avons préparé un complexe (H3/H4) sous une forme uniquement hétérotétramérique. Rappelons que, *in vitro*, le complexe (H3/H4) est en équilibre entre une forme hétérotétramérique et une forme hétérodimérique (Banks and Gloss, 2004). Cet équilibre est représenté sur la Figure 4-11.

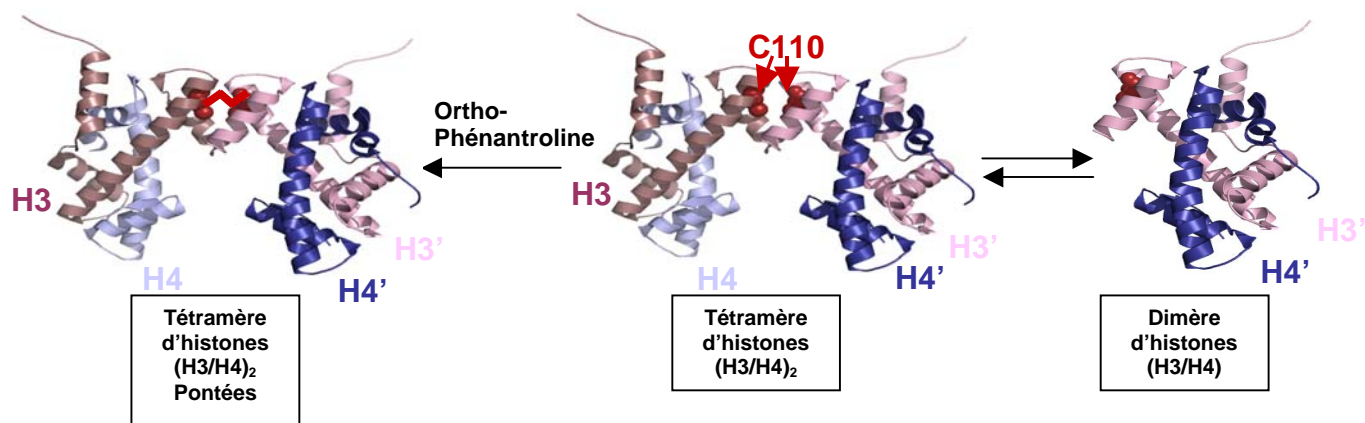


Figure 4-11 : Représentation des formes hétérotétramériques et hétérodimériques de (H3/H4).

Au centre et à droite est représenté l'équilibre entre la forme hétérotétramérique et hétérodimérique du complexe (H3/H4) respectivement. A gauche est représenté la forme exclusivement hétérotétramérique bloquée par un pont disulfure H3-H3' au niveau de la cystéine C110. La cystéine C110 est représentée par des sphères rouges.

Différentes études ont montré qu'il est possible de modifier la proportion des formes hétérodimériques et hétérotétramériques du complexe (H3/H4). L'association des deux hélices C-terminales de l'histone H3 permet la formation de l'hétérotétramère (H3/H4)₂ (Luger et al., 1997). La forme hétérotétramérique peut être stabilisée par la formation d'un pont disulfure entre les cystéines C110 des sous-unités adjacentes H3 et H3' du tétramère comme illustré sur la Figure 4-11 (Camerini-Otero and Felsenfeld, 1977). Les thiols sont séparés de 6.2Å dans la structure du nucléosome (Luger et al., 1997). Néanmoins, la flexibilité

du complexe isolé permet la formation d'un pont disulfure par un agent oxydant, l'orthophénanthroline, qui bloque la forme exclusivement hétérotétramérique du complexe (Hamiche, et al., 1996). Nous avons vérifié par électrophorèse SDS-PAGE en condition non réductrice la présence de l'hétérotétramère (H3/H4)₂. L'électrophorèse SDS-PAGE permet de séparer H3 et H4. En condition non réductrice, si H3 et H3' sont reliés par un pont-disulfure (Hétérotétramère ponté), la liaison est maintenue lors de l'analyse. La Figure 4-12 présente la migration par électrophorèse SDS-PAGE en condition non réductrice du complexe (H3/H4) purifié (Puits 1). Nous observons que cette solution contient une faible proportion de formes hétérotétramériques probablement oxydées par l'oxygène atmosphérique. Le traitement à l'orthophénanthroline du complexe (Hamiche et al., 1996) entraîne des modifications du profil électrophorétique (Puits 2). Après ce traitement, presque 100% du complexe (H3/H4) se trouve sous forme hétérotétramérique.

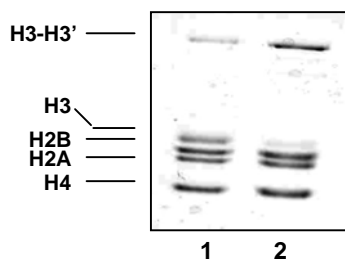


Figure 4-12 : Pontage des histones H3-H3' au sein du tétramère d'histone (H3/H4)₂

SDS-PAGE du complexe (H3/H4) sans agent réducteur (puits1), après traitement à l'Orthophénanthroline (Puits 2). La détection a été réalisée par coloration au bleu de coomassie.

Afin de caractériser le mécanisme d'assemblage des histones (H3/H4) sur l'ADN, nous avons réalisé des expériences d'assemblage avec chacune des protéines *hAsf1* (1-204), *hAsf1* (1-156), et le mutant *hAsf1*(1-156)V94R avec des histones (H3/H4) traitées à l'orthophénanthroline (Histones (H3/H4) pontées). Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites ci-dessus (Chapitre 4 :4.1). Nous avons, en parallèle, réalisé ces expériences avec des histones (H3/H4) traitées de la même façon que les histones (H3/H4) pontées mais sans orthophénanthroline (Histones (H3/H4) non pontées). Nous observons que, sur la Figure 4-13 et en accord avec les expériences précédentes, les histones (H3/H4) non pontées sont assemblées spécifiquement par *hAsf1* sur l'ADN pour former des tétrasomes (puits 3, 4, 5 et 6). Il se forme également des tétrasomes indépendamment de la présence de *hAsf1*, mais en quantité très faible (puits 3). Les histones (H3/H4) pontées sont également assemblées sur l'ADN pour former des tétrasomes mais uniquement par « Salt-

jump » (Puits 2). Ni *hAsf1* (1-204), ni *hAsf1* (1-156) ne peuvent déposer les tétramères d'histones (H3/H4)₂ pontés sur l'ADN. Ainsi, *hAsf1* déposerait les histones (H3/H4) préférentiellement sous leur forme hétérotétramérique. Cependant, nous pouvons constater que la quantité d'agrégats visibles au niveau des puits de chargement du gel est plus importante que lors des expériences précédentes. Cette agrégation est d'autant plus accentuée lorsque les histones ont été pontées par l'orthophénanthroline. Nous pouvons donc supposer que la réaction de pontage des histones favorise leur interaction non spécifique avec l'ADN. Il est donc difficile de pouvoir conclure définitivement sur la capacité de *hAsf1* à déposer les histones (H3/H4) sous leur forme hétérotétramérique.

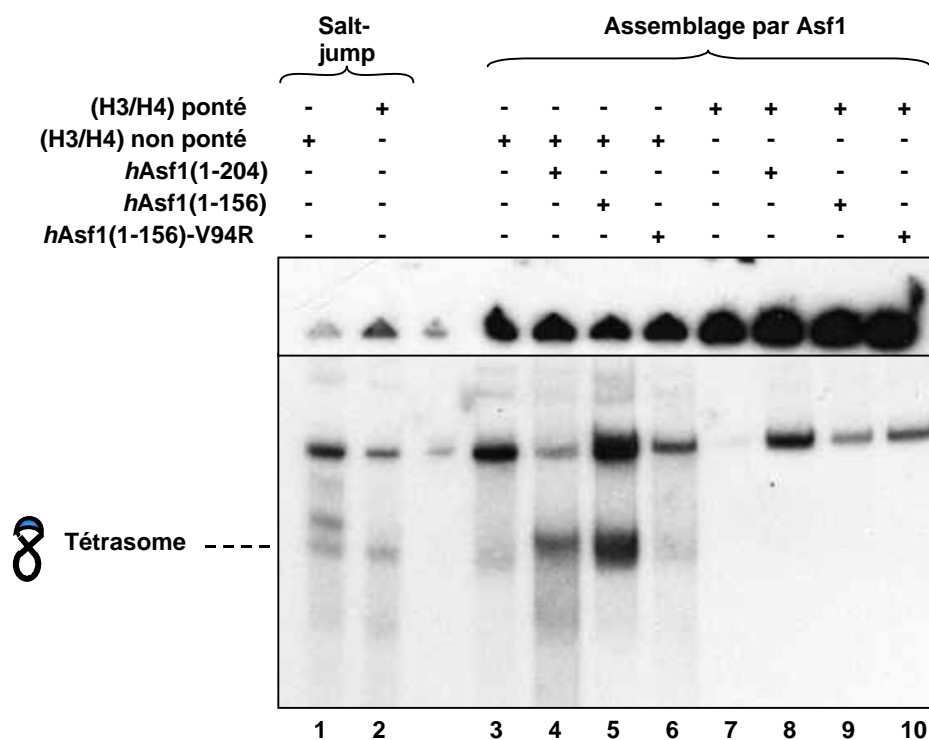


Figure 4-13 : Test d'assemblage des tétramères et des dimères H3/H4 par *hAsf1* sur l'ADN

Gel polyacrylamide non dénaturant d'échantillons d'assemblage d'histones (H3/H4) non pontées et pontées obtenu par « Salt-jump » (puits 1 et 2 respectivement), sans *hAsf1*(1-204) (puits 3 et 7), par *hAsf1*(1-204) (puits 4 et 8), *hAsf1*(1-156) (puits 5 et 9), par *hAsf1*(1-156) V94R (puits 6 et 10).

5. Discussion

Les expériences menées au cours de ce travail montrent que la protéine chaperon Asf1 est suffisante pour déposer les histones (H3/H4) sur l'ADN et former des tétrasomes (Figure 4-14, étape 1). Contrairement à l'héparine, l'assemblage des histones par Asf1 n'est pas un effet indirect dû à une interaction électrostatique non spécifique avec les histones. L'action de Asf1 nécessite l'interaction spécifique entre les deux partenaires puisque le mutant Asf1V94R qui n'interagit pas avec les histones est incapable de les déposer sur l'ADN. Ainsi, l'interaction de Asf1 avec l'hélice C-terminale de l'histone H3 également impliquée dans l'interaction avec le deuxième dimère d'histones (H3/H4)' ne bloque pas la formation d'un tétramère d'histone (H3/H4)₂ au sein du tétrasome. Pourtant, de façon surprenante, lorsque des histones (H2A/H2B) sont ajoutées à ces expériences, aucun nucléosome n'est formé. Le complexe ADN/protéine obtenu est une forme intermédiaire entre le tétrasome formé par Asf1 et le nucléosome (Figure 4-14, étape 2). Il est possible que le surenroulement de plasmides observés en présence de Asf1 et d'octamères d'histones par l'équipe de M. Horikoshi corresponde à la formation de ce complexe (Munakata et al., 2000).

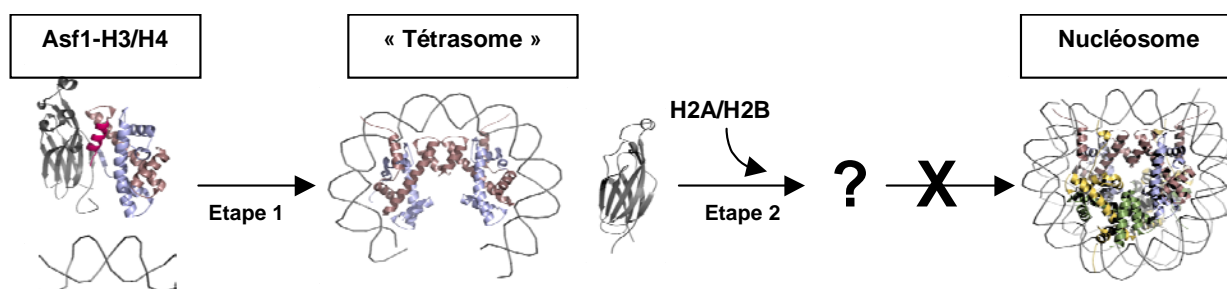


Figure 4-14 : Représentation schématique des étapes d'assemblage d'histones sur l'ADN par Asf1

Asf1 interagit avec un dimère d'histones (H3/H4) et les dépose sur l'ADN pour former un tétrasome (étape 1), l'ajout de H2A/H2B aboutit à la formation d'un complexe ADN/protéine non déterminé (étape 2), il n'y a pas de formation de nucléosomes. Asf1 est représenté en feuillet gris, l'ADN en ruban gris, H3 en rose, H4 en bleu, H2A en jaune et H2B en vert.

Il pourrait s'agir d'un hexasome (ADN enroulé autour d'un tétramère d'histones (H3/H4)₂ et un dimère d'histones (H2A/H2B)). L'existence de telles structures a déjà été observée *in vitro* lors de reconstitution de nucléosomes et au cours de la transcription d'ADN. En effet, lors du passage de la polymérase Pol II, FACT prend en charge un seul dimère d'histone (H2A/H2B) (Belotserkovskaya et al., 2003). Cependant, rien n'explique pourquoi, dans nos expériences le deuxième dimère (H2A/H2B) ne se dépose pas également pour former un nucléosome. Sachant que l'affinité des deux dimères d'histones (H2A/H2B) est différente (Levchenko and Jackson, 2004), Asf1 pourrait rester sur l'une des faces du complexe,

bloquant ainsi l'accès au site le moins affin pour les histones (H2A/H2B). Les expériences menées au cours de ce travail ne sont pas suffisantes pour conclure sur ce point. Un moyen de répondre à cette question serait d'analyser plus en détail la composition de ce complexe ADN/protéine. Il serait possible de réaliser les expériences d'assemblage par Asf1 dans les mêmes conditions que celles décrites dans cette étude mais avec des quantités plus importantes de matériel puis d'analyser les composants du complexe formé par SDS-PAGE. L'électrophorèse pourrait être réalisée après une dialyse qui permettrait d'éliminer les excès d'histones et d'Asf1 non complexés présents dans l'échantillon. Une autre expérience intéressante serait de comparer la migration du complexe non identifié à celle d'un hexasome reconstitué *in vitro* dans les mêmes conditions décrites dans l'article de V. Levchenko (Levchenko, et al., 2005).

Jusqu'à présent, le désassemblage du nucléosome par Asf1 n'a été observé que *in vivo*. L'équipe de J. Tyler a montré que le désassemblage par Asf1 des nucléosomes au niveau des promoteurs est essentiel à l'activation des gènes PHO5 et PHO8 (Adkins and Tyler, 2004). Cependant, nos résultats montrent que seul, Asf1 ne peut déstabiliser ni des nucléosomes, ni des tétrasomes formés sur des mini-cercles d'ADN, même lorsque l'ADN présente un surenroulement positif. Ainsi, il est probable qu'*in vivo* également Asf1 n'est pas suffisant pour interagir avec le feuillet C-terminal de l'histone H4 et casser l'interaction H3-H3' du tétramère (H3/H4)₂ au sein du tétrasome et former le complexe Asf1/(H3/H4) (English et al., 2005). Nos résultats ainsi que ceux de J. Tyler suggèrent qu'Asf1 ne pourrait désassembler que les tétramères d'histones (H3/H4)₂ préalablement déstabilisés. Nous pouvons donc envisager qu'un autre chaperon d'histone voire un facteur de remodelage tel que INO80, également nécessaire au remodelage du promoteur PHO5, soit nécessaire pour le désassemblage des histones.

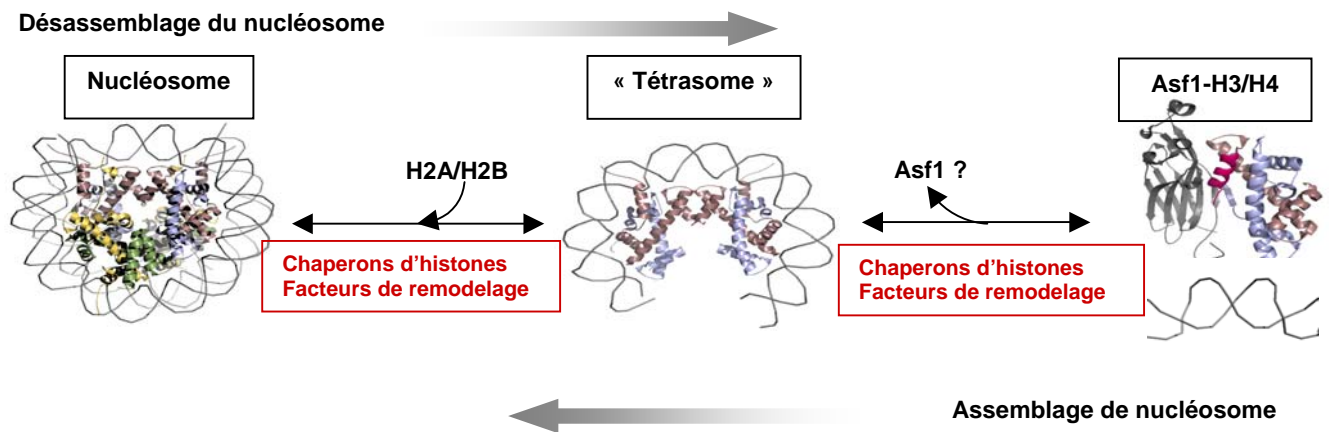


Figure 4-15 : Modèle de l'assemblage et du désassemblage de nucléosome *in vitro* par Asf1.

Le dépôt des histones (H3/H4) par Asf1 pour former un tétrasome, ainsi que le désassemblage des histones (H3/H4) du tétrasome nécessiteraient une coopération de Asf1 avec un autre chaperon d'histones ou un facteur de remodelage. De même le dépôt des histones (H2B/H2A) sur un tétrasome formé par Asf1 nécessiterait également une coopération de Asf1 avec un autre chaperon d'histones ou un facteur de remodelage. Asf1 est représenté en feuillet gris, l'ADN en ruban gris, H3 en rose, H4 en bleu, H2A en jaune et H2B en vert.

Chapitre 5 : Conception d'inhibiteurs spécifiques de l'interaction Asf1/(H3/H4)

1. Introduction

L'une des stratégies thérapeutiques contre le cancer consiste à développer des inhibiteurs d'interaction protéine/protéine pour perturber les processus cellulaires et provoquer l'apoptose (Souroujon and Mochly-Rosen, 1998). Les études fonctionnelles présentées au cours de ce travail sur des cellules humaines et de levures ont montré que l'interaction Asf1/(H3/H4) est essentielle lors de la réplication cellulaire, la réponse aux dommages de l'ADN et le maintien de l'intégrité génomique. L'interaction Asf1/(H3/H4) apparaît donc comme une cible intéressante pour le développement d'anti-cancéreux. L'action d'un inhibiteur spécifique de l'interaction Asf1/(H3/H4) pourrait alors entraîner des perturbations lors de l'assemblage de la chromatine et induire l'apoptose. En conséquence, nous avons cherché à concevoir de façon rationnelle un inhibiteur peptidique spécifique de l'interaction Asf1/(H3/H4) à partir de la structure du complexe.

La première étape de ce projet consiste à étudier la faisabilité de cette étude. Nous avons ensuite envisagé de concevoir des inhibiteurs peptidiques spécifiques de l'interaction Asf1/(H3/H4) par des méthodes bioinformatiques et à partir de la structure du complexe Asf1/(H3/H4). Enfin, nous avons réalisé des expériences *in vitro* afin de valider notre stratégie.

2. Etude préliminaire de faisabilité

En analysant la structure du complexe Asf1/H3(122-135), nous avons constaté que la partie C-terminale de l'histone H3 interagit avec Asf1 de la même façon lorsque H3 est sous sa forme complète ou restreinte à sa seule hélice C-terminale. Une première étape a donc consisté à utiliser le peptide couvrant l'hélice C-terminal de l'histone H3 (noté ici H3XC) comme inhibiteur peptidique de l'interaction entre Asf1 et les histones (H3/H4) entières. En collaboration avec Jean-Yves Thuret (CEA-Saclay), nous avons réalisé des expériences de compétition entre le peptide H3XC et les histones H3-H4 complexées à Asf1 au sein d'un complexe natif isolé par co-immunoprécipitation. Ces résultats préliminaires sont intéressants. Le peptide est bien capable de dissocier l'interaction entre Asf1 et le dimère H3-H4. Néanmoins, des concentrations élevées de peptide ont été requises pour atteindre cet effet de compétition (de 1 à 5mM) ce qui témoigne de la faible affinité du peptide pour Asf1 en comparaison de l'affinité des histones entières (Figure 5-1).

Ces résultats encourageants montrent la faisabilité d'une stratégie d'inhibition par l'utilisation de peptides. Il apparaît cependant nécessaire d'augmenter l'affinité du peptide pour la protéine Asf1 afin de diminuer les concentrations en peptide requises pour cette stratégie d'inhibition.

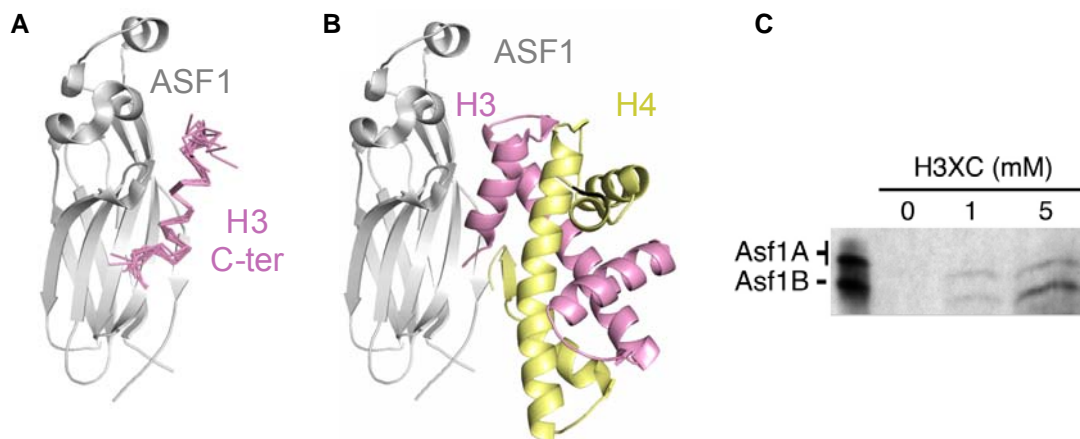


Figure 5-1 : Utilisation du peptide H3(122-135) comme inhibiteur de l'interaction Asf1-histones

A) Structure RMN du complexe Asf1 en interaction avec la partie C-terminale 122-135 de l'histone H3. B) Structure cristallographique du complexe Asf1/(H3/H4). C) Expérience de compétition entre les histones entières (H3/H4) et le peptide H3(122-135) pour l'interaction avec Asf1. La protéine Asf1 et les histones (H3/H4) issues d'extrait de cellules humaine HeLa co-immunoprécipitent et sont retenues sur la colonne. L'ajout de concentrations croissantes de peptides H3 (122-135) élue le complexe Asf1/H3(122-135).

Dans ce contexte, et en exploitant la structure du complexe Asf1/(H3/H4), nous avons envisagé la conception de nouveaux peptides dérivés du peptide H3 (122-135) par des techniques bioinformatiques afin d'augmenter l'affinité de ces peptides pour Asf1. Ce travail de *design* de protéines a été réalisé par H. Madaoui et R. Guérois (CEA-Saclay).

3. Conception d'inhibiteurs peptidiques de l'interaction Asf1/(H3/H4)

3.1. Stratégie

Parmi les différents succès publiés dans le domaine de l'ingénierie des protéines, peu de stratégies reposent sur l'augmentation de l'affinité d'un ligand en ajoutant un brin β qui peut s'apparier à un brin β du partenaire. Pourtant, l'ajout d'un élément de structure secondaire est l'un des moyens qu'a trouvés la nature pour atteindre de fortes affinités entre certains partenaires protéiques. La structure du complexe entre le domaine FHA de la protéine Ki67 et un fragment de la protéine hNIFK est un très bon exemple. Dans le peptide, une extension de 8 résidus forme un brin β qui s'apparie au feuillet β du domaine FHA, ce brin augmente l'affinité de liaison d'un facteur 200 (l'affinité de liaison passe de 80 nM à 14 μ M lorsque ce brin est absent du peptide pour le domaine FHA) (Byeon, et al., 2005).

De façon intéressante, les auteurs de cette étude ont constaté que le brin à lui seul, est très peu affiné pour le domaine FHA (42mM). Par cette étude, il apparaît que la combinaison de plusieurs fragments capables de se lier indépendamment à une protéine, permettrait d'augmenter de façon considérable l'affinité de liaison.



Figure 5-2 Structure du complexe impliquant le domaine FHA de la protéine Ki67 et un fragment de la protéine hNIFK

En vert est représenté le domaine FHA de la protéine Ki67, en bleu le fragment de la protéine hNIFK, en rouge l'extrémité C-terminale de ce fragment structurée qui forme un brin β (code PDB 2AFF).

Nous avons pu observer précédemment que l'interaction entre Asf1 et ses partenaires H3 et H4 implique l'hélice α_3 de la protéine H3 (résidus 120 à 132) et le brin β C-terminal de la protéine H4 (résidus 94 à 101) (Figure 5-3). Compte tenu de la proximité structurale de ces deux éléments de structures secondaires (8.9 Å entre l'extrémité C-terminale de l'hélice, et l'extrémité N-terminale du brin), nous avons cherché à savoir si la combinaison de ces deux épitopes de liaison en un seul peptide serait susceptible de conduire à un peptide plus affiné que le peptide H3(120-132) seul.

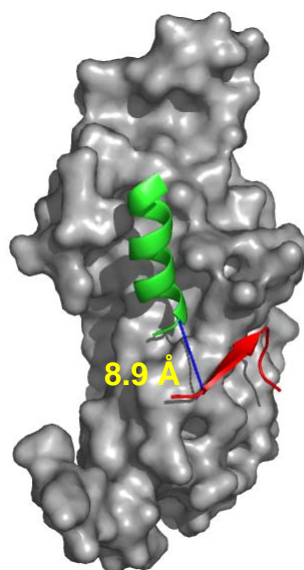


Figure 5-3 : Fragments peptidiques des protéines H3 et H4 interagissant avec la protéine Asf1

En gris est représenté la protéine Asf1, en vert est représenté l'hélice α 3 de la protéine H3 (peptide H3), en rouge le brin β C-terminal de la protéine H4. La distance entre les atomes $C\alpha$ des extrémités C-terminale de l'hélice, et N-terminale du brin est représentée par un trait bleu, elle est de 8,9 Å.

Lors du design du peptide inhibiteur de l'interaction Asf1-histones, nous avons adopté plusieurs stratégies :

- 1) augmenter la solubilité du peptide de H4,
- 2) stabiliser l'hélice du peptide de H3,
- 3) optimiser la boucle entre les épitopes des histones H3 et H4

3.2. Augmentation de la solubilité du peptide H4

Si l'on observe la composition en acide aminé de l'épitope de l'histone H4 en interaction avec Asf1 : GRTL~~Y~~GFG, on constate que celle-ci est constituée d'une majorité d'acides aminés hydrophobes susceptibles de rendre les peptides chimériques insolubles. Dans la structure cristallographique de Asf1 en complexe avec le dimère d'histones (H3/H4), la chaîne latérale de la tyrosine Y98 n'est pas localisée et tend à s'orienter vers l'extérieur du complexe. Nous avons donc supposé qu'en mutant ce résidu en Asparagine, nous augmenterions la solubilité du peptide de H4 sans diminuer son interaction avec Asf1. Effectivement le peptide H4 sauvage est totalement insoluble mais la mutation de la tyrosine en asparagine, bien qu'augmentant la solubilité, ne permet pas d'obtenir un échantillon suffisamment concentré pour mesurer son affinité avec la protéine Asf1. Néanmoins, comme la solubilité a été améliorée par cette mutation, nous avons utilisé ce mutant pour la construction d'un peptide chimère comprenant les épitopes des histones H3 et H4.

3.3. Stabilisation des éléments de structure secondaire

Lors de l'étude par RMN de l'interaction entre Asf1(1-156) et le peptide d'histone H3(122-135), nous avons constaté que le peptide de H3, non structuré en solution, se structure au contact de son partenaire. Cette structuration a un coût entropique défavorable lors de la liaison des deux partenaires. Nous avons donc cherché à minimiser ce coût afin d'augmenter l'affinité des peptides inhibiteurs pour Asf1. L'un des moyens est de stabiliser les éléments de structure secondaire adoptée par le peptide lors de son interaction. Les éléments de structures secondaires ont été très étudiés dans les années 1990. Il existe maintenant des logiciels performants qui prédisent la propension à former des hélices α en fonction de la séquence peptidique. Parmi eux le logiciel AGADIR est l'un des plus fiable. Nous avons utilisé ce logiciel pour évaluer l'augmentation de la stabilité de l'hélice du peptide de H3 pour un grand nombre de mutations. Deux peptides prédits pour présenter des gains conséquents de stabilité de l'hélice ont été retenus (Figure 5-4). Le premier peptide (H3st1) comprend trois mutations de la séquence native de l'histone H3, M119T, D123E et I124A, le second peptide (H3st2) comprend les trois mutations du peptide précédent plus les mutations Q125E et I118L. L'ensemble des mutations effectuées concerne des résidus exposés au solvant au sein du complexe Asf1/(H3(120 et sont prédits par AGADIR pour augmenter la stabilité hélicoïdale intrinsèque respectivement d'un facteur quatre et dix.

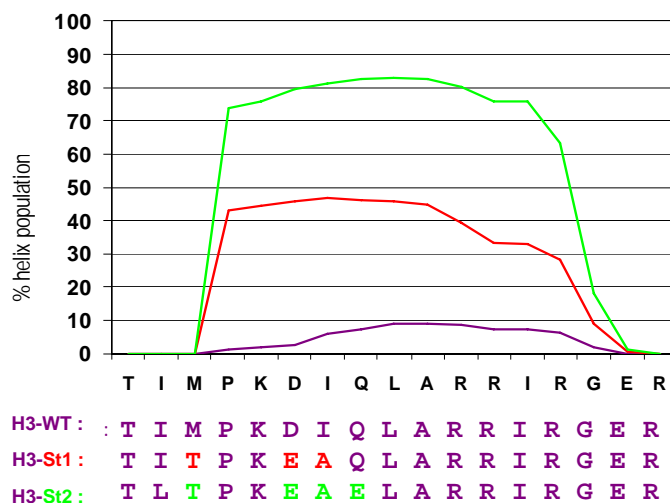


Figure 5-4 : Stabilisation de l'hélice α_3 du peptide d'histone H3.

Prédiction du gain de stabilité de l'hélice C-terminale du peptide H3 à partir de modifications de la séquence peptidique proposées par l'algorithme AGADIR. La séquence en acide-aminés du peptide de H3 est indiquée en-dessous du graphique. Les résidus de la séquence native sont en mauve, ceux de la première stabilisation en rouge et ceux de la deuxième stabilisation en vert.

3.4. Optimisation de la boucle entre les épitopes des histones H3 et H4

En se basant sur une analyse statistique des boucles de la PDB, H. Madaoui, étudiant en thèse dans notre équipe, a établi une relation entre la taille moyenne des boucles et la distance entre les extrémités C- et N-terminale des éléments de structures secondaire connectés par ces boucles. A partir de ces données et compte tenu de la distance entre l'hélice $\alpha 3$ de l'histone H3 et le brin βN de l'histone H4, il a évalué le nombre de résidus optimal et la composition en acides aminés de la boucle pour relier ces deux éléments de structure secondaire. Après avoir testé la compatibilité de la structure modélisée par des approches de dynamique moléculaire, deux boucles ont donné des résultats satisfaisants : l'une comportant quatre résidus avec la séquence GAGG et l'autre comportant cinq résidus avec la séquence GAGAS. Alors que les résidus tels que l'alanine et la glycine, qui n'ont pas de chaîne latérale encombrante, peuvent adopter un grand nombre de conformations, la chaîne latérale de la sérine forme une liaison hydrogène qui pourrait rigidifier la boucle et la contraindre dans une conformation favorable. La Figure 5-5, qui illustre la superposition du peptide chimère H3-GAGG-H4, après 2ns de simulation moléculaire, avec la structure de ces mêmes éléments de structure secondaire dans la structure native. Nous observons bien que ce peptide chimère adopte une conformation proche de celle du complexe natif (RMSD de 2,6Å).

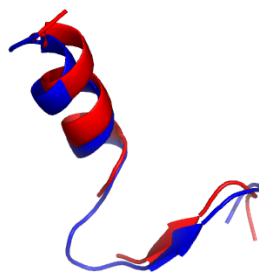


Figure 5-5 : Comparaison de la structure du peptide chimérique H3-GAGG-H4 avec les peptides H3 et H4.

En bleu est représenté le peptide chimère après 2ns de dynamique moléculaire en solvant explicite. En rouge sont représentés les peptides H3 (hélice α) et H4 (brin β) après 2ns de dynamique moléculaire en solvant explicite du complexe protéique Asf1-Histone H3H4 (code pdb : 2HUE).

Suite à cette étude, R. Guérois et H. Madaoui ont retenu deux possibilités pour stabiliser l'hélice du peptide de H3 et deux possibilités de boucle entre les épitopes de H3 et H4. Nous avons donc un total de six inhibiteurs potentiels de l'interaction entre Asf1 et les histones H3 et H4 : H3-GAGG-H4, H3-GAGAS-H4, H3st1-GAGG-H4, H3st2-GAGG-H4, H3st1-GAGAS-H4 et H3st1-GAGAS-H4.

4. Affinité des inhibiteurs potentiels pour la protéine Asf1

Afin de valider la stratégie adoptée pour l'optimisation de peptides inhibiteurs, nous avons mesuré l'affinité des peptides pour Asf1 par microcalorimétrie analytique (ITC-*IsoThermal Calorimetry*). Cette technique enregistre les quantités de chaleur dégagées lors de l'interaction entre deux partenaires. L'ajout progressif d'un partenaire permet d'extraire des données thermodynamiques telles que la stoechiométrie de l'interaction, l'enthalpie d'interaction (ΔH) et la constante de dissociation (K_d) qui rendent compte de la force et de la stabilité de l'interaction respectivement. Ces données permettent de calculer l'entropie du système (ΔS), valeur représentative du coût énergétique de la structuration nécessaire à l'interaction entre deux partenaires. Nous avons effectué ces mesures en collaboration avec G. Craescu et S. Miron (Institut Curie à Orsay).

Afin d'évaluer l'influence de chacun des paramètres d'optimisation des peptides inhibiteurs sur leur capacité à interagir avec Asf1, nous avons mesuré l'affinité pour Asf1 de neuf peptides : H3, H3st1, H3st2, H3-GAGG-H4, H3-GAGAS-H4, H3st1-GAGG-H4, H3st2-GAGG-H4, H3st1-GAGAS-H4 et H3st1-GAGAS-H4. Les affinités de ces peptides pour Asf1 sont reportées dans le Tableau 5-1.

Boucles Peptide H3	-	GAGG	GAGAS
	H3	H3	H3-GAGG-H4
Kd(μM)	18	3,5	4,3
H3st1	H3st1	H3st1-GAGG-H4	H3st1-GAGAS-H4
Kd(μM)	5	7,1	1,2
H3st2	H3st2	H3st2-GAGG-H4	H3st2-GAGAS-H4
Kd(μM)	13	1,6	3,3

Tableau 5-1 : Constantes de dissociation des peptides inhibiteurs par ITC

Affinités des peptides pour Asf1 mesurées par ITC à 30°C et pH 7,4 : 45 injections de 6μL de peptide à 0,5mM est ajouter successivement à une solution contenant 0,03mM d'Asf1(1-156).

La stoechiométrie de tous les complexes, calculée à partir des courbes d'affinité, est de 1, ce qui correspond à des complexes formés d'une molécule de peptide avec une molécule Asf1. Ces valeurs sont en accord avec les données structurales du complexe Asf1/(H3/H4).

4.1. Affinité du peptide H3 seul pour Asf1

Comme nous pouvons le constater, le peptide H3 seul possède la plus faible affinité pour Asf1 (Kd de 18μM) et les mutations réalisées sur le peptide de l'histone H3 afin de stabiliser l'hélice ont, d'une manière globale, augmenté l'affinité du peptide H3 pour Asf1. Il est pourtant surprenant d'observer que le peptide H3st2, qui présente un taux de stabilisation deux fois plus important que le peptide H3st1, a pourtant une affinité significativement plus faible que celui-ci. En observant de plus près la structure de l'histone H3(122-135) en complexe avec Asf1, nous avons constaté que le résidu Q125 de l'histone H3 fait face à une boucle de la protéine Asf1 constituée d'une majorité de résidus chargés négativement (E₄₉SEE₅₂) (Figure 5-6). Comme la mutation du résidu Q125 en acide glutamique introduit une charge négative, il est possible que cette mutation entraîne des répulsions électrostatiques avec cette boucle de Asf1 et contribue à affaiblir l'interaction.

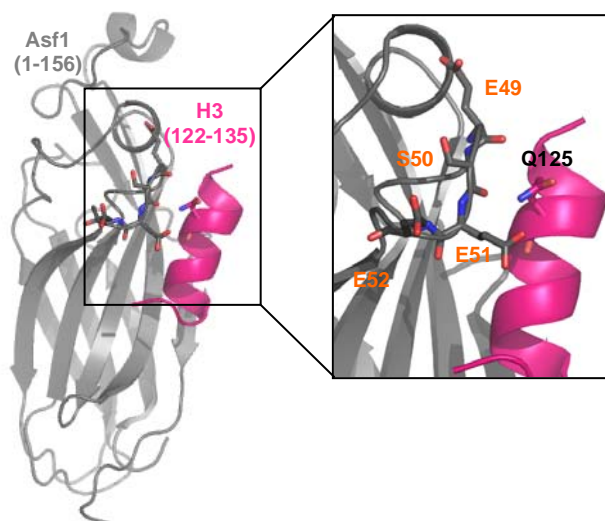


Figure 5-6 : Possible répulsion électrostatique au sein du complexe due à la mutation H3-Q125E

Représentation de l'interface entre le résidu H3Q125 et la boucle acide de Asf1(1-156) comprenant les résidus E₄₉SEE₅₂. La mutation H3Q125E introduit une charge négative susceptible de générer une répulsion électrostatique avec les résidus de Asf1 qui lui font face. Asf1 est représentée en gris, H3 en magenta. Les résidus de Asf1 E₄₉SEE₅₂ sont représentés en bâtons et indiqués en orange, le résidu H3Q125 est représenté en bâton et indiqué en noir.

Les courbes obtenues pour les trois peptides H3, H3st1 et H3st2 (Figure 5-7) ont un profil similaire à une droite légèrement incurvée, ce qui est caractéristique d'une très faible affinité entre deux partenaires. Pour ce type d'interaction, il est difficile d'évaluer de façon précise l'enthalpie d'interaction (ΔH). Par conséquent, l'évaluation du coût énergétique dû à la structuration du peptide calculé à partir de ces données ne peut être interprétée.

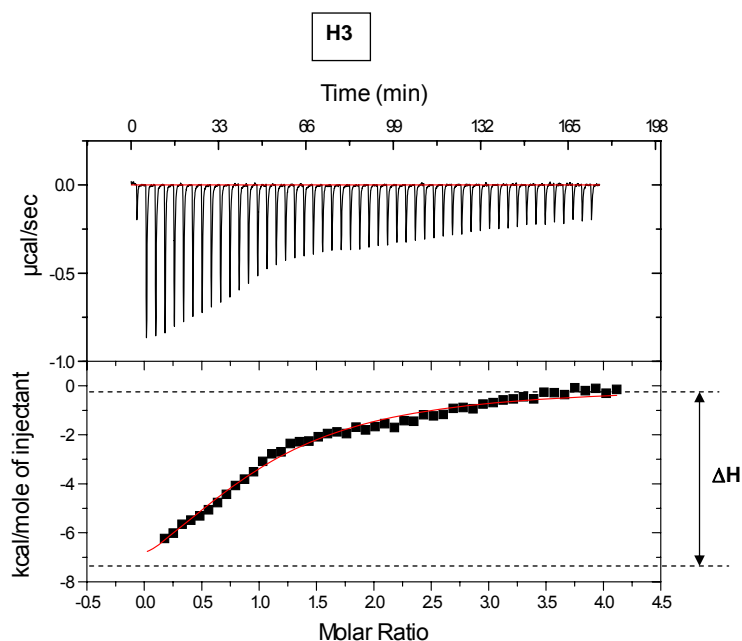


Figure 5-7 : Mesure de l'affinité par ITC entre le peptide d'histone H3 et Asf1

Mesures de l'affinité des peptides pour Asf1 réalisées par ITC à 30°C et pH 7,4 : 45 injections de 6 μL de peptide à 0,5mM sont ajoutés successivement à une solution contenant 0,03mM d'Asf1(1-156). Le panneau du haut indique la quantité de chaleur absorbée pour former le complexe suite à chaque ajout du peptide H3 en fonction du temps. Le panneau du bas indique cette même quantité de chaleur normalisée par μL de peptide H3 en fonction du temps. L'enthalpie de l'interaction, ΔH (indiquée à droite de la courbe du panneau du bas) correspond à l'énergie qu'il a fallu fournir au système pour maintenir la température constante tout au long de l'expérience c'est-à-dire jusqu'à saturation de tous les sites d'interaction de Asf1 avec H3.

4.2. Affinité pour Asf1 des peptides chimères optimisés

Une augmentation significative de l'affinité pour la protéine Asf1 est observée pour l'ensemble des peptides chimères optimisés par bioinformatique. Ce gain d'affinité peut s'observer directement par l'allure des courbes obtenues par ITC. Contrairement aux courbes obtenues pour les peptides H3 seuls, celles des peptides chimères présentent deux plateaux ainsi qu'un point d'inflexion, caractéristiques d'une interaction stable. La Figure 5-8 présente les courbes obtenues pour les deux peptides les plus affins, il s'agit des H3st2-GAGG-H4 et H3st1-GAGAS-H4. Ceux-ci ont respectivement une constante de dissociation de 1,6 et 1,2 μM , ce qui correspond à un gain d'affinité d'un facteur de 15 par rapport au peptide H3 seul.

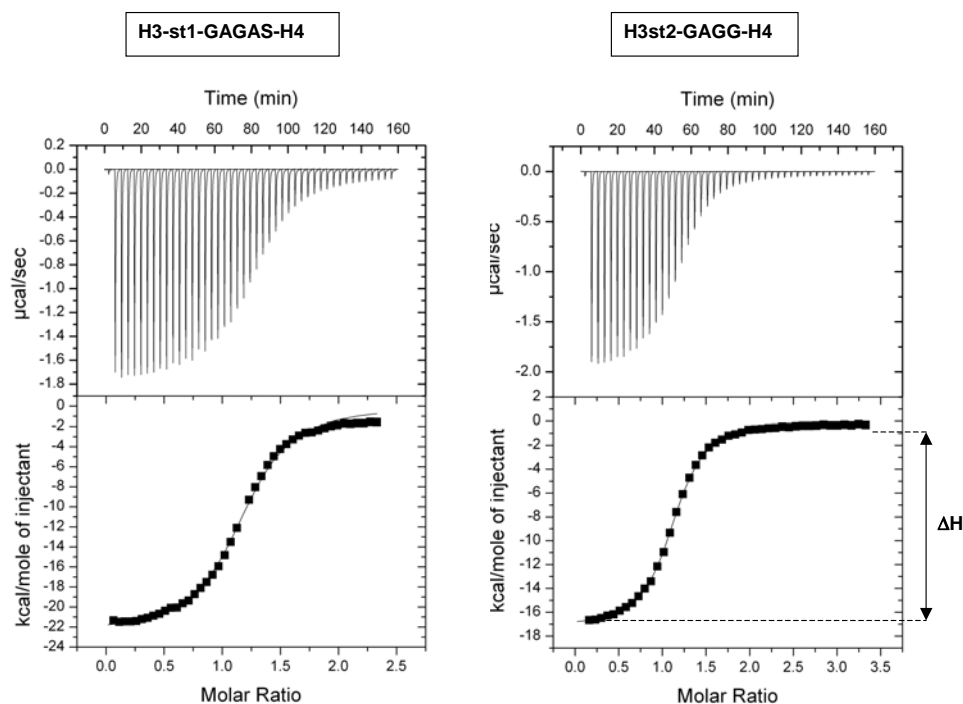


Figure 5-8 : Mesure de l'affinité par ITC entre deux peptides inhibiteurs et Asf1

Affinité des peptides pour Asf1 mesurées par ITC à 30°C et pH 7,4 : 45 injections de 6µL de peptide à 0,5mM sont ajoutées successivement à une solution contenant 0,03mM d'Asf1(1-156). Le panneau du haut indique la quantité de chaleur absorbée pour former le complexe suite à chaque ajout du peptide en fonction du temps ainsi que l'enthalpie d'interaction. Le panneau du bas indique cette même quantité de chaleur normalisé par µL d'injectant soit de peptide inhibiteur en fonction du temps.

Ces résultats sont encourageants et valident notre approche qui consiste à connecter les deux épitopes de liaison. Il nous est cependant apparu paradoxal que la stabilisation st2, pourtant moins favorable à l'interaction avec Asf1 que la stabilisation st1, puisse être comprise dans un des peptides chimères ayant l'une des meilleures affinités pour Asf1.

En observant de plus près la composition des deux peptides inhibiteurs les plus affins, H3st2-GAGG-H4 et H3st1-GAGAS-H4, nous pouvons constater que non seulement la séquence de la région correspondant à H3 diffère (H3st1 et H3st2) mais également la composition des boucles (GAGG et GAGAS). H3st2 est associé à la boucle la plus courte testée (GAGG) et H3st1 est associé à la boucle la plus longue (GAGAS).

On peut imaginer que la longueur de la boucle GAGG pourrait être un peu courte entre les deux épitopes de liaison, empêchant ceux-ci d'adopter leur conformation native lors de l'interaction avec Asf1. Dans le cas du peptide chimère H3st2-GAGG-H4, ce réarrangement pourrait permettre au peptide de réduire la répulsion électrostatique entre le résidu Q125E

du peptide H3 et la boucle E₄₉SEE₅₂ de Asf1. Dans le cas du peptide chimère H3st1-GAGAS-H4, la boucle GAGAS est suffisamment longue pour permettre à l'hélice de H3st1 et au brin de H4 de se positionner de façon native par rapport à Asf1.

5. Conclusion et perspectives

Cette étude présente les premières étapes de la conception de molécules inhibitrices de l'interaction Asf1/(H3/H4). Notre stratégie a consisté à associer les épitopes de liaison de plusieurs partenaires de Asf1 afin d'augmenter l'affinité du composé pour Asf1. Dans un premier temps, nous avons choisi de relier l'hélice C-terminale de l'histone H3 et le brin C-terminal de l'histone H4. Pour cela, nous avons tiré parti des informations structurales apportées par la structure du complexe entre Asf1 et l'hélice C-terminale de l'histone H3 résolue au cours de ma thèse ainsi que de la structure du complexe Asf1/(H3/H4) obtenue par cristallographie et publiée récemment. Nous avons utilisé des outils de modélisation moléculaire et de prédiction de structure pour concevoir *in silico* des séquences peptidiques qui stabilisent la structure secondaire hélicoïdale du fragment C-terminal de l'histone H3 et qui optimisent la longueur de la boucle entre les fragments de H3 et de H4. La mesure de l'affinité pour Asf1 des premiers peptides ainsi conçus montre que nous avons gagné près d'un facteur 20. Ce sont des résultats encourageants qui valident notre approche.

Néanmoins ils soulèvent des questions car nous ne comprenons pas complètement les bases moléculaires expliquant pourquoi seules deux combinaisons de boucles et d'hélices H3 ont une meilleure affinité pour Asf1. Pour pouvoir généraliser notre méthode de design il est essentiel de rationaliser ces premiers résultats. Pour cela, nous pouvons tout d'abord vérifier par RMN que les mutations prédites par le logiciel AGADIR pour stabiliser l'hélice H3 les stabilisent effectivement en absence de Asf1. Nous chercherons également à résoudre la structure des complexes avec ces deux peptides par cristallographie ou RMN. Nous pourrons ainsi savoir si notre hypothèse de répulsion électrostatique entre E125 et la boucle E₄₉SEE₅₂ de Asf1 est vérifiée.

Il serait également intéressant de mesurer la concentration des deux meilleurs peptides qui dissocient *in vitro* le complexe Asf1/(H3/H4) et de mesurer l'affinité de Asf1 pour les histones H3/H4 entières car cette information n'est pas encore connue. Néanmoins on peut s'attendre à ce que *in vivo*, l'affinité apparente du complexe Asf1/(H3/H4) soit encore plus

forte qu'*in vitro* car ce complexe n'est pas seul mais fait probablement partie de différents complexes de plus haut poids moléculaires dont les partenaires ne sont pas encore tous identifiés. C'est pourquoi la mesure de la quantité de peptide nécessaire pour dissocier un complexe Asf1/H3/H4 immuno-purifié à partir de cellules Hela nous semble un bon test pour évaluer leur efficacité potentielle. L'étape suivante sera de mesurer l'effet de ces peptides sur le cycle cellulaire et sur la résistance aux agents génotoxiques après leur introduction du peptide dans des cellules.

Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons résolu la structure de Asf1 en interaction avec l'hélice C-terminale de l'histone H3. Nous avons montré que l'interface entre Asf1 et l'histone H3 est constituée d'un enchevêtrement de résidus hydrophobes conservés au cours de l'évolution, qui contribue à la spécificité de l'interaction entre les deux partenaires. Cette interaction est stabilisée par un réseau de pont-salins qui pourrait également participer à l'orientation des deux protéines l'une par rapport à l'autre. Ces données montrent que le mode d'action des chaperons d'histones ne se fait pas, comme il était communément admis auparavant, via des interactions non spécifiques visant la neutralisation des charges positives des histones. Grâce à la structure du complexe, nous avons pu déterminer la stoechiométrie du complexe. Nous avons montré, tout comme les équipes de J. Tyler et T. Senda, que non seulement la protéine Asf1 interagit avec le dimère d'histones (H3/H4) mais qu'elle empêche la formation du tétramère (H3/H4)₂. Ce résultat pose de nombreuses questions quant au mode d'assemblage des histones avec l'ADN par Asf1.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'assemblage des histones avec l'ADN par Asf1, nous avons mis au point un test de reconstitution de nucléosomes par Asf1 sur des mini-cercles d'ADN. Les premiers résultats montrent que dans des conditions salines physiologiques, Asf1 assemble les histones (H3/H4) sur l'ADN pour former des tétrasomes. En revanche, en présence des quatre histones H3, H4, H2A et H2B aucun nucléosome n'est formé et un complexe de composition encore indéterminée est observé. Il serait particulièrement intéressant de déterminer la composition de ce complexe. En particulier de savoir si Asf1 reste associé au complexe histone/ADN et empêche l'assemblage de H2A/H2B. Si tel est le cas, Asf1 pourrait bloquer l'assemblage trop précoce des histones (H2A/H2B). Nous pouvons alors imaginer que cette interaction mette en jeu la liaison du brin C-terminal de l'histone H4 avec le brin C-terminal d'Asf1. En effet cette région est accessible dans le tétrasome. Nous pourrions tester cette hypothèse en utilisant un mutant qui abroge l'interaction d'Asf1 avec le brin C-terminal de l'histone H4.

Nous avons également cherché à savoir si Asf1 peut assembler une forme pontée des histones H3/H4 qui bloque la forme tétramérique (H3/H4)₂. Les premiers résultats qui méritent d'être confirmés semblent indiquer que ces histones pontées ne peuvent pas être assemblées par le chaperon d'histones alors qu'elles sont correctement assemblées par un gradient de sel. Ce résultat suggère que le mode d'assemblage des histones sur l'ADN par le

chaperon d'histone Asf1 est différent du mécanisme qui fait intervenir des interactions non spécifiques avec des molécules polyanioniques ou un gradient de sel. Ainsi il est fort probable qu'*in vivo* les chaperons d'histones favorisent l'assemblage du nucléosome par des mécanismes spécifiques. Notons cependant qu'*in vivo*, Asf1 n'assemble probablement tout seul les histones sur l'ADN. Il est associé à d'autres chaperons d'histone comme HirA ou CAF-1. La récente purification de complexes de pré déposition des histones (Tagami et al., 2004) a montré que le complexe associé aux histones nouvellement synthétisées comprend non seulement les chaperons connus comme Asf1, HirA ou CAF-1 mais aussi d'autres facteurs encore très peu étudiés. Afin d'aller plus loin dans la compréhension mécanistique des processus d'assemblage du nucléosome, il serait donc intéressant d'inclure dans notre test les chaperons d'histones HirA ou CAF-1 seules ou avec Asf1, les différents composants du complexe de pré déposition des histones nouvellement synthétisées et pourquoi pas d'autres partenaires connus d'Asf1. Afin de comprendre dans le détail ces mécanismes d'assemblages, il serait également essentiel de connaître la structure de ces complexes multiprotéiques qui comprennent entre autres Asf1, HirA ou CAF et les histones.

Il est cependant clair que l'assemblage d'histones autour de mini-cercles d'ADN ne pourra pas mimer la complexité et la dynamique des mécanismes associés à l'assemblage des histones couplé à la réplication. Le réplisome comprend de nombreux acteurs et, nous l'avons vu, Asf1 et CAF-1 en font partie. Plusieurs interactions ont été mises en évidence entre Asf1, CAF-1 et des partenaires situés au cœur du réplisome comme RFC, MCM ou encore PCNA. Il serait maintenant très intéressant de connaître le mode d'interaction de ces partenaires. Ces informations structuralesapporteraient des éléments essentiels pour la compréhension du mécanisme complexe de progression des fourches de réplication dans le contexte de la chromatine.

Nous avons également cherché à observer *in vitro* le désassemblage du tétrasome ou du nucléosome par Asf1 mais sans succès. Nous pouvons imaginer que Asf1 ne peut dissocier qu'un tétrasome ou un nucléosome préalablement déstabilisé. Les résultats phénotypiques que nous avons obtenus avec les mutants de la lysine K56 en glutamine suggèrent que l'acétylation de K56 déstabilise le nucléosome en perturbant un des points de contact avec l'ADN. Il serait intéressant de tester si Asf1 est capable de dissocier le mutant (H3K56Q/H4) assemblé sur des mini-cercles. Il est également probable que le désassemblage du

nucléosome assisté par Asf1 observé *in vivo* lors de la transcription de gènes fasse également intervenir d'autres chaperons d'histones. Nous pourrions imaginer ajouter dans notre test de désassemblage, des extraits de levures qui pourraient contenir les composants nécessaires pour ce désassemblage. Puis nous pourrions chercher à déterminer les composants minimaux qui suffisent pour permettre le désassemblage.

Les informations structurales à haute résolution concernant le complexe Asf1/Histone nous ont également permis de concevoir des mutants spécifiques de cette interaction. L'analyse *in vivo* des phénotypes de ces mutants a montré que le rôle central de l'interaction entre Asf1 et les histones pour le bon déroulement de la phase de synthèse de l'ADN, la phase S et pour la résistance des cellules aux stress génotoxiques. Cette fonction centrale fait de ce complexe une cible de choix pour la conception de nouveaux agents anti-tumoraux. A partir de la structure du complexe Asf1/Histones, nous avons conçu une stratégie de design de peptides inhibiteurs de cette interaction aliant une approche *in silico* et *in vitro*. Nous avons conçu un peptide chimère comprenant les épitopes de liaison des histones H3 et H4 avec Asf1 ayant une affinité vingt fois supérieure à la seule hélice C-terminale de l'histone H3. Les premiers résultats de l'étude structurale du mode d'interaction de Rad53 avec Asf1 menée par A. Lautrette et K. Seeger au laboratoire montrent que la position de l'épitope de liaison de Rad53 avec Asf1 est très proche de celui de l'histone H4. Une extension du peptide inhibiteur avec l'épitope de Rad53 par notre stratégie de design pourrait augmenter encore son affinité pour Asf1 et donc son pouvoir inhibiteur. Nous pourrions alors tester les propriétés d'inhibition de la prolifération et de sensibilisation des cellules aux stress génotoxiques de ces molécules sur des cellules cancéreuses.

Chapitre 7 : Matériels et méthodes

1. Méthodologie d'obtention des protéines recombinantes

1.1. Introduction

L'obtention de la protéine Asf1 et du peptide H3(122-135) a nécessité un travail préparatoire de biologie moléculaire et de biochimie avant d'envisager l'étude structurale. Ce travail se décompose en plusieurs étapes : (i) le clonage du gène codant la protéine et son insertion dans un vecteur, (ii) l'expression de la protéine recombinante dans un milieu LB ou isotopiquement marquée selon les besoins de l'étude, (iii) la purification de la protéine recombinante. L'expression et la purification de *hAsf1A* et de H3 (122-135) ont été réalisées à partir de gènes clonés respectivement par F. Mousson et moi-même dans le vecteur d'expression pETM30. Figure 7-1 représente la carte du vecteur petM30 contenant le gène codant la protéine *hAsf1A* 1-156 pour exemple.

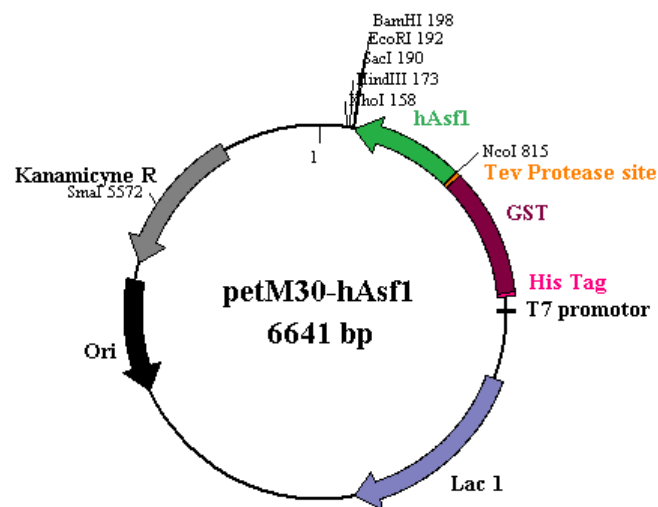


Figure 7-1 : Carte du vecteur petM30 contenant le gène codant pour *hAsf1A* 1-156 inséré entre les sites *NcoI* et *BamHI*.

Le vecteur petM30 contient i) un gène de résistance à la kanamycine, antibiotique qui permet de sélectionner les bactéries porteuse du vecteur d'expression, ii) une origine de réplication indiquant à la bactérie qu'elle doit répliquer cet ADN au cours de la division cellulaire, iii) un promoteur du phage T7 (lacUV5) qui permet l'expression de la protéine, iv) le gène codant la Glutathion S-Transférase (GST) étiqueté 6 histidines à son extrémité N-terminale, v) un site de clivage à la protéase TEV et enfin , vi) plusieurs sites de coupures qui permettent d'introduire le gène codant pour la protéine cible. Le vecteur petM30 permet

l'expression de la protéine (ou du domaine) cible associée à la protéine de fusion Glutathion S-Tranférase et étiqueté 6 histidines, ce qui simplifie considérablement le protocole de purification et augmente la solubilité de la protéine exprimée.

Cette partie regroupe les méthodologies et matériels utilisés au cours de cette thèse pour réaliser les différentes études structurales et fonctionnelles.

1.2. Expression, purification et marquage des protéines recombinantes

Le vecteur d'expression contenant le gène codant de la protéine ou du domaine à exprimer est introduit dans les bactéries *E. Coli* BL21 Gold DE3 par choc thermique à 42°C. Les bactéries sont étalées sur un milieu de culture LB solide contenant de la kanamycine (50µg/mL) afin d'isoler les colonies résistantes. Cette sélection se fait grâce au gène de résistance à la kanamycine permettant de sélectionner uniquement les bactéries possédant le vecteur d'expression. Les étapes de cultures et purification peuvent alors être effectuées.

1.2.1. Culture

Pour une protéine non marquée, la culture des bactéries se fait en milieu riche empirique (milieu LB). Les cultures se font à 37°C et à 200rpm. La surexpression de la protéine de fusion est induite par ajout d'IPTG. Quatre heures après l'induction, les bactéries sont centrifugées (5000rpm pendant 10minutes) et le culot est repris dans un tampon favorisant la lyse : Tris 50mM pH8, NaCl 500mM, EDTA 1mM, glycérol 5%, Triton 1% (v/v), PMSF 1mM, DTT 1mM, aprotinine 6µg/mL. Le culot est congelé rapidement dans l'azote liquide puis décongelé avec ajout de lysozyme (0,5 mg/mL), enzyme qui décompose la couche de glucides qui protège la membrane externe de la bactérie, ce qui permet au détergent contenu dans le tampon de solubiliser la paroi des bactéries. Les débris cellulaires et l'ADN génomique sont détruits par un traitement aux ultrasons. Une centrifugation (10000 rpm pendant 30 minutes) permet de séparer les corps d'inclusion et les débris cellulaires de la protéine recombinante se trouvant dans le surnageant.

L'expression de la protéine en milieu marqué est réalisée de la même façon en remplaçant le milieu LB par du milieu minimum M9 supplémenté en oligo-éléments, en vitamines (biotine et thiamine), en glucose, en sulfate d'ammonium marqué ¹⁵N (Eurisotop). Pour un double marquage ¹³C-¹⁵N, le carbone ¹²C apporté par le glucose est remplacé par du glucose marqué au ¹³C.

1.2.2. Purification

Trois étapes de purification sont nécessaires pour obtenir une protéine suffisamment pure pour une étude structurale par RMN.

a) Purification sur billes d'agarose-glutathion

La protéine cible est exprimée en fusion avec la protéine Glutathion S-Transférase (GST) permettant une augmentation de la solubilité et de la stabilité de la protéine cible. Cette première étape de purification schématisée sur la **Figure 7-2** permet d'isoler la protéine de fusion en utilisant une colonne d'affinité.

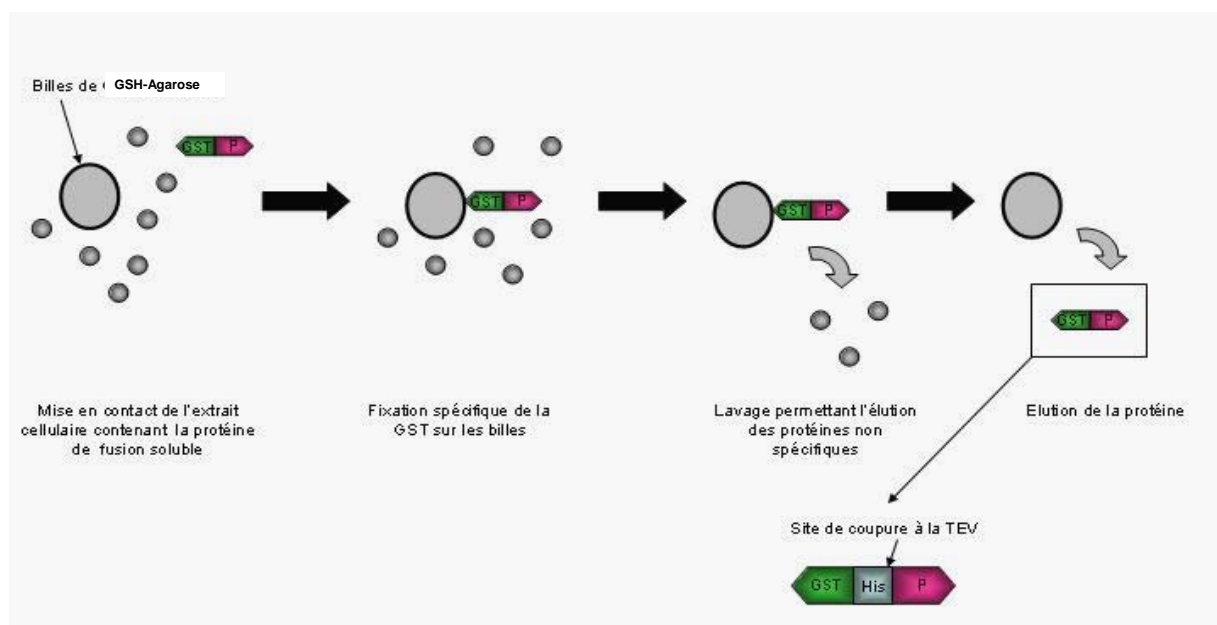


Figure 7-2 : Représentation schématique de la technique de purification sur billes GSH-Agarose.

Les billes de GSH-Agarose sont représentées en gris clair, la protéine en rose, le tag 6 Histidine en bleu, la protéine GST en vert et les protéines non spécifiques en gris foncé.

La fraction soluble est injectée sur une colonne de billes d'agarose couplées au glutathion réduit (GSH) (Colonne GSTtrap de 20mL, Amersham). 1mg de bille fixe environ 10mg de protéine de fusion. La colonne est préalablement équilibrée avec 3 volumes de colonne de tampon de lyse (Tris 50mM pH8, NaCl 500mM, EDTA 1mM, glycérol 5%, Triton 1% (v/v), PMSF 1mM, DTT 1mM, aprotinine 6µg/mL). La colonne est ensuite lavée avec plusieurs volumes de tampon Tris 50mM pH8 puis NaCl 1M pour éliminer les protéines bactériennes et contaminantes qui se lient de façon non spécifique à la colonne. La protéine est éluée avec du tampon Tris 50mM pH 8 contenant 10mM de glutathion réduit. Les différentes étapes

sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE. A titre d'exemple, les résultats d'une purification GSH-Agarose sont présentés sur la Figure 7-3.

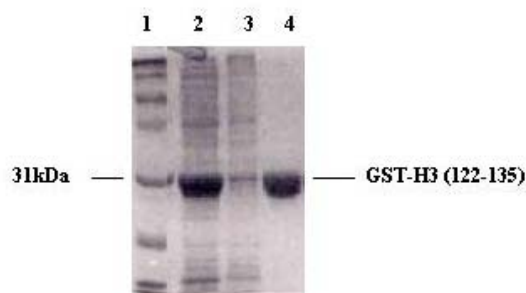


Figure 7-3 :

Gel SDS-PAGE de 12% de la purification par chromatographie d'affinité GSH-Agarose du peptide de fusion GST-H3 (122-135). Puits 1, marqueur de poids moléculaire ; 2, surnageant contenant la protéine soluble avant passage sur colonne de glutathion ; 3, Surnageant après passage sur colonne de glutathion ; 4, Elution du peptide de fusion au GSH.

Une coupure par la protéase Tev permet de séparer la protéine cible de la GST. Le gène de protéase Tev étiqueté 6 histidines a été donné par G. Stiers de l'EMBL, la purification de cette protéase a été mise au point au laboratoire. La protéase Tev est introduite directement dans l'éluât dans un rapport de 1%(w/w) protéase/protéine de fusion. L'incubation est de 12 heures à température ambiante. Une électrophorèse SDS-PAGE permet de contrôler la totalité de la coupure illustré sur la **Figure 7-4**.

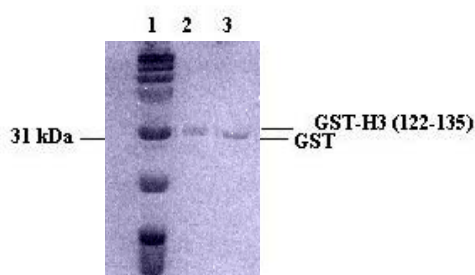


Figure 7-4 :

Gel SDS-PAGE de 12% du peptide H3 (122-135) avant et après coupure par la protéase Tev. Puits 1, marqueurs de poids moléculaires ; 2, GST-H3 (122-135) avant coupure par la protéase Tev ; 3, GST-H3 (122-135) après coupure à la protéase Tev. La faible différence de migration entre les deux bandes atteste de la coupure à la protéase Tev.

b) Purification Ni-NTA

Cette étape de purification, schématisée Figure 7-5, permet de séparer la protéine de la GST et de la protéase Tev. La GST et la protéase Tev ont toutes deux un tag 6-Histidines qui présente une forte affinité pour le Nickel.

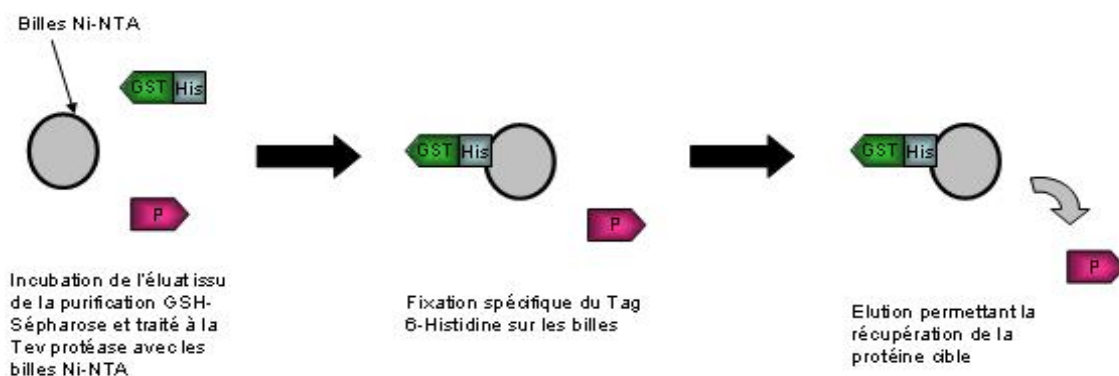


Figure 7-5 :

Représentation schématique de la technique de purification Ni-NTA. Les billes d'agarose Ni-NTA sont représentées en gris clair, la protéine de fusion en rose, le tag 6-Histidine en bleu et la GST en vert.

Les billes Ni-NTA (*Nickel-Nitrilo triacetic acid*, Qiagen) sont préalablement équilibrées avec du tampon Tris 50mM pH8, NaCl 300mM, imidazole 10mM. L'éluat traité à la Tev est incubé avec les billes Ni-NTA pendant 1 heure à 4°C sous agitation. Les protéines non retenues sur la colonne sont collectées dans 3 fractions. Elles contiennent les protéines d'intérêt (*hAsf1A* ou H3 (122-135)). La Tev ainsi que la GST sont retenues sur la colonne par leur tag 6-Histidines.

c) Purification par HPLC préparative

Cette étape de purification permet de supprimer les protéases résiduelles qui peuvent dégrader la protéine pendant le temps des expériences RMN (plusieurs jours à 30°C).

➤ *hAsf1* (1-156)

Une colonne échangeuse d'ion a été choisie pour purifier *hAsf1* (1-156). Cette méthode non dénaturante est bien adaptée aux protéines. Le choix de la charge de la résine s'effectue en fonction du point isoélectrique de la protéine. *hAsf1* (1-156) étant fortement chargée négativement, une colonne échangeuse d'anions (Colonne Resource Q, Amersham) a été utilisée. L'élution a été obtenue par gradient de sel et a été suivie par détection de la densité

optique à 280nm (absorption des résidus aromatiques et plus particulièrement des tryptophanes).

➤ H3 (122-135)

Une colonne RPC (Reverse Phase Chromatographie) a été choisie pour purifier le peptide H3 (122-135). Ce type de chromatographie est bien adapté à la séparation des polypeptides de faible poids moléculaire. La rétention du peptide se fait par interaction hydrophobe, l'élution est obtenue par un gradient de solvant hydrophobe, l'acétonitrile. Un acide fort, l'acide trifluoroacétique (TFA, 0,1%) est ajouté aux solvants (eau et acétonitrile) pour tamponner les milieux et augmenter la solubilité du peptide. Le peptide est ensuite lyophilisé et solubilisé dans de l'eau à la concentration nécessaire pour l'étude RMN.

2. Mesure de l'affinité pour Asf1 des peptides inhibiteurs de l'interaction Asf1-histones par microcalorimétrie (ITC-Isothermal Titration Calorimetry)

Nous avons mesuré l'affinité pour Asf1 des peptides inhibiteurs conçus par bioinformatique par microcalorimétrie ou ITC. La microcalorimétrie est une technique qui permet de mesurer les constantes thermodynamiques associées à la formation d'un complexe protéique. Cette technique se base sur la mesure de la quantité d'énergie fournie ou dégagée par une interaction protéine-protéine. Une expérience complète de microcalorimétrie consiste à réaliser des injections systématiques du ligand dans une solution contenant la protéine. A chaque injection est mesuré le différentiel d'énergie ce qui permet de déterminer la constante d'affinité (K_a), l'enthalpie (ΔH), l'entropie (ΔS) et l'énergie libre (ΔG) de l'interaction ainsi que la stœchiométrie du complexe.

Les expériences ont été réalisées dans du tampon Tris 50mM pH 7,4. Les tampons dans lesquels sont solubilisés la protéine *hAsf1A* et le peptide inhibiteur sont strictement identiques car une simple variation de pH entre les deux échantillons entraîne des échanges de protons pouvant fausser les mesures d'énergie. La concentration des peptides inhibiteurs est de 0.5mM et celle de la protéine *hAsf1* est de 0.03mM. Préalablement, les échantillons sont dégazés car la présence de bulle d'air modifie la ligne de base. Chaque expérience se compose de 45 injections de 6 μ L de peptides dans l'échantillon contenant *hAsf1* à 30°C.

3. Méthodologie utilisée pour l'étude des fonctions d'hAsf1A

L'étude des fonctions d'assemblage et de désassemblage des nucléosomes par *hAsf1A* a été réalisée sur des mini-cercles d'ADN marqués au ^{32}P . Les différents complexes protéines/ADN sont séparés par électrophorèse puis révélés sur film radiosensible. Cette partie détaille l'ensemble des étapes nécessaires à cette étude.

3.1. Préparation des mini-cercles d'ADN marqué au ^{32}P (Prunell et al., 1999)

Les mini-cercles d'ADN sont préparés à partir du fragment de 359 paires de bases provenant de l'ADN ribosomal 5S de *L. variegatus* (Sivolob, et al., 2003). Ce fragment d'ADN (359-5S) a la particularité de contenir une séquence positionnante pour les nucléosomes. La préparation des mini-cercles se décompose en trois étapes i) le marquage au ^{32}P du fragment linéaire d'ADN déphosphorylé en 5', ii) la circularisation du fragment linéaire d'ADN pour obtenir des mini-cercles d'ADN puis iii) la purification des mini-cercles d'ADN

3.1.1. Marquage au ^{32}P

Le marquage au ^{32}P est réalisé par incubation de 2pmol de fragment 359-5S déphosphorylé pendant 1h30 à 37°C en présence de 1.5 μL d'ATP γ ^{32}P (3000Ci/mmol, 10mCi/mL, Amersham) et 5 Unités de T4 polynucléotides kinase (10U/ μL , NEB) dans un volume final de 5 μL . Les enzymes et l'ATP γ ^{32}P sont ensuite éliminés sur des minicolonnes de chromatographie d'exclusion. Ces minicolonnes sont préparées en centrifugeant du séphadex G50 (Sigma) hydraté avec du tampon TE (5 minutes, 1300-1500g). Le produit de marquage est dilué 20 fois dans du tampon TE puis déposé sur 1mL de minicolonne G50. Après centrifugation (5 minutes, 1300-1500g), l'éluât est déposé sur une seconde minicolonne G50 pour éliminer la totalité de l'ATP γ ^{32}P n'ayant pas réagi avec l'ADN. Environ 3-4.10⁶ ^{32}P cpm sont obtenu dans un volume de 60 à 70 μL .

3.1.2. Circularisation

La circularisation du fragment d'ADN marqué permet d'obtenir des mini-cercles d'ADN marqués contenant un nombre précis de surenroulement c'est à dire un topoisomère particulier. Différents types de topoisomères peuvent être favorisés par ajout de BET ou de netropsine lors de la réaction de circularisation. En effet, le BET est un intercalant qui permet d'introduire des surenroulements négatifs et la netropsin est oligopeptide non intercalant qui permet d'introduire des surenroulements positifs. Pour nos expériences, nous avons réalisé des topoisomères +1, -1. La composition de la réaction pour obtenir du topoisomère -1 est reportée dans le Tableau 7-1.

	Volume (µL) ou quantité
ADN γ ^{32}P	10^6 cpm
Tampon de réaction 10x	30
BSA (1mg/mL)	30
ATP (10mM)	7
BET (50µg/mL)	1.5
Ligase (1U/mL, Invitrogen)	0.7
Volume final	300

Tableau 7-1 :

Composition de la réaction de circularisation de mini-cercles d'ADN marqué au ^{32}P .

3.1.3. Purification des topoisomères

Lors de la circularisation, il se forme également des topoisomères non désirés. Une étape de séparation et de purification supplémentaire est donc nécessaire. La séparation des différents topoisomères est obtenue par migration de l'échantillon sur un gel de polyacrylamide 4% (19 :1). Un exemple de séparation sur gel polyacrylamide est présenté sur la Figure 7-6 La bande correspondant au topoisomère désiré est ensuite découpé et le topoisomère est extrait du gel polyacrylamide par une élution Maxam-Gilbert (Maxam and Gilbert, 1980).

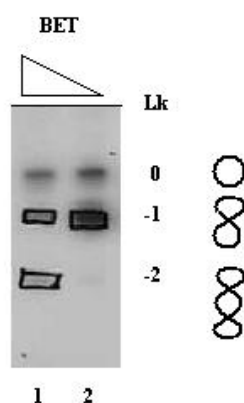


Figure 7-6 :

Gel polyacrylamide 4% (19 :1) de purification des topoisomères issus de la circularisation. Puits 1, topoisomères issus de la circularisation réalisée avec 2.5µL de BET ; Puits 2, topoisomères issus de la circularisation réalisée avec 1.5µL de BET. Lk correspond au surenroulement de l'ADN.

La circularisation et la purification des topoisomères correspondent à l'étape 1 schématisée sur la **Figure 7-7**.

3.2. Méthode de reconstitution de nucléosomes et de tétrasomes : le « salt-jump »

La méthode du « salt-jump », schématisé par l'étape 2 de la **Figure 7-7**, permet de reconstituer *in vitro* des nucléosomes et des tétrasomes sur des mini-cercles d'ADN marqué au ^{32}P . La technique du « salt-jump » consiste à diminuer progressivement la concentration saline pour que les histones et l'ADN interagissent de façon spécifique et forment soit des tétrasomes soit des nucléosomes. En effet, à forte concentration saline, le sel écranter les charges, l'ADN et les histones n'interagissent pas. A faible concentration saline, les histones chargés positivement et l'ADN chargé négativement interagissent. La diminution progressive de la concentration en sel laisse le temps au système de former le complexe spécifique, si la diminution de la concentration en sel se fait trop rapidement, les histones et l'ADN interagissent de manière non spécifique et forment des agrégats. La réaction se fait en présence de plasmides non marqués pour piéger l'excès d'histones et éviter leur agrégation sur les mini-cercles d'ADN marqués.

Dans un premier temps sont mélangés 0.5 μg de plasmide pUC, les histones dans un rapport 0.3 en masse par rapport à la quantité d'ADN pUC, et le topoisomère marqué ^{32}P en quantité suffisante pour avoir 3000 cpm final, ce mélange est à 2M NaCl dans un tampon Tris 50 mM EDTA 1mM (Tampon TE) à pH8. Après une incubation de 10 minutes à 37°C, la solution est diluée quatre fois dans du tampon TE BSA1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à pH8 pour diminuer la concentration de sel à 0.5M. Après une incubation de 15 minutes à 37°C, l'échantillon est dialysé 1h30 contre du tampon TE pH8 pour diminuer progressivement la concentration saline.

L'échantillon est ensuite soit déposé sur gel polyacrylamide (**Figure 7-8**) soit utilisé pour faire les tests de désassemblage par *hAsf1A*.

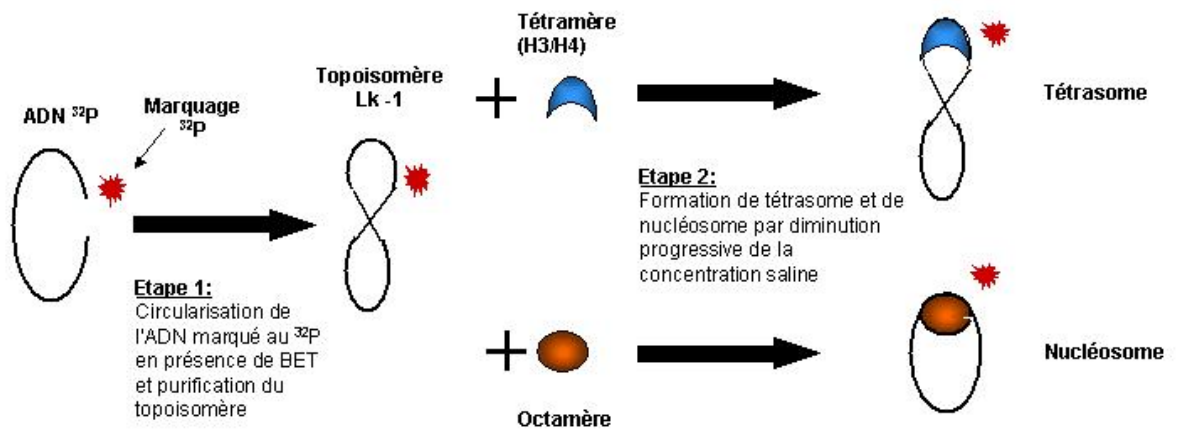


Figure 7-7

Représentation schématique de préparation de tétrasomes et de nucléosomes par la méthode du « Salt-jump ». La double hélice d'ADN est représentée par un trait noir, le marquage au ³²P par une étoile rouge, le tétramère d'histone (H3/H4) en bleu et l'octamère d'histones en orange.

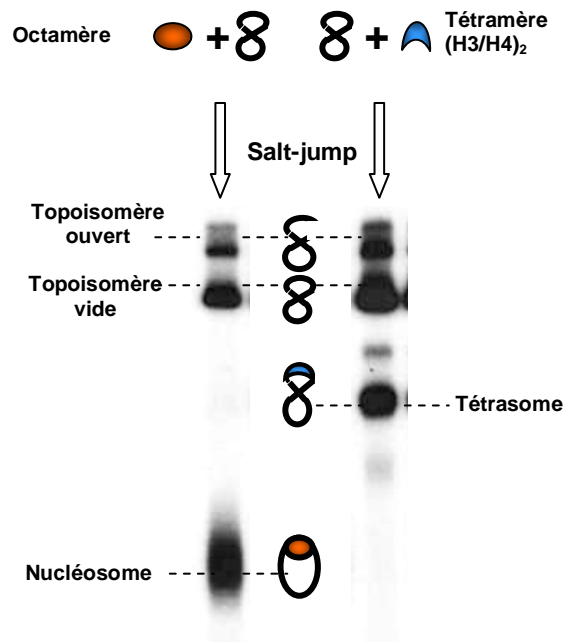


Figure 7-8

Gel polyacrylamide 4% (29 :1) de nucléosomes et de tétrasomes reconstitués par salt-jump à partir respectivement d'octamères d'histones et de tétramère d'histones (H3/H4)₂. La migration se fait à 250V pendant 3h.

3.3. Méthode de désassemblage des nucléosomes et tétrasome par *hAsf1A*

hAsf1A est ajouté à une solution contenant soit des tétrasomes soit des nucléosomes préparés comme ci-dessus (3.2) puis incubé 1h à 37°C dans du tampon TE BSA 100mM NaCl. L'échantillon est déposé sur gel polyacrylamide 4% (29 :1).

3.4. Méthode d'assemblage des nucléosomes et tétrasome par *hAsf1A*

hAsf1A est pré-incubé avec les tétramères d'histones (H3/H4) ou les octamère d'histones 30 minutes à 37°C dans du tampon TE BSA 100mM NaCl. Les topoisomères, préparés comme ci-dessus (3.1), sont ajoutés à la préparation puis incubés 1h à 37°C dans du tampon TE 100mM NaCl.

3.5. Réaction de pontage des tétramères d'histones (H3/H4)₂

Les tétramères d'histones (H3/H4)₂ sont conservés dans un tampon TE contenant du β-mercaptoéthanol et 2M NaCl. Afin d'éliminer le β-mercaptoéthanol et l'EDTA pour augmenter l'efficacité de la réaction de pontage nous avons au préalable dialysé les échantillons contre du tampon Tris 50mM à 2M NaCl pH7,5. Les tétramères (à une concentration finale de environ 0,1 mg/mL) sont traités avec une solution d'ortho-phénanthroline qui favoriser la formation d'une liaison convalente de type pont-disulfure entre les deux histones H3. La réaction est réalisée dans du tampon Tris 50mM, 2M NaCl. Une solution mère d'ortho-phénanthroline concentrée 100 fois est préparée à partir de 150mM de sulfate de cuivre et 500mM d'orthophénanthroline dans un mélange au 4/5^{ème} eau/éthanol. La réaction est incubée 30 min à 37°C puis est arrêtée par ajout d'EDTA 0,5M, en quantité 5 fois supérieure à celle du cuivre.

Publications

Structure of the Histone Chaperone Asf1 Bound to the Histone H3 C-Terminal Helix and Functional Insights

Morgane Agez,¹ Jun Chen,² Raphaël Guerois,¹ Carine van Heijenoort,³ Jean-Yves Thuret,¹ Carl Mann,^{1,2,*} and Françoise Ochsenbein^{1,*}

¹Institut de Biologie et de Technologie de Saclay, Commissariat à l'Énergie Atomique/Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, F. Edward Hébert School of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD 20814, USA

³Institut de Chimie des Substances Naturelles, Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire à Haut Champ, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

*Correspondence: carl.mann@cea.fr (C.M.), francoise.ochsenbein@cea.fr (F.O.)

DOI 10.1016/j.str.2007.01.002

SUMMARY

Asf1 is a histone chaperone that favors histone H3/H4 assembly and disassembly. We solved the structure of the conserved domain of human ASF1A in complex with the C-terminal helix of histone H3 using nuclear magnetic resonance spectroscopy. This structure is fully compatible with an association of ASF1 with the heterodimeric form of histones H3/H4. In our model, ASF1 substitutes for the second H3/H4 heterodimer that is normally found in heterotetrameric H3/H4 complexes. This result constitutes an essential step in the fundamental understanding of the mechanisms of nucleosome assembly by histone chaperones. Point mutations that perturb the Asf1/histone interface were designed from the structure. The decreased binding affinity of the Asf1-H3/H4 complex correlates with decreased levels of H3-K56 acetylation and phenotypic defects *in vivo*.

INTRODUCTION

Histone chaperones are proteins that facilitate the assembly of histones with DNA to form the nucleosome, and they are also implicated in the reverse disassembly of nucleosomes. This terminology was chosen by analogy with other protein chaperones that associate with a protein target to prevent its misfolding or aggregation and favor its proper folding or association with other macromolecules, and then dissociate from the protein or the complex. Histone chaperones show a preferential affinity for either histones H2A/H2B or H3/H4. They are functionally specialized in histone storage, histone targeting to the nucleus, histone buffering in the nucleus, and histone assembly/disassembly in DNA replication-coupled or DNA replication-independent processes (Loyola and Almouzni, 2004).

Asf1 (antisilencing function 1) is a highly conserved histone chaperone found in the nucleus associated with histones H3/H4 (Tyler et al., 1999; Munakata et al., 2000). It has a conserved N-terminal domain of 156 amino acids and a divergent C-terminal sequence that does not appear to be structured and that is dispensable for most Asf1 functions *in vivo* (Daganzo et al., 2003; Umehara et al., 2002; Mousson et al., 2005). It is implicated in nucleosome assembly and disassembly associated with a large number of physiological pathways including gene silencing (Le et al., 1997; Sharp et al., 2001), DNA replication (Mello et al., 2002; Tyler et al., 1999), gene transcription (Adkins et al., 2004; Schwabish and Struhl, 2006), and DNA damage signaling and repair (Emili et al., 2001; Hu et al., 2001). It has also been proposed that Asf1 could prevent the toxic effects associated with the accumulation of free histones in cells after DNA replication blocks (Groth et al., 2005). In yeast, Asf1 is required for the acetylation of histone H3-K56, and this histone modification is necessary for resistance to genotoxic stress (Recht et al., 2006; Masumoto et al., 2005). Consistent with its multiple functions, Asf1 associates with more than seven partners, and these transient interactions could participate in the specific recruitment of Asf1 to different pathways.

Although the functional implication of histone chaperones in numerous physiological pathways is now well established, little structural information is available concerning their binding mode. The high-resolution structures of only three histone chaperones have been solved, including that of human and yeast Asf1 (Daganzo et al., 2003; Dutta et al., 2001; Mousson et al., 2005; Park and Luger, 2006; Padmanabhan et al., 2005), but no high-resolution structure of a histone chaperone interacting with histones is available. In a previous study, using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, we mapped the chemical-shift variations of human ASF1A upon binding of the C-terminal helix of histone H3 and found that the binding surface is composed of a highly conserved hydrophobic groove surrounded by charged residues (Mousson et al., 2005). Mutations of the central exposed hydrophobic residue V94R completely destabilized the Asf1-H3/H4

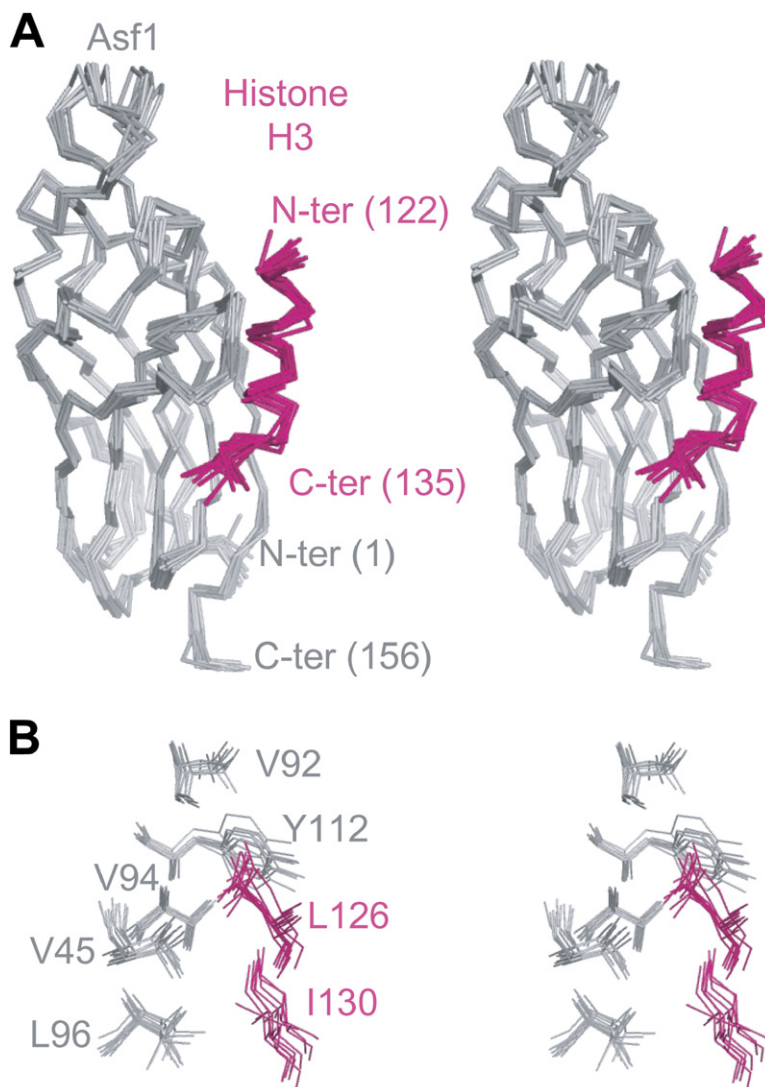


Figure 1. Structure of Asf1a (1–156) in Complex with Histone H3 (122–135)

(A) Stereo view of the superposition of the ten best structures calculated as indicated in the text. Asf1 is colored in gray and the histone peptide is in magenta. N and C termini and the corresponding residue number in the full protein are indicated for both chains.

(B) Stereo view of the superposition of the side chain heavy atoms of hydrophobic residues involved in the interfacial hydrophobic patch. The orientation of the molecule is the same as in (A). Residues of ASF1A are shown in gray and histone H3 is in magenta. Residue numbers of highlighted residues are indicated.

interaction. In vivo, this mutation led to transcriptional silencing defects in yeast, DNA damage sensitivity, and thermosensitive growth, suggesting that histone binding is required for all major functions of Asf1.

An important question remaining is how histone chaperones assemble histones with DNA. In order to provide a more detailed description of the histone binding mode of Asf1, we solved the structure of the complex of the conserved N-terminal Asf1 histone-binding domain with the histone H3 C-terminal peptide using NMR spectroscopy. This structure allowed us to infer a model for the complex between Asf1 and the entire H3/H4 complex. We found that Asf1 likely interacts with the heterodimeric form of the complex, whereas the structure is not compatible with an association with the tetrameric form of histone H3/H4. Rather, Asf1 substitutes for the second H3/H4 dimer and forms a highly specific interface that combines a nicely packed hydrophobic core and an intricate salt-bridge network.

RESULTS

We determined the structure of the conserved core of human ASF1A (amino acids 1–156) in complex with the C-terminal helix of histone H3 (amino acids 122–135) using multidimensional NMR spectroscopy (Figure 1A; Table 1). Complete assignment of resonances of the histone-bound form and the collection of intramolecular nuclear Overhauser effects (NOEs) and 116 filtered NOE contacts provided enough distances to build a high-resolution structure of the complex with a root-mean-square deviation (rmsd) of 0.74 Å for all backbone atoms of the complex (Figure 1A; Table 1). The two last residues of histone H3 are less defined than the helix (2.06 Å backbone rmsd). This is compatible with the increased dynamic of the C-terminal tail as measured by the heteronuclear $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOEs (see Figure S1 in the Supplemental Data available with this article online). The helical histone peptide docks against the highly conserved hydrophobic exposed

Table 1. Structural Statistics for the Structure of the Human ASF1A (1–156)/H3 (122–135) Complex

List of Restraints	
Number of experimental restraints	
Distance restraints from NOEs	
Intramolecular ASF1A	4489
Intramolecular H3	340
Intermolecular	116
Hydrogen bonds	70
Dihedral angle constraints	170
Structural analysis ^a	
Average number of NOE violations greater than 0.5 Å (%)	0.01
Average number of hydrogen bond violations	0
Average number of dihedral violations greater than 5° (%)	0.003
Rmsd from experimental restraints ^a	
NOE distances (Å)	0.022 ± 0.005
Hydrogen bonds	0.05 ± 0.003
Dihedral angles (°)	0.92 ± 0.15
Rmsd from ideal geometry ^{a,b}	
Bond (Å)	0.0061 (± 0.0002)
Angle (°)	0.71 (± 0.02)
Impropers (°)	0.70 (± 0.04)
Rmsd from average structure ^a	
Backbone, second structure (Å)	0.41 (± 0.06)
Heavy atoms, second structure (Å)	0.74 (± 0.07)
Backbone, all residues (Å)	0.73 (± 0.09)
Heavy atoms, all residues (Å)	1.07 (± 0.09)
Procheck analysis ^c	
Residues in most favored region (2388)	80.1%
Residues in additionally allowed region (557)	18.7%
Residues in generously allowed region (23)	0.8%
Residues in most disfavored region (12)	0.4%

^a For the 30 calculated structures.

^b Idealized geometries based on CNS parameters (PARALLHDG) (Brunger et al., 1998).

^c For the 20 deposited structures. The number of residues in the ensemble of 20 structures is indicated in parentheses.

surface of human ASF1A that was previously highlighted by our chemical-shift perturbation analysis (Mousson et al., 2005). The binding interface represents 430 Å² and is quite shallow. It is composed of a well-defined hy-

drophobic clamp surrounded by an extensive network of salt bridges (Figures 1B and 2A). The hydrophobic clamp involves the side chain of two histone H3 residues, L126 and I130, that nicely pack against the exposed hydrophobic residues of ASF1 V45, V92, V94, L96, and Y112 (Figure 1B). These residues are highly conserved in the Asf1 and H3 sequences (Figure S2). The hydrophobic moiety of histone H3-K122 packs against the methyl group of A48 and V92 of ASF1A, whereas its guanidinium group forms a partly buried salt bridge with ASF1A D88. This negatively charged residue is conserved in all sequences of Asf1 and is found buried in the two known structures of the free proteins (human and yeast) (Daganzo et al., 2003; Mousson et al., 2005), although it is not involved in a salt bridge in these forms. The highly conserved residues of ASF1 (D54, E105, R108) and the H3 peptide (R129, R134, along with the C-terminal helix dipole and the C terminus) define an intricate network of salt bridges and hydrogen bonds that stabilize the complex (Figure 2A), with D54/R129, E105/R134, and the R108/H3 helix dipole formed in almost all calculated structures. In summary, histone H3 (122–135) interacts with Asf1 through a well-defined binding interface that combines hydrophobic and electrostatic interactions. All the side chains involved in the interaction are among the most highly conserved residues exposed at the surface of Asf1, in agreement with a conserved ability of Asf1 to bind histones.

The structure of ASF1A is almost unchanged (rmsd of 1.38 Å for backbone atoms) after binding the histone H3 fragment (122–131), and the H3 fragment folds into a helical conformation that is nearly superimposable with helix α_3 observed in the intact H3/H4 complex (Mousson et al., 2005). Based on this result, we derived a model for Asf1 associated with the complete histone H3/H4 complex (Figure 2B) by simply superimposing the region (122–131) of histone H3 complexed to ASF1A with the corresponding helix α_3 of the H3/H4 complex (Harp et al., 2000). Remarkably, no steric clash between backbone atoms is found between ASF1A and the dimeric form of histones H3/H4, and a simple energy minimization of the modeled structure released all clashes between side chains. In contrast, the histone H3 binding interface with ASF1A is not compatible with an association with the tetrameric form of histones H3/H4. Our structural data thus strongly suggest that Asf1 interacts preferentially with the dimeric form of the H3/H4 complex and are consistent with the stoichiometry found for the complex purified from recombinant coexpressed Asf1/H3/H4 (English et al., 2005).

In the structural model of ASF1A in complex with the heterodimeric form of histones H3/H4, the region corresponding to the H3 peptide fragment (122–135) covers 85% of the total surface of interaction buried in the model by the entire histone complex. The remaining 15% of the surface mainly involves H113, C110, and D106 in the α_2 of histone H3. These residues contact Y112, L140, and R145 of ASF1A, which are highly conserved residues at the surface of Asf1 (Figure S2). Remarkably, there is a strong overlap between the surface of H3 that becomes buried upon Asf1 binding and upon binding to a second

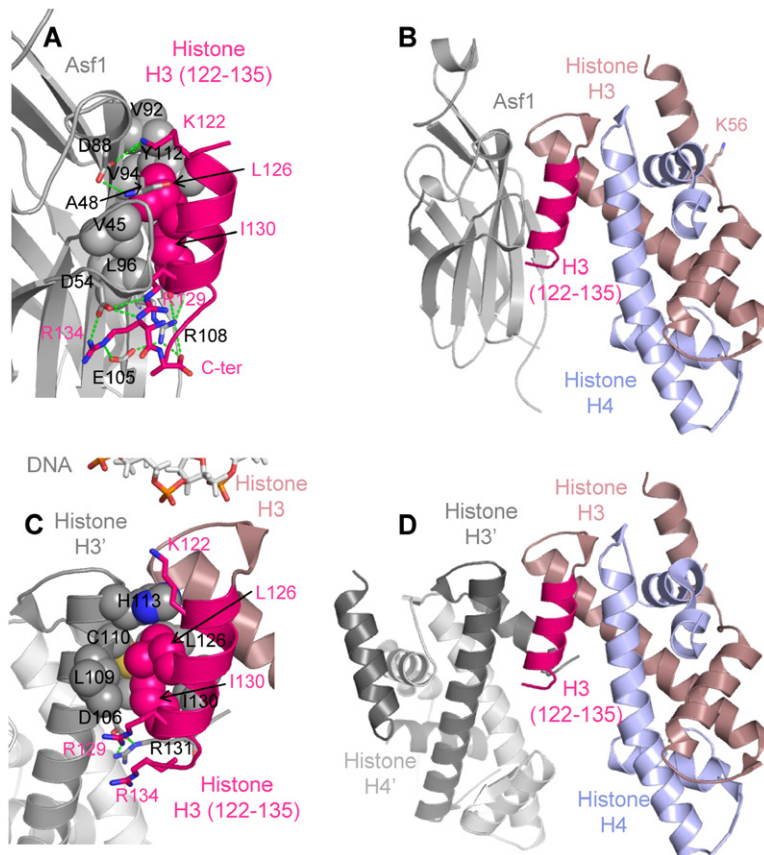


Figure 2. Asf1 Associates with the Heterodimeric Form of the H3/H4 Complex and Takes the Place Normally Occupied by the Second H3/H4 Dimer in Heterotetrameric H3/H4

In all four panels, the orientation of helix α_3 is identical to that of Figure 1.

(A) Close-up view of the complex interface between ASF1A (1–156) and histone H3 (122–135). The side chains of the hydrophobic residues involved in the hydrophobic clamp are represented as spheres and colored by element, with a gray color for carbons of ASF1A residues and a magenta color for carbons of histone H3. The side chains of the charged residues involved in the network of salt bridges and hydrogen bonds are represented as sticks and colored by element, with a gray color for carbons of ASF1A residues and a magenta color for carbons of histone H3. Residue numbers of highlighted residues and the C terminus of histone H3 are indicated by the same color code.

(B) Cartoon representation of the structural model of ASF1A (1–156) in complex with the histone H3/H4 dimer. The region (amino acids 122–135) of histone H3 in the H3/H4 complex (Protein Data Bank [PDB] ID code 1EQZ) (Harp et al., 2000) was superimposed on residues 122–135 of the histone H3 peptide bound to ASF1A. ASF1A is colored in gray, the residues 122–135 of histone H3 are colored in magenta, and the other residues of histone H3 are colored in gray-rose. Histone H4 is colored in light blue. The position of H3-K56 is indicated.

(C) Close-up view of the interface between H3 and H3' in the heterotetramer (PDB ID code 1EQZ) (Harp et al., 2000), with the color code magenta for histone H3 (122–135), gray-rose for other residues of histone H3, dark gray for histone H3', and light gray for histone H4'. Residue numbers of highlighted residues are indicated by the same color code. The side chains of the residues of histone H3 (122–135) involved in the interaction with ASF1A (1–156) are represented as spheres for hydrophobic residues and sticks for charged residues as in (A). They are also colored by element, with a magenta color for carbons. Residues of histone H3' in contact are shown with a gray color for carbons, with spheres for hydrophobic residues and sticks for charged residues.

(D) Cartoon representation of the heterotetrameric complex of histone H3/H4 (PDB ID code 1EQZ) (Harp et al., 2000). The color code is magenta for histone H3 (122–135), gray-rose for the other residues of histone H3, light blue for histone H4, dark gray for histone H3', and light gray for histone H4'.

H3/H4 subunit to form the heterotetrameric H3/H4 complex (Figure 2). In particular, the two histone H3 residues L126 and I130 that participate in the hydrophobic clamp with Asf1 (Figure 2A) also stabilize the four-helix bundle found at the interface between the two H3 molecules in the histone H3/H4 heterotetramer (Figure 2C) (Harp et al., 2000; Luger et al., 1997; White et al., 2001). In summary, the structure of Asf1 with the histone H3 (122–135) fragment is consistent with an association of Asf1 with the heterodimeric form of the H3/H4 complex, but not with the tetrameric form because Asf1 takes the place that would normally be occupied by the second H3/H4 dimer.

In a previous study, we showed that the V94R mutation of ASF1A disrupts its ability to bind the histone H3/H4 complex, whereas the D54R and R108E mutations only destabilize the complex (Mousson et al., 2005). The high-resolution structure of ASF1A in complex with histones H3/H4 now provides a structural basis for understanding the effect of such mutations. Residue V94 of

Asf1 is located at the center of the hydrophobic clamp and is in close contact with L126 and I130 of histone H3. Its mutation into a bulky positively charged arginine residue (V94R) generates steric clashes and electrostatic repulsions so that the complex is strongly destabilized. Residues D54 and R108 of ASF1A are located at the edge of the binding surface and are involved in the network of salt bridges with histone H3. D54 makes a salt bridge with R129, and R108 caps the C terminus of helix α_3 . The mutation of D54 and R108 into oppositely charged residues perturbs the formation of the salt bridges, but the corresponding side chains may adopt alternative conformations to prevent steric clashes leading to only minor complex destabilization. Nevertheless, the D54R+R108E double mutant has greater phenotypic defects, consistent with an important stabilizing role for these salt bridges.

We used the high-resolution structural model of Asf1 in complex with histones H3/H4 for the rational design of H3 point mutations likely to perturb its interaction with Asf1 without perturbing the structure of the dimeric and

tetrameric forms of the histone H3/H4 complex and the nucleosome particle (Figures 2A and 2C). We then tested the phenotype of such mutants as the sole histone H3 source in *Saccharomyces cerevisiae*. Residues D106, C110, H113, L126, and I130 of H3 hydrophobically interact with Asf1, but cannot be mutated without perturbing the H3/H4 heterotetrameric interface (Figure 2C). Residue K122 points toward the DNA, and its mutation is expected to perturb the interaction with DNA (Figure 2C). Indeed, the H3-K122E mutant is inviable (data not shown). In contrast, R129 and R134 are involved in salt bridges with Asf1, but are not involved in salt bridges in any of the available nucleosome structures (Harp et al., 2000; Luger et al., 1997; White et al., 2001). Accordingly, the mutation of these residues should not affect the structure of the H3/H4 dimer, the H3/H4 tetramer, or the nucleosome. The H3-R134E mutant is viable and has no detectable phenotype (data not shown), indicating that the Asf1-H3/H4 binding surface can accommodate this particular mutation. This result is consistent with the elevated mobility observed for this residue in the NMR structure.

Interestingly, the H3-R129E mutant is viable, but, like the *asf1*Δ mutant, it has a slow-growth phenotype and is hypersensitive to hydroxyurea (HU), an inhibitor of ribonucleotide reductase that induces replicative stress by reducing dNTP pools (Figure 3A). However, unlike the *asf1*Δ mutant, the H3-R129E mutant is relatively resistant to treatment with camptothecin (CPT), an inhibitor of DNA topoisomerase I, and to the methylating agent methyl methane sulfonate (MMS). Asf1 was previously shown to be required for the acetylation of H3-K56, and this acetylation is important in the resistance of yeast to genotoxic stress (Recht et al., 2006; Masumoto et al., 2005). Some mutations within the H3 binding surface of Asf1 were shown to have lower levels of H3-K56 acetylation, but the H3 binding affinity of these mutants was not determined (Recht et al., 2006). We thus extended this characterization to our Asf1 mutants whose affinity for binding the H3/H4 complex had been determined (Mousson et al., 2005). An excellent correlation is seen for these mutants in the degree to which they were defective in binding the H3/H4 complex in vitro, and the defect in the acetylation of H3-K56 in the corresponding mutant yeast cells. The Asf1-V94R mutant is totally defective in binding H3/H4 in vitro, and we observed a loss of H3-K56 acetylation in the *asf1-V94R* mutant cells that is similar to that observed in an *asf1*Δ mutant (Figure 3B). In contrast, the Asf1-D54R and Asf1-R108E mutants were only partially defective in binding H3/H4 in vitro, and the corresponding mutant cells are only partially defective in H3-K56 acetylation. Finally, the *asf1-D54R+R108E* double mutant has phenotypic defects that are greater than either single mutant, but less than the *asf1-V94R* mutant, and, accordingly, *asf1-D54R+R108E* mutant cells have residual H3-K56 acetylation that is intermediate between the *asf1-V94R* and *asf1-D54R* or *asf1-R108E* mutant cells. The level of H3-K56 acetylation thus appears to be a remarkable in vivo metric for the affinity of Asf1 for the histone H3/H4 complex.

We next characterized the level of H3-K56 acetylation associated with the H3-R129E and H3-R134E mutants. The H3-R134E mutant has a level of H3-K56 acetylation that is similar to the wild-type, which is consistent with its absence of phenotypic defects (data not shown). In contrast, the H3-R129E mutant has lower H3-K56 acetylation than the wild-type (Figure 3B). This result strongly suggests that the H3-R129E mutation reduces the affinity of the mutant for Asf1, but does not abolish the interaction. The decreased affinity of the H3-R129E mutant for Asf1 was confirmed by coimmunoprecipitation experiments. H3-R129E and H4 were not found associated with Asf1-myc immunoprecipitated from yeast extracts under conditions in which the wild-type H3 and H4 were readily observed (Figure 3C). The absence of H3-R129E in the Asf1-myc immunoprecipitates indicates that it is a more stringent assay for Asf1-H3/H4 interaction, and thus less sensitive to the detection of partially functional mutants compared to the H3-K56 acetylation assay. The decreased H3-K56 acetylation of H3-R129E may contribute to the slow growth and HU sensitivity of the H3-R129E mutant yeast cells. Indeed, the H3-K56Q mutant mimics a K56-acetylated H3, and expression of this mutant in place of the wild-type H3 was shown to partially suppress the growth and HU sensitivity of an *asf1*Δ mutant (Recht et al., 2006). The relative resistance of the H3-R129E cells to CPT and MMS may be due to the residual H3-K56 acetylation of this mutant. A nonacetylatable H3-K56R mutant is sensitive to HU, CPT, and MMS (Masumoto et al., 2005), but suppression of the CPT and MMS sensitivity of the *asf1*Δ mutant by H3-K56Q has not been reported. We transformed an *asf1*Δ mutant with a centromeric plasmid expressing the H3-K56Q mutant from the endogenous *HHT2* promoter. Remarkably, the expression of one copy of H3-K56Q in the *asf1*Δ mutant significantly suppresses its sensitivity to CPT and MMS in addition to its HU sensitivity (Figure 3D). No effect was seen upon expression of an extra copy of wild-type H3 or an H3-K56R mutant that mimics a nonacetylated form of histone H3. Taken together, these results suggest that the residual H3-K56 acetylation of the H3-R129E mutant is sufficient to provide resistance to CPT and MMS. The HU sensitivity of H3-R129E may reflect the need for a greater level of H3-K56 acetylation in the cellular response to HU, or the need for a high-affinity interaction of Asf1 with H3 for reasons other than K56 acetylation. It is also possible that the R129E mutation affects the interaction of H3 with an additional partner.

DISCUSSION

Several studies have shown that a heterotetramer of histones H3/H4 is the most stable form of the complex at physiological buffer conditions. Furthermore, hybrid density experiments in mammalian tissue culture cells have indicated that nucleosomal tetrameric H3/H4 is rarely dissociated into H3/H4 heterodimers (Annunziato, 2005). It was thus surprising that histone H3/H4 predeposition complexes purified from HeLa cells were shown to contain

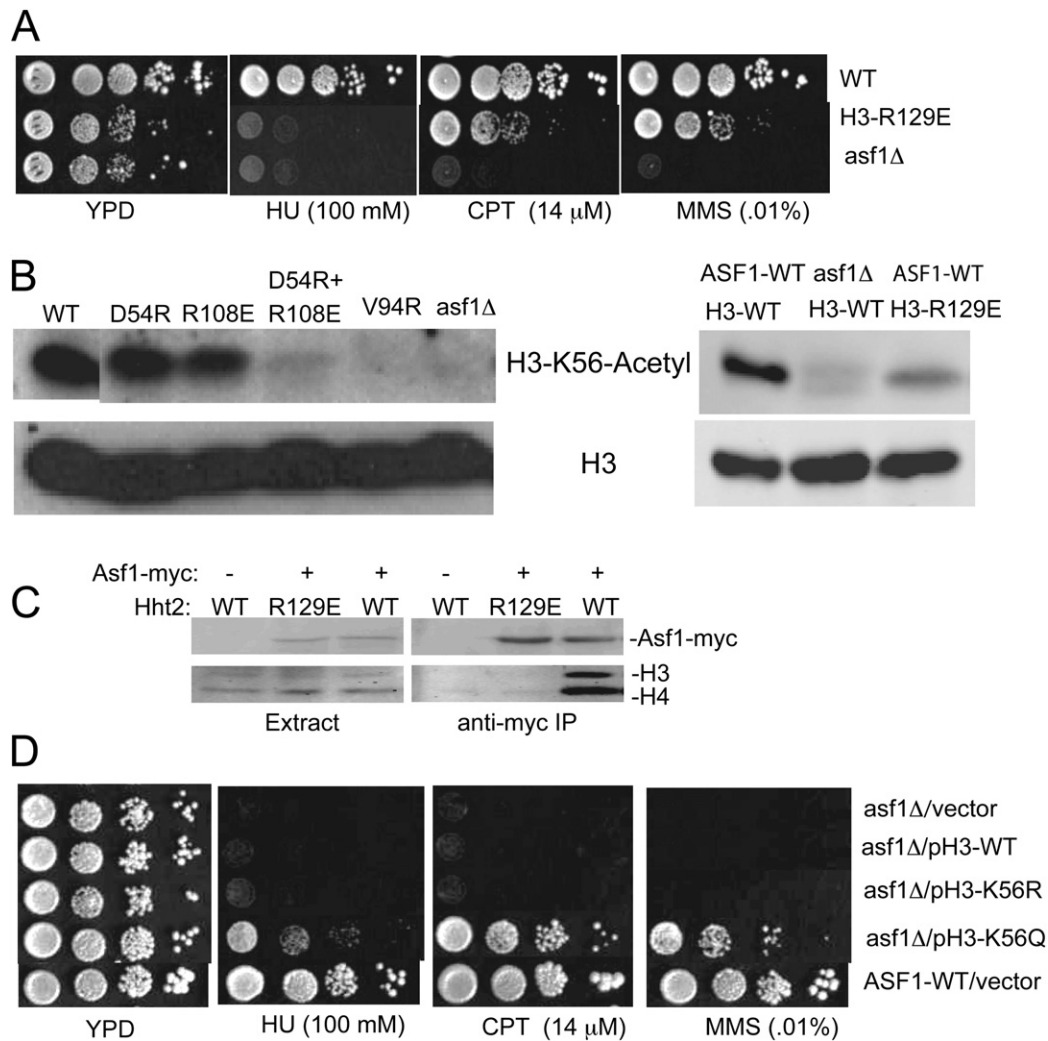


Figure 3. Phenotype of the Histone H3-R129E Mutant, H3-K56 Acetylation in *asf1* and H3 Mutant Cells, Lack of Coimmunoprecipitation of H3-R129E and Asf1-Myc, and Suppression of the Sensitivity of the *asf1*Δ Mutant to Genotoxic Stress by Expression of H3-K56Q

(A) The H3-R129E (*hht2-R129E*) mutant yeast strain is sensitive to 100 mM hydroxyurea (HU), but not to 14 μM camptothecin (CPT) or 0.01% methyl methane sulfonate (MMS). Yeast strains grown to early stationary phase in a yeast extract-peptone-dextrose (YPD) broth were spotted in 10-fold dilutions on the indicated media and incubated for 4 days at 30°C.

(B) The level of H3-K56 acetylation in whole-cell protein extracts prepared from the indicated wild-type and mutant yeast strains was determined by immunoblotting with anti-H3-K56-acetyl antibodies (Upstate Biotechnology). The level of total histone H3 protein in the same extracts was assayed with an antibody directed against H3 residues 100–135 (Abcam, 1791). The left panel compares the wild-type and the indicated *asf1* mutants, whereas the right panel compares the wild-type, the *asf1*Δ mutant, and the H3-R129E (*hht2-R129E*) mutant.

(C) Asf1-myc was immunoprecipitated from 1 mg of protein extract from yeast strains expressing only wild-type Hht2 or the Hht2-R129E mutant. Immunoprecipitated proteins were then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-myc and anti-H3 and anti-H4 antibodies as described in *Experimental Procedures*. Forty micrograms of S100 protein extract was also analyzed to evaluate the efficiency of Asf1-myc immunoprecipitation. A strain that does not express Asf1-myc was used as a specificity control for the anti-myc immunoprecipitation.

(D) Suppression of the sensitivity of the *asf1*Δ mutant to genotoxic stress by expression of an extra copy of H3-K56Q, but not wild-type H3 or H3-K56R. A W303 *asf1*Δ:*kanMX* mutant strain was transformed with centromeric plasmid pRS414 (vector), or with the same plasmid expressing genes for wild-type H3/H4 (*HHT2-HHF2*; indicated as pH3-WT), expressing the H3-K56R mutant with wild-type H4 (*hht2-K56R-HHF2*; indicated as pH3-K56R), or expressing the H3-K56Q mutant with wild-type H4 (*hht2-K56Q-HHF2*; indicated as pH3-K56Q). Transformed cells were then grown to early stationary phase in a synthetic medium without tryptophan to maintain selection for the pRS414 plasmids, and cells were then spotted in 10-fold dilutions on the indicated media and incubated for 4 days at 30°C. A wild-type strain containing the pRS414 vector was also spotted as a control for the wild-type level of resistance to these genotoxic agents. Expression of one extra copy of *HHT2-HHF2*, *hht2-K56R-HHF2*, or *hht2-K56Q-HHF2* in the wild-type strain did not affect its resistance to these genotoxic agents (data not shown).

heterodimeric forms of H3/H4 (Tagami et al., 2004). Coexpression of the N-terminal domain of yeast Asf1 with histones H3/H4 also led to the formation of 1/1/1 heterotrimeric complexes of Asf1 with an H3/H4 heterodimer (English et al., 2005). Our current structural data of the human ASF1A N-terminal domain bound to the C-terminal helix peptide of histone H3 provide the structural basis for these observations. Asf1 occupies the same surface of this peptide that would normally be bound by the second H3/H3 heterodimer found in the tetrameric H3/H4 complexes. Because H3/H4 heterotetramers are in dynamic equilibrium with the heterodimers, the presence of Asf1 would displace the second heterodimer from the complex if its affinity for the H3/H4 heterodimer is higher than that of H4/H4 itself. The presence of Asf1-H3/H4 predeposition complexes must still be reconciled with the data indicating that nucleosomal H3/H4 heterotetramers rarely dissociate in cells (Annunziato, 2005). A concerted deposition of newly synthesized H3/H4 heterodimers would be consistent with all current data and might explain the complexity of the predeposition complexes that contain several distinct histone chaperones.

Asf1 is required for histone H3-K56 acetylation in yeast, and a correlation was observed, with one exception, for *asf1* mutant cells that lack H3-K56 acetylation and sensitivity to genotoxic stress (Recht et al., 2006). Mutants with reduced H3-K56 acetylation were localized to the H3 binding surface that we had previously defined by NMR chemical-shift perturbation analysis. We have now extended this analysis to mutants of Asf1 that we had previously characterized in terms of their binding affinity to the H3/H4 complex in vitro and their phenotypic defects in yeast cells. An excellent correlation is found between their histone-binding defect in vitro, the degree of residual H3-K56 acetylation in vivo, and the phenotypic defects of the mutants. These results support the conclusion that the Asf1-H3/H4 interaction is required for H3-K56 acetylation that is in turn required for the resistance to genotoxic stress (Hyland et al., 2005; Masumoto et al., 2005; Recht et al., 2006). The precise role of H3-K56 acetylation in these processes remains to be determined. Our current structural data allow us to further propose that the association of Asf1 with the heterodimeric form of histone H3/H4 is required for an efficient acetylation of K56 in yeast. These data show that residue K56 is located at the opposite side of histone H3 from Asf1 (Figure 2B). It is thus unlikely that Asf1 shields acetylated K56 from deacetylases, which is consistent with work showing that H3-K56 acetylation is still absent in *asf1* mutants that lack the Hst3 and Hst4 H3-K56 deacetylases (Celic et al., 2006). We propose instead that Asf1 is required to recruit one or more H3-K56 acetyltransferases to the Asf1-H3/H4 heterodimeric complex.

During the review of this paper, Tyler and coworkers published the structure of the conserved domain of yeast Asf1 (1–169) cocrystallized with *Xenopus* histones H3 (60–135)/H4 (20–101) (English et al., 2006). In this structure, the orientation of the H3 C-terminal helix is identical to that observed in our structure with the histone fragment only (with an rmsd of 2.19 Å for backbone atoms of Asf1

[1–156] and histone H3 [122–134]). In both structures, the hydrophobic clamp involves residues L126 and I130 of histone H3 and V45, V92, V94, L96, and Y112 of Asf1, and the network of salt bridges includes the salt bridge between Asf1-D54 and histone H3-R129 which was targeted by our mutagenesis. The high B factor for R134 and the absence of electron density for the last residue A135 in the crystal structure of the complex are also consistent with the mobility of the last two residues observed in the NMR structure and dynamics, and the absence of phenotype of the R134E mutant. The two structures differ slightly in the region around histone H3-K122. In the crystal structure, the charged extremity of the side chain of K122 points toward the polar side chains of S91 and S48, whereas in our NMR structure, the hydrophobic moiety of histone H3-K122 packs against the methyl group of A48 and V92 of ASF1A and its guanidinium group forms a partly buried salt bridge with ASF1A-D88. These differences may result from sequence variation between yeast Asf1 and human ASF1A in which S48 is replaced by A48 and S91 by G91. The structure we observe likely represents an alternative arrangement of the Asf1/histone H3 interface in this region. This arrangement is probably the most common, as the majority of Asf1 sequences show an alanine residue in position 48 and a glycine in position 91 as in the human ASF1A sequence (Figure S2).

The comparison of our model derived from the structure with the peptide with the crystal structure validates the modeling for the global orientation of the two molecules with each other (rmsd of 3.84 Å for backbone atoms of Asf1 [1–156], histone H3 [60–134], and histone H4 [31–93]), and in particular for the association of Asf1 with the dimeric H3/H4 complex. The interactions with the helix α_2 were also well predicted in our model. However, the crystal structure with the histone H3/H4 complex also reveals additional interactions with the C-terminal part of histone H4. For this interaction, the C-terminal residues of histone H4 undergo a large conformational change and form a β strand paired with strand β_9 of Asf1. We could not have predicted this interaction by our approach. This additional interaction likely reinforces the Asf1/histone interaction and is consistent with a higher affinity of Asf1 for the full histone H3/H4 complex compared to the modest affinity for the histone C-terminal helix. In conclusion, we determined the NMR solution structure of the N-terminal domain of human Asf1a with the C-terminal helix of histone H3, which provided the structural basis for Asf1 association with the dimeric rather than the tetrameric complex of histones H3/H4. It also allowed us to design mutations of histone H3 that perturb this interaction for the in vivo investigation of its role in H3-K56 acetylation and in the resistance to genotoxic stress.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Expression and Cloning

^{15}N - and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled and unlabeled recombinant human ASF1A (1–156) were produced and purified as described in Mousson et al. (2004). Unlabeled histone H3 (122–135) peptide was produced by

chemical synthesis (Asynth, The Netherlands); uniformly ^{15}N - and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled histone H3 (122–135) peptides were produced and purified as described in Mousson et al. (2005).

Structural Determination of the Complex of ASF1A (1–156) with Histone H3 (122–135)

All NMR samples were prepared in the following buffer: 10 mM Tris D_{11} (pH 7.4), 0.1% NaN_3 , 1 mM EDTA, 0.1 mM 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate, 10% or 100% D_2O . Several samples were used: uniformly ^{15}N - (or $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -) labeled ASF1A (1–156) in complex with unlabeled histone H3 (122–135) or uniformly ^{15}N - (or $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -) labeled histone H3 (122–135) in complex with unlabeled ASF1A (1–156). For these samples, the concentrations of the labeled and unlabeled molecules were 2 mM and 2.5 mM, respectively. Because the affinity constant of the complex is approximately 50 μM , 92% of the labeled molecules were bound to the unlabeled partner in the sample (1856 μM bound and 144 μM unbound). NMR experiments were carried out on Bruker DRX 600 MHz and 800 MHz spectrometers equipped with cryoprobes. ^1H , ^{15}N , and ^{13}C resonance assignments of the complex were obtained as described in Mousson et al. (2004). Intermolecular NOEs were obtained by filtered edited experiments described in Zwaalen et al. (1997). NMR spectra were processed using XWINNMR and analyzed using SPARKY (T.D. Goddard and D.G. Kneller, University of California, San Francisco). Peak intensities of the ^{13}C -filtered ^{15}N - and ^{13}C -edited 3D NOESY-HSQC spectra (with a mixing time of 120 ms) were converted to distance restraints using ARIA (ambiguous restraints for iterative assignment) (Linge et al., 2001, 2003). One hundred thirteen (ϕ, ψ) restraints were derived using TALOS (Cornilescu et al., 1999) and 57 ϕ restraints using $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ coupling constants derived from the 3D HNHA spectrum (Vuister and Bax, 1994) on the basis of the empirical Karplus relation they were set to, $-60 \pm 40^\circ$ for $J_{\text{HNH}\alpha}$ lower than 6 Hz and $-120 \pm 60^\circ$ for $J_{\text{HNH}\alpha}$ higher than 8 Hz. Seventy hydrogen bonds were used for the calculation. They were introduced in regular secondary structures defined on the basis of the presence of the complete set of NOEs expected for β sheets or α helices (Wüthrich, 1986) and consistent values of (ϕ, ψ) predicted from TALOS. An overview of the constraints is given in Table 1. Structures were calculated using ARIA 2.0 and CNS 1.1 (Habeck et al., 2004; Brünger et al., 1998), starting from random structures for both Asf1 and H3 peptides and the PARALLHDG force field. Standard protocols and parameters were used as proposed in the ARIA program. Eight iterations were calculated each on 100 structures, keeping 30 structures for analysis. Finally, the 30 structures with lowest energy were refined with explicit water and the 20 best structures were submitted to the Protein Data Bank (ID code 2IIJ). Salt bridges were assigned when the distance between the charged heavy atoms was below 3.5 Å in more than half of the 20 best structures.

Mutant Construction and Phenotypic Analyses

Construction of the H3-R129E Mutant

The R129E mutation was introduced by site-specific mutagenesis into the plasmid pDM18 (pRS414-*HHT2-HHF2*), a generous gift from A.A. Duina and F. Winston (Duina and Winston, 2004). The resulting plasmid, pH3-R129E = pRS414-*hht2-R129E*, was transformed into yeast strain FY2161 *MATa his3 Δ 200 leu2 Δ 1 ura3-52 trp Δ 63 lys2-128 (hht1-hhf1)::LEU2 (hht2-hhf2)::HIS3 Ty912 Δ 35-lacZ::his4 pDM9 (pRS416-*URA3-HHT1-HHF1*) selecting for Trp^+ cells. The pDM9 *URA3* plasmid containing wild-type *HHT1-HHF1* was then counterselected by replicating cells onto a medium containing 5-fluoro-orotic acid.*

Suppression of *asf1* Δ by the H3-K56Q Mutant

pRS414 centromeric plasmids containing wild-type *HHT2-HHF2* (pDM18 above), *hht2-K56R* (pEMH7-*hht2-K56R-HHF2*), or *hht2-K56Q* (pEMH7-*hht2-K56Q-HHF2*), the latter two plasmids being generous gifts of E.M. Hyland and J.D. Boeke (Hyland et al., 2005), were transformed into a W303-1a *asf1* Δ ::*kanMX* strain selecting Trp^+ transformants. Resistance to genotoxic stress was then assessed by growth on yeast extract-peptone-dextrose plates containing the genotoxic agents as described in the legend of Figure 3.

Western Blots to Assess the Levels of H3-K56 Acetylation

Denaturing protein extracts were prepared by trichloroacetic acid precipitation and glass bead breakage as previously described (Foiiani et al., 1994). Cellular proteins were then resolved on SDS-15% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then incubated with a 1/1000 dilution of rabbit anti-H3-K56-acetyl antibodies (Upstate Biotechnology) or a 1/1000 dilution of rabbit anti-H3-C-terminal (100–135) antibodies (Abcam, 1791) followed by a 1/5000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies and Pierce Pico sensitivity chemiluminescent reagents according to the manufacturer's directions.

Coimmunoprecipitation of Asf1-Myc with H3/H4

Yeast strains expressing uniquely wild-type Hht2 or the Hht2-RE129E mutant were transformed with a *URA3* vector or plasmids expressing Asf1-13-myc (Mousson et al., 2005). Four hundred milliliters of cells was grown at 30°C in synthetic complete medium lacking uracil to an A_{600} of 0.6. The cells were then centrifuged and resuspended in 4 ml of breaking buffer (40 mM HEPES [pH 7.5], 1 mM DTT, and an EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche Biochemicals]). Cells were then broken with an Eaton press and an S100 extract was prepared by centrifugation at 45,000 rpm for 1 hr at 4°C in a Beckman 70 Ti rotor. Twenty microliters of EZ-view anti-myc beads (Sigma) was added to 1 mg of protein extract in an Eppendorf tube and incubated on a rotary shaker overnight at 4°C. The anti-myc beads were then washed four times with extraction buffer containing 0.1% NP-40 and the beads were transferred to a fresh tube before the last wash. Proteins bound to the anti-myc beads were solubilized by the addition of SDS sample buffer and heating at 95°C for 5 min. Eluted proteins were then electrophoresed on discontinuous SDS-10%/15% polyacrylamide gels and the resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Asf1-myc, histone H3, and histone H4 proteins were visualized by incubating with 1/5000 dilutions of mouse 9E10 anti-myc antibodies, rabbit anti-H3 antibodies (Abcam, 1791), and rabbit anti-H4-K8/12-acetyl antibodies (Upstate Biotechnology) followed by incubation with 1/10,000 dilutions of donkey anti-mouse-680 and anti-rabbit-800 antibodies and scanning with an Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences).

Supplemental Data

Supplemental Data include two figures and one table and can be found with this article online at <http://www.structure.org/cgi/content/full/15/2/191/DC1/>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Eric Guittet and François Bontems from the Institut de Chimie des Substances Naturelles for fruitful discussions and access to the 800 MHz spectrometer, and we are grateful to Fred Winston and Jeff Boeke for the gifts of plasmids and yeast strains. This work was financed in part by the Association pour la Recherche sur le Cancer and an intramural research grant from the Uniformed Services University of the Health Sciences.

Received: October 29, 2006

Revised: December 29, 2006

Accepted: January 7, 2007

Published: February 13, 2007

REFERENCES

- Adkins, M.W., Howar, S.R., and Tyler, J.K. (2004). Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast *PHO5* and *PHO8* genes. *Mol. Cell* 14, 657–666.
- Annunziato, A.T. (2005). Split decision: what happens to nucleosomes during DNA replication? *J. Biol. Chem.* 280, 12065–12068.

- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921.
- Celic, I., Masumoto, H., Griffith, W.P., Meluh, P., Cotter, R.J., Boeke, J.D., and Verreault, A. (2006). The sirtuins hst3 and Hst4p preserve genome integrity by controlling histone h3 lysine 56 deacetylation. *Curr. Biol.* **16**, 1280–1289.
- Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* **13**, 289–302.
- Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Lam, W.M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A.A., Brill, S.J., Adams, P.D., Berger, J.M., and Kaufman, P.D. (2003). Structure and function of the conserved core of histone deposition protein Asf1. *Curr. Biol.* **13**, 2148–2158.
- Duina, A.A., and Winston, F. (2004). Analysis of a mutant histone H3 that perturbs the association of Swi/Snf with chromatin. *Mol. Cell Biol.* **24**, 561–572.
- Dutta, S., Akey, I.V., Dingwall, C., Hartman, K.L., Laue, T., Nolte, R.T., Head, J.F., and Akey, C.W. (2001). The crystal structure of nucleoplasmin-core: implications for histone binding and nucleosome assembly. *Mol. Cell* **8**, 841–853.
- Emili, A., Schieltz, D.M., Yates, J.R., III, and Hartwell, L.H. (2001). Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1. *Mol. Cell* **7**, 13–20.
- English, C.M., Maluf, N.K., Tripet, B., Churchill, M.E., and Tyler, J.K. (2005). ASF1 binds to a heterodimer of histones H3 and H4: a two-step mechanism for the assembly of the H3-H4 heterotetramer on DNA. *Biochemistry* **44**, 13673–13682.
- English, C.M., Adkins, M.W., Carson, J.J., Churchill, M.E., and Tyler, J.K. (2006). Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* **127**, 495–508.
- Foiani, M., Marini, F., Gamba, D., Lucchini, G., and Plevani, P. (1994). The B subunit of the DNA polymerase α -primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication. *Mol. Cell Biol.* **14**, 923–933.
- 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.
- Habeck, M., Rieping, W., Linge, J.P., and Nilges, M. (2004). NOE assignment with ARIA 2.0: the nuts and bolts. *Methods Mol. Biol.* **278**, 379–402.
- Harp, J.M., Hanson, B.L., Timm, D.E., and Bunick, G.J. (2000). Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**, 1513–1534.
- Hu, F., Alcasabas, A.A., and Elledge, S.J. (2001). Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly. *Genes Dev.* **15**, 1061–1066.
- Hyland, E.M., Cosgrove, M.S., Molina, H., Wang, D., Pandey, A., Cottee, R.J., and Boeke, J.D. (2005). Insights into the role of histone H3 and histone H4 core modifiable residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **25**, 10060–10070.
- Le, S., Davis, C., Konopka, J.B., and Sternglanz, R. (1997). Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1029–1042.
- Linge, J.P., O'Donoghue, S.I., and Nilges, M. (2001). Automated assignment of ambiguous nuclear Overhauser effects with ARIA. *Methods Enzymol.* **339**, 71–90.
- Linge, J.P., Habeck, M., Rieping, W., and Nilges, M. (2003). ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* **19**, 315–316.
- Loyola, A., and Almouzni, G. (2004). Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim. Biophys. Acta* **1677**, 3–11.
- 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 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260.
- Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R., and Verreault, A. (2005). A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* **436**, 294–298.
- Mello, J.A., Sillje, H.H., Roche, D.M., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2002). Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep.* **3**, 329–334.
- Mousson, F., Couprie, J., Thuret, J.Y., Neumann, J.M., Mann, C., and Ochsenbein, F. (2004). ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the conserved core of hAsf1 A. *J. Biomol. NMR* **29**, 413–414.
- Mousson, F., Lautrette, A., Thuret, J.Y., Agez, M., Courbeyrette, R., Amigues, B., Becker, E., Neumann, J.M., Guerois, R., Mann, C., and Ochsenbein, F. (2005). Structural basis for the interaction of Asf1 with histone H3 and its functional implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5975–5980.
- 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.
- Padmanabhan, B., Kataoka, K., Umehara, T., Adachi, N., Yokoyama, S., and Horikoshi, M. (2005). Structural similarity between histone chaperone Cia1p/Asf1p and DNA-binding protein NF- κ B. *J. Biochem. (Tokyo)* **138**, 821–829.
- Park, Y.J., and Luger, K. (2006). The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1248–1253.
- Recht, J., Tsubota, T., Tanny, J.C., Diaz, R.L., Berger, J.M., Zhang, X., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Burlingame, A.L., Hunt, D.F., et al. (2006). Histone chaperone Asf1 is required for histone H3 lysine 56 acetylation, a modification associated with S phase in mitosis and meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6988–6993.
- Schwabish, M.A., and Struhl, K. (2006). Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **22**, 415–422.
- Sharp, J.A., Fouts, E.T., Krawitz, D.C., and Kaufman, P.D. (2001). Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing. *Curr. Biol.* **11**, 463–473.
- 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.
- Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* **402**, 555–560.
- Umehara, T., Chimura, T., Ichikawa, N., and Horikoshi, M. (2002). Poly-anionic stretch-deleted histone chaperone cia1/Asf1p is functional both in vivo and in vitro. *Genes Cells* **7**, 59–73.
- Vuister, G.W., and Bax, A. (1994). Measurement of four-bond HN-H α -J-couplings in staphylococcal nuclease. *J. Biomol. NMR* **4**, 193–200.
- White, C.L., Suto, R.K., and Luger, K. (2001). Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J.* **20**, 5207–5218.
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (New York: Wiley).
- Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S.J., Greenblatt, J., Konrat, R., and Kay, L.E. (1997). Methods for measurement of intermolecular NOEs by multinuclear NMR spectroscopy: application to a bacteriophage λ N-peptide/boxB RNA complex. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 6711–6721.

Accession Numbers

The structure of human Asf1a in complex with the histone H3 C-terminal helix has been deposited in the Protein Data Bank under ID code 2IIJ.

Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Chromatin Structure and Function, 2006: ISBN: 81-7895-234-3
Editors: James M. Nicholson and Christopher M. Wood

5

Structural biology of histone-associated proteins

Morgane Agez^{1, #}, Aurelie Lautrette^{1, #}, Florence Mousson², Carl Mann³ and Francoise Ochsenein¹

¹Département de Biologie Joliot-Curie, Service de Biophysique des Fonctions Membranaires, CEA/Saclay. F-91191 Gif-sur-Yvette, France; ²Department of Physiological Chemistry, Division of Biomedical Genetics, University Medical Center Utrecht, Universiteitsweg 100, 3584CG Utrecht, the Netherlands

³Dept. of Biochemistry & Molecular Biology, F. Edward Hébert School of Medicine, USUHS, 4301 Jones Bridge Road, Bethesda, MD. 20814-4799

Abstract

Epigenetic information is mainly encoded by post-translational modifications of histone tails that act as specific signals for the recruitment of a wide range of protein machineries to chromatin. The translation of these histone marks into relevant biological signals is achieved by a variety of protein domains that bind histone tails. Acetylated-lysines are recognized by bromodomains, methylated-lysines and/or arginines

[#]Contribute equally to this work.

Correspondence/Reprint request: Dr. Francoise Ochsenein, Département de Biologie Joliot-Curie, Service de Biophysique des Fonctions Membranaires, CEA/Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

by chromodomains, tudor domains or WD repeats, phospho-serines by 14-3-3 or tandem BRCT domains, and unmodified histone tails by SANT domains. The structural basis for histone tail recognition by these domains is presented and discussed together with functional insights. The assembly of histones into nucleosomes is also a tightly regulated process and involves histone chaperones. Structural characterization of histone chaperones and their histone binding mode are presented. The mechanism of nucleosome assembly in the context of different cellular processes is discussed.

Introduction

It is now well established that chromatin not only compacts the genome of eukaryote cells but also carries epigenetic information that is mainly encoded by post-translational modifications of histones that act as specific signals for the recruitment of a wide range of protein machineries to the DNA. The transient nature of post-translational modifications allows a spatio-temporal regulation of genome accessibility for the transcription, replication, and repair of DNA. The combination of specific modification patterns and intracellular localization enables a fine-tuning of this regulation. The translation of these histone marks into relevant biological signals is achieved by a variety of histone interacting proteins and chromatin modifying machines. Over the past 10 years, structural biology studies have greatly contributed to the understanding of these complex mechanisms. The determination of numerous structures of chromatin associated proteins at high resolution revealed an amazing sophistication in the molecular cross-talk underlying genome accessibility. The scope of this chapter is to review how functional insights have been gained from this impressive body of work.

The repeated unit of chromatin, the nucleosome, is composed of ~146 base pairs of DNA wrapped about two times around a core histone octamer that consists of two copies each of histones H2A, H2B, H3, and H4. A linker histone, such as H1, interacts with the nucleosomal core as well as the adjoining linker DNA. The high resolution structure of the nucleosome was determined in 1997 [1], and the structure of isolated histone H1 was also solved [2], but a high resolution structure of histone H1 associated with DNA has not been described. The high resolution structure of the nucleosome reveals that each histone adopts a characteristic fold comprised of three α -helices and two loops. These folded regions directly interact with the DNA. In contrast, the N- and C-terminal tails of histones are composed of about 15-30 unfolded residues that protrude out of the nucleosome surface. These tails harbor post-translational modifications including acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitylation and sumoylation which are specialized for binding to other partners. These modifications constitute the so-called histone code, which, among others, controls gene expression [3, 4].

The domains interacting with modified histone tails both contribute to set up and read the histone code. They are often found in molecular machines that alter chromatin compaction. These machines harbor various enzymatic activities and directly take part in processes that require DNA accessibility such as gene expression, DNA replication, and DNA repair. They cluster into two broad classes: (i) enzymes that covalently modify the amino-terminal tail of histones and (ii) the ATP-dependent nucleosome remodeling enzymes.

The assembly of histones into nucleosomes is also a tightly regulated process [5, 6]. After their synthesis in the cytoplasm, histones are imported into the nucleus by karyopherins with the possible assistance of some histone chaperones. The current model for nucleosome assembly distinguishes two major steps: a heterotetrameric complex of H3/H4 is first assembled with the DNA and forms the tetrasome. This first step is assisted by specific chaperones such as HirA, CAF-I and Asf1. In a second step, two H2A/H2B dimers are added on both sides of the H3/H4 tetramer by the action of distinct histone chaperones such as Nap1 and FACT.

The first section of this chapter is dedicated to the structural study of histone binding domains that recognize specifically modified N-terminal histone tails. The binding properties and the functional role of these domains in the context of histone modifying machines are discussed. The second section deals with histone chaperones and with their histone binding mode. The mechanism of nucleosome assembly in the context of different cellular processes will be discussed.

A. Histone tail binding domains

In this section, we review the structural and functional characteristics of histone tail binding domains. The discovery of histone tail modifications stimulated intense efforts to define the functional interpretation of the underlying code. How are combinations of small modifications translated to give rise to major variation in cell fate? The histone code hypothesis proposes that histone modification marks constitute binding sites for a series of specialized domains. Domains that recognize acetylated lysines (BROMO), methylated lysines (CHROMO, WD repeats) and/or arginines (TUDOR), and phosphorylated serines (14-3-3, Tandem BRCT) of histone tails have been identified. Domains that bind unmodified histone tails have also been described (SANT). All these domains are found in several complexes and protein machines that alter chromatin dynamics.

1. Histone acetylated-lysine binding domains

Bromodomains are the only modules known to recognize the acetylated lysines of histones [7-9]. The first high resolution structure of a bromodomain

was that of human P/CAF, a histone acetyl transferase, and was solved by NMR in 1999 [7]. The domain adopts a left handed four-helix bundle fold with a conserved pocket likely to bind acetylated lysines. In 2000, the crystal structure of the bromodomain of Gcn5p, a yeast histone acetyl transferase, was solved in complex with a histone H4 peptide acetylated at the ζ -N of Lysine 16 (**Figure 1A**) [10]. The acetyl group of histone H4-Lys 16 is in contact with several bulky water molecules and establishes a hydrogen bond with a highly conserved asparagine residue, N₄₀₇ (**Figure 1B**). The side chain of lysine 16 is largely buried in the previously mentioned conserved pocket that contains several hydrophobic and aromatic residues (**Figure 1B**). The bound histone H4 peptide adopts an extended conformation and only four residues are in contact with the domain. Residues at positions Lys+2 and Lys+3 with respect to the acetylated lysine residue are also in contact with several residues of the

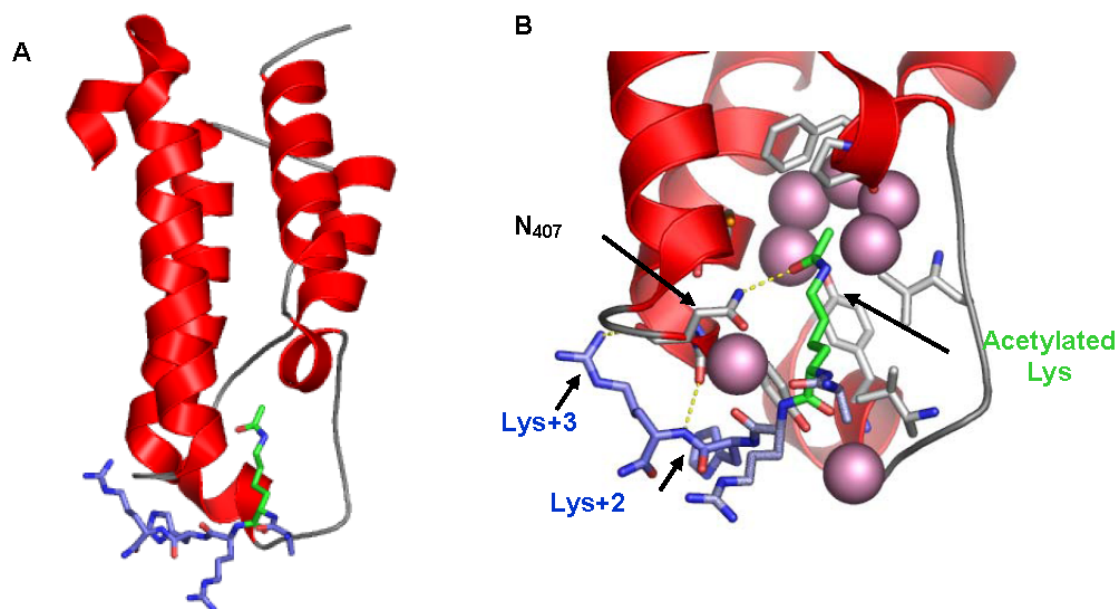


Figure 1. Histone acetylated-lysine recognition domains. Domains are shown with a cartoon representation color coded according to the secondary structure: red α -helices, grey loops. Domain residues are colored by element with a grey color for carbons. Histone peptides are colored by element with blue color for carbons. Acetylated lysines of histone peptides are colored by element with a green color for carbons **A and B** : bromodomain of yeast Gcn5 bound to ζ -N acetylated K₁₆ H4 peptide [10], pdb code: 1e6i, **B** : detailed view of the recognition pocket of the acetylated residue. Residue Y₄₁₃ was omitted for the sake of clarity. Residue N₄₀₇, which establishes a hydrogen-bond with the acetyl group, is indicated. Selected hydrogen bonds are shown in yellow. Water molecules in contact with the acetylated lysine are shown as pink spheres. All figures were generated with PYMOL (DeLano Scientific, South San Francisco, CA).

bromodomain. Interestingly, residues that contact the acetylated lysine moiety are highly conserved within bromodomains, whereas residues that contact adjacent residues are only conserved in the Gcn5 family. These results are consistent with the hypothesis that sequence diversity around the acetylated lysine binding pocket confers to each bromodomain its selectivity for specific acetylated targets [10, 11].

In numerous proteins, bromodomains are found associated in tandem. An underlying question is whether the tandem arrangement of bromodomains might enable a combinatorial recognition of histone modifications. The structure of the tandem bromodomains of human TAF_{II}250, a subunit of the transcription factor TF_{II}D, has been solved [12]. Each domain exhibits a well conserved pocket able to bind a ζ -N acetylated lysine. The tandem bromodomains were found to bind *in vitro* diacetylated H4 peptides with an affinity 40 times higher than the one of monoacetylated peptides. Histone H4 modified on Lys 5 and Lys 12 reached a binding constant of 1 μ M. The authors concluded that each bromodomain may bind acetylated lysine separated by seven residues in a single peptide. However, this conclusion has been weakened by the structure of the bromodomain of yeast Gcn5p complexed with a histone tail [10]. Assuming that the orientation of the histone peptide is the same for all bromodomains, and that there is no substantial rearrangement of the two tandem bromodomains, then the distance and orientation of the two binding pockets is incompatible with seven residues between the two acetylated lysines. If true, at least ten more residues would be needed [10]. This apparent contradiction highlights an important issue regarding the identification of the acetylated-lysine targets of bromodomains. *In vitro* affinity measurements with modified peptides constitute interesting tools for proposing target candidates, but the interaction has to be confirmed in a physiological context, especially since the binding affinities of bromodomains for acetylated peptides are often very low. A dissociation constant of only 346 μ M for the bromodomain of P/CAF with the four residue histone H4 ζ -N acetylated at lysine 16 was measured *in vitro*, although they were shown to be interacting partners *in vivo* [7, 13]. Structural studies have provided the possibility to design point mutations that specifically alter the binding capacity of each bromodomain. These mutants are useful tools to test *in vivo* bromodomain targets. This strategy has been applied to the study of the tandem bromodomains of human TAF_{II}250 and Brd2 (Bromodomain containing protein 2), [13] and yeast Rsc4, a subunit of the ATP dependant chromatin remodeler RSC [14]. Interestingly, results have shown that tandem bromodomains of TAF_{II}250 bind H3, as well as H4 and to a lesser extent H2B, but not H2A. The histone H4 K5G/K12G double mutation only partially reduced the global binding signal to histones. These results illustrate that

tandem TAF_{II}250 bromodomains have multiple targets [13]. In the case of Brd2 and Rsc4, point mutations in each of the tandem bromodomains combined with histone tail point mutations revealed that one of the main targets of the tandems was a single acetylated lysine (H4-Lys 12 for Brd2 and H3-Lys 14 for Rsc4), and that the two bromodomains were partially redundant for the binding [13, 14]. Further work is needed to unravel the rules that govern the specificity of recognition. This information will be of particular interest for understanding the way histone tail acetylations are translated into functional signals.

2. Histone methylated lysine and arginine binding domains

Three modules have been shown to bind methylated lysine or arginine residues: the most extensively studied chromodomains, and more recently identified tudor domains and WD repeats. Structural and functional properties of these domains are detailed below.

Chromodomains

Chromodomains were first identified as similar domains in two distinct heterochromatin-like associated proteins: Polycomb and HP1 (Heterochromatin protein 1) [18]. Later, chromodomains were found in many other chromatin regulators, such as ATP-dependant chromatin remodelers, histone acetyl transferases, and methyl transferases [19]. The first high resolution structure of a chromodomain was solved by NMR for the mouse chromatin modifier protein 1 (MoMOD1) [20]. The protein consists of an N-terminal three-stranded anti-parallel β -sheet that folds against a C-terminal α -helix. The structure reveals an unexpected similarity to archaeobacterial DNA binding proteins that are also involved in chromatin structure (Sac7d and Sso7d). However, on the basis of its overall negative surface charge distribution, the chromodomain appears to be better suited for protein-protein interactions than for nucleic acid interactions.

The chromodomain of Polycomb was shown to be required for its binding to chromatin in 1992 [21], but the ability of the HP1 chromodomain to recognize methylated-lysine histone tails was only discovered in 2001 [22]. Kouzarides and coworkers also showed a clear selectivity of the HP1 chromodomain for histone H3 methylated on lysine 9 and not lysine 4. The structure of the free chromodomain did not provide any clue regarding the mechanism of its recognition of methylated-lysine. Unlike acetylation, methylation neither introduces new hydrogen bonding sites nor changes in the net charge. Further insights were provided by two simultaneous structural studies, by NMR and crystallography, of the HP1 chromodomain bound to a histone H3 peptide methylated on lysine 9 [16, 23]. The histone H3 peptide binds in an extended β strand conformation and lies antiparallel and coplanar

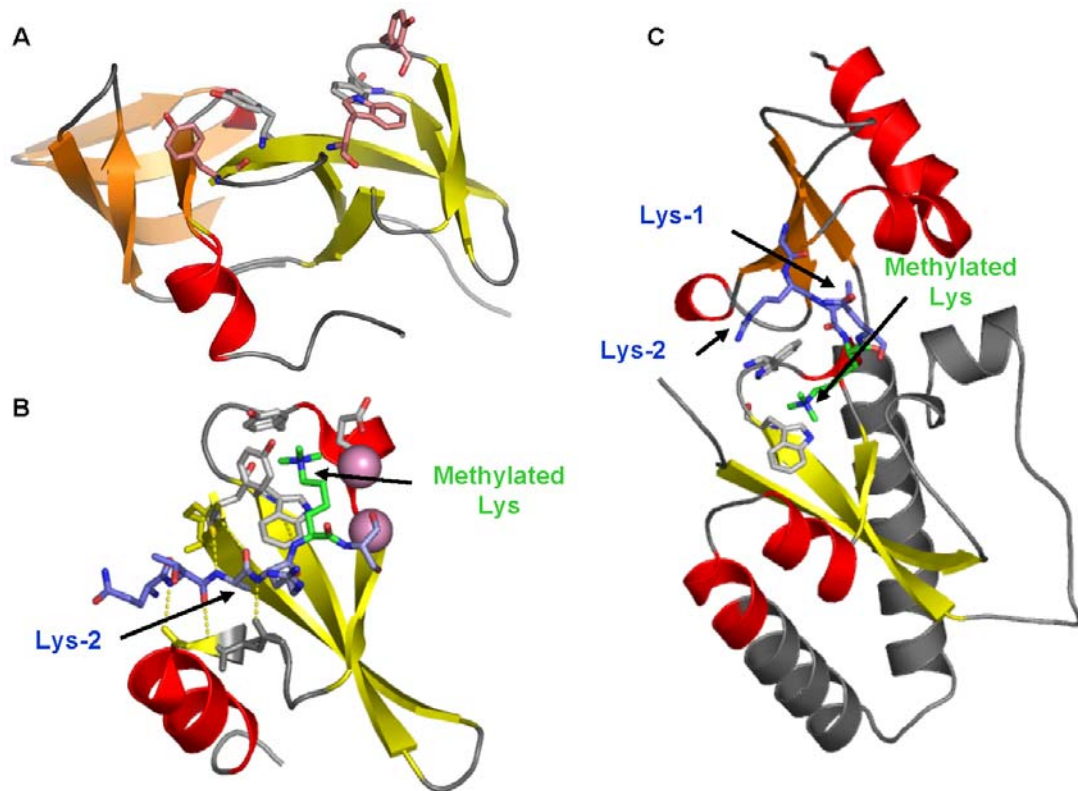


Figure 2. Histone methylated-lysine (and/or arginine) recognition domains. Domains are shown with a cartoon representation color coded according to the secondary structure: red α -helices, yellow or orange β -sheets, grey loops. Domain residues are colored by element with a grey color for carbons. Histone peptides are colored by element with blue color for carbons. Methylated-lysines of histone peptides are colored by element with a green color for carbons. **A** : Tandem tudor domain of 53BP1 [15], pdb code: 1ssf. β -sheets of the second tudor domain are shown in orange. Conserved aromatic residues of the domain that could likely participate in methylated lysine binding are shown in sticks. Three of them, colored in rose, are perturbed by the addition of methylated-arginine peptides or DNA [15], **B** : Chromodomain of drosophila HP1 bound to a trimethylated Lys 9 H3 peptide [16], pdb code 1kne. The orientation of the chromodomain is similar to that of the first tudor domain in A. The three residues that establish an aromatic cage around the methylated-lysine are shown. Hydrogen bonds of the regular secondary structure formed with the histone peptide and the domain are shown in yellow. The Lys-2 residue that plays an important role in the specific recognition is also indicated. Water molecules in contact with the acetylated lysine are shown as pink spheres, **C** : Tandem chromodomains of human CHD1 [17], pdb code: 2b2w. The orientation of the first chromodomain is similar to that of the chromodomain in B and the first tudor domain in A. β -sheets of the second chromodomain are shown in orange. Unique insertions in the two chromodomains and the helical linker between the two chromodomains are colored in dark grey. The two residues of the first chromodomain and the Lys-2 arginine residue that establish an aromatic cage around the methylated lysine are shown. The phosphorylatable Lys-1 threonine residue is also indicated.

with two chromodomain β segments. It involves a “folding upon binding” mechanism. The first segment is already folded as a β strand in the free chromodomain whereas the unfolded C-terminal tail of the free chromodomain wraps around the peptide as it binds. This folding upon binding process brings together the side chains of three conserved aromatic residues that assemble around the methyl groups of lysine 9 (**Figure 2B**). The affinity of HP1 chromodomain for methylated Lys 9 H3 peptide is improved when going from mono- to di- and tri- methylation [16, 23]. Calorimetric analyses are consistent with improved interactions of a cation- π interaction in addition to van der Waals contacts. The specificity for the peptide sequence surrounding the methylated lysine is provided by the stability of the regular secondary structure of the bound form. More precisely, the four amino acids that precede lysine 9 provide additional contacts with the chromodomain. The side chain at position -2 relative to the lysine (Lys-2) appears to be critical for specificity.

It was recently shown that another residue adjacent to the methylated lysine 9, serine 10, plays a major role in regulating the binding of the HP1 chromodomain to the H3 histone tail. Phosphorylation of serine 10 (Lys+1) by the Aurora kinase is sufficient to dissociate HP1 from its binding site. This transient phosphorylation occurs during mitosis and drives the dissociation of HP1 from heterochromatin [24, 25]. The rather low affinity of HP1 chromodomains for trimethylated lysine 9 H3 peptide (around 10 μ M, [16, 23, 24], competition studies with doubly modified peptide (trimethylated Lys 9 and phosphorylated Ser 10), and *in vitro* phosphorylation assays in the presence of a large molar excess of the HP1 chromodomain have suggested that the binding of HP1 to methylated H3 tail is fully reversible and highly dynamic. This result is consistent with the rapid exchange of HP1 from heterochromatin [26] and with a proposed mechanism whereby Brahma inhibits HP1 association to chromatin by competing for the same binding site and thereby maintaining a transcriptionally active state [27]. The dissociation of the HP1 chromodomain from methylated-lysine histones with the phosphorylation of the Lys+1 residue could be a general feature, since a similar property has been described for the binding of the HP1 chromodomain to methylated lysine 26 of histone H1.4 and the simultaneous phosphorylation of serine 27 [28]. It will be of interest to determine whether phosphorylation of histone H3 Ser-28 is able to dissociate the Polycomb chromodomain from the adjacent methylated lysine 27 residue [29] to generalize this property to other chromodomains.

As for bromodomains, tandem repeats of chromodomains are found in some proteins. The recent structure of the tandem arrangement of the human CHD1 chromodomains in interaction with histone H3 tails has shown interesting features. Unlike HP1 and Polycomb that use single chromodomains

to bind their respective methylated histone tail, the two chromodomains of CHD1 cooperate to interact with one H3 tail methylated on the single residue lysine 4 [17]. The tandem association of the two chromodomains is stabilized by interactions between unique insertions in CHD1. The positions of these residues block the expected site for the H3 tail seen in HP1 and Polycomb. Instead, the H3 peptide binding takes place in a groove at the interdomain junction with a completely different orientation of the methylated-lysine (**Figure 2C**). As for HP1, the affinity of the CHD1 tandem chromodomains increases when going from mono- to di- and tri-methylation, but recognition of the methyl groups is achieved by two aromatic residues instead of three aromatic residues (**Figure 2C**). The lack of the third aromatic residue in the formation of the π electro cage is compensated by the guanidinium group of the arginine 2 residue (position Lys-2) in the histone peptide. Interestingly, the methylation of this arginines, or the phosphorylation of the threonine 3 (position Lys-1), weakens the interaction with the H3 tail. This study highlights the versatility by which methylated lysines can bind to chromodomains. It also outlines an important feature shared by several binding modules: the possible regulation of the binding to methylated lysines by adjacent modifications.

Tudor domains

Tudor domains were identified as a repeat of domains found ten times in the tudor protein which regulates *Drosophila* pole cell formation, and in other developmentally important proteins including the SMN (Survival of motor Neuron) gene [30]. The SMN tudor domain was shown to bind the arginine/glycine rich region of the SM protein, and this interaction is crucial for its function [31]. The structure of the SMN tudor domain was solved by NMR spectroscopy [32] and reveals that the domains adopt a five stranded beta barrel with a cluster of conserved aromatic residues. These residues are perturbed upon the binding of arginine/glycine rich peptides. Interestingly, a combination of sequence and structure analyses led to the postulate that tudor and chromodomains together with PWWP and MBT domains may originate from a common ancestor [33]. The aromatic cage could thus constitute the arginine binding site of the SMN tudor domain. The increased affinity for methylated arginines *in vitro* and *in vivo*, and the confirmation that methylated-arginines are recognized by the aromatic cluster, strengthens this hypothesis [34].

A link between methylated residues of histone tails and tudor domains has been established for the tandem tudor of p53BP1 (p53 binding protein 1), a major component of DNA damage checkpoint pathways [35]. The structure of this tandem tudor domain was solved by NMR and crystallography [15, 35].

(**Figure 2A**). Binding to RG rich peptides found in the N-terminal region of p53BP1 takes place at the aromatic cage of the first domain and may provide an intramolecular protein-protein interaction [15]. It was also proposed that the recruitment of p53BP1 to the site of DNA damage could be achieved by the binding of the tandem tudor domains of p53BP1 to methylated lysine 79 of histone H3 [35]. Because lysine 79 methylation remains unchanged upon DNA damage, the authors suggest that a local unfolding of chromatin following DNA damage could expose methylated lysine 79 for binding by the p53BP1 tudor domains. This hypothesis is consistent with the recruitment of ATP dependent histone remodeler machines such as INO80 at the DNA damage sites which could destabilize the nucleosomes there. However, a recent peptide microarray binding assay of tudor domains (and other putative methylated lysine binding domains) with methylated lysine histone tails weakens this model [36]. In this study, as expected, increased binding of the HP1 chromodomain to mono-, di- and tri-methylated lysine 9 of histone H3 was observed. However, no significant binding of the p53BP1 tandem tudor domains to mono-, di-, or tri-methylated lysine 79 was detected. On the contrary, strong binding of this tandem tudor was seen for mono- and dimethylated, but surprisingly not for tri-methylated lysine 20 of histone H4. This study confirms that tudor domains constitute a new family of methylated lysine binding modules but stresses, as already pointed out for the case of bromodomains, the difficulty in determining the *in vivo* targets of these binding modules. The ability of tudor domains to discriminate between various degrees of methylation is certainly of major importance for the decoding the histone modifications, and it would be of great interest to determine the molecular basis of the binding specificity of the p53BP1 tandem tudor and to further investigate the biological role of this interaction.

WD repeats

WD repeats were first identified as a repetitive sequence in transducin β [37]. Proteins containing WD repeats are involved in diverse cellular functions [38]. The first structure of a WD repeat containing protein, the G protein heterotrimer $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$, was solved in 1995 [39]. To date, up to 20 structures of WD repeat proteins with less than 70% identity are listed in the protein data base (PDB). The WD repeats fold in a circular arrangement of β hairpins, and they are classified in the large family of β propellers (see for review [40]). Despite their large size, WD repeat proteins lack any enzymatic activity and they have usually been described as protein-protein interaction platforms. The conserved core of WD repeats constitutes a scaffold to display a number of variable loops involved in the binding of partners on both faces of the domain.

The first demonstration of WD repeats behaving as a recognition module for specific histone modifications was made in 2005 [41]. Allis and coworkers found that the human WRD5 protein retained methylated histone H3 lysine 4 in a pull-down assay. WDR5 is a subunit of the MLL1 complex which catalyses the methylation of histone H3 lysine 4. They demonstrated that this interaction is direct and specific for di- and tri-methylated H3 lysine 4, but not mono-methylated lysine 4 nor methylated histone H3 lysine 9. WRD5 is required for the association of the methyl transferase complex with its H3 Lys 4 dimethylated substrate, and WRD5 knock-down leads to a decrease in H3 Lys 4 trimethylation, but not H3 Lys 4 dimethylation. The authors propose a model whereby the methyl transferase complex is recruited to chromatin independently of WRD5 and catalyses the first two methylation steps. The binding of WDR5 to dimethylated substrates would then favor the catalytic reaction of trimethylation [41]. It will be of great interest to determine the structural basis for the recognition of methylated H3 lysine 4 by WDR5, and to test whether other WD repeats also bind modified histone tails, and thus constitute a new member of the domain families involved in the recognition of histone tail modifications.

3. Histone phospho-serine binding domains

Although numerous phosphorylated serine/threonine binding domains have been described (FHA, 14-3-3, WW, WD40, LRR, Polobox, tandem BRCT, CID [42-45]), only two of these have so far been shown to specifically recognize phosphorylated histones: 14-3-3 domains for the recognition of phospho-serine 10 of histone H3 [46] and the tandem BRCT (BRCA1 C-terminal domain) of MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) for the recognition of phosphorylated histone H2AX [47, 48].

14-3-3 domains

The 14-3-3 proteins are ubiquitous proteins that were first discovered as abundant, acidic proteins in the brain [49]. They are broadly expressed in a wide range of eukaryotic organisms including yeast, plants, and humans, and play a central role in signal transduction [50]. The first high resolution structure of a 14-3-3 protein was solved in 1995 for the human T-cell 14-3-3 τ isotype [51]. The capability of 14-3-3 to recognize phospho-serine or phospho-threonine residues was established in 1996 [52], and the structural basis for this recognition was probed using a phospho-serine peptide library screening of all mammalian 14-3-3 isotypes that led to the resolution of the structure of 14-3-3 ζ in complex with a phosphorylated peptide [53].

In 2005, 14-3-3 γ , ϵ , ζ isoforms from human cell extracts were copurified with modified histone H3 tails harboring phospho-serine 10 [46]. The authors

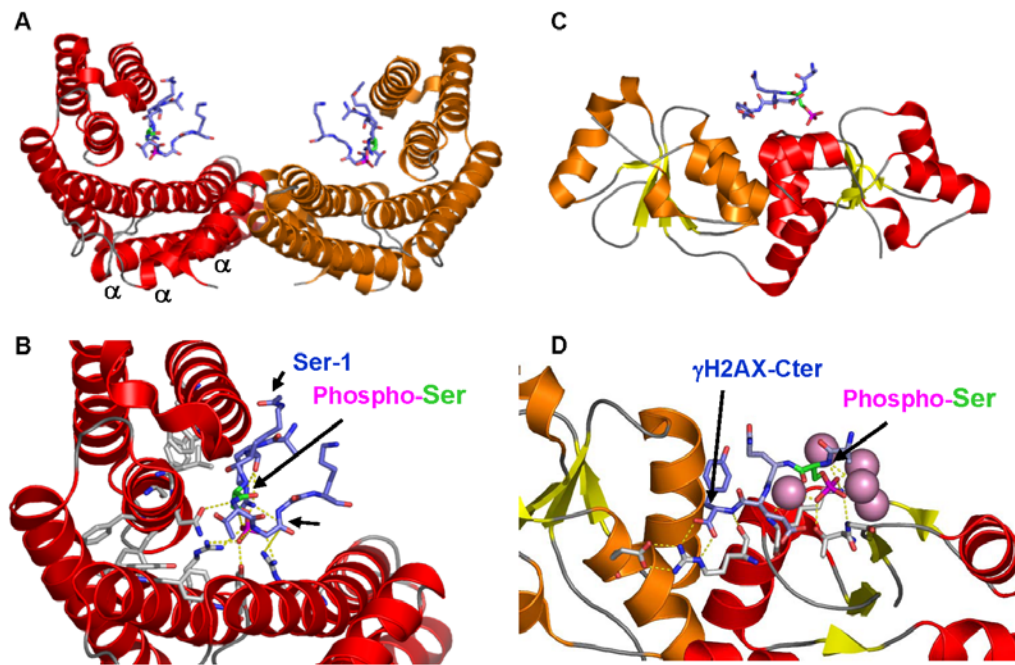


Figure 3. Histone phospho-serine recognition domains. Domains are shown with a cartoon representation color coded according to the secondary structure: red or orange α -helices, yellow β -sheets, grey loops. Domain residues are colored by element with a grey color for carbons. Histone peptides are colored by element with blue color for carbons. Phospho-serines of histone peptides are colored by element with a green color for carbons and magenta for phosphates. **A and B** : Dimer of human 14-3-3 ζ in complex with phospho-serine 10 peptide [46], pdb code: 2c1j, **A** : Full view of the complex. α -helices of the second 14-3-3 protein are shown in orange. The three helices that are involved in the dimerisation of the protein are indicated, **B** : Detailed view of the recognition pocket of the phospho-peptide. Polar and charged residues that contact the phospho-serine are shown together with hydrogen bonds (in yellow). Aromatic residues around the peptide are also shown. No water molecules are present in the binding interface. The position of the Ser+2 and Ser-1 residues of the histone peptide are indicated, **C and D** : Tandem BRCT domains of human MDC1 in complex with a γ H2AX peptide [48], pdb code: 2azm. α -helices of the second BRCT domain are shown in orange, **C** : Full view of the complex, **D** : Detailed view of the recognition pocket of the phosphor-peptide. The three residues in contact with the phosphate group are shown in sticks. The five water molecules in contact with the phospho-serine are shown as pink spheres. The C-terminus of the histone peptide is indicated. The arginine and the glutamate residue that specifically recognize the C-terminus are shown as sticks. Selected hydrogen bounds are shown in yellow.

also determined the 3D structure of 14-3-3 ζ complexed with a phospho-serine 10 histone H3 peptide. As observed for other 14-3-3 proteins bound to phosphopeptides [53], the protein is composed of nine α -helices in a dimeric form. Helices α A, α C and α D contribute to the homodimer interface and the

shape of the dimeric ensemble forms a channel where the peptide lies in an extended conformation (**Figure 3A**). The phosphate group is neutralized by several basic residues, and the binding pocket is protected from water by a series of aromatic residues (**Figure 3B**). The detailed analysis of the structure indicates that a proline at position (Ser+2) with respect to the phospho-serine should be favorable and indeed, KpS₂₈AP has a greater affinity than KpS₁₀TG (78 μ M and 23 μ M respectively), but the structure was solved with the least affine peptide containing the phospho-serine 10. The structure also reveals a weak influence of the acetylation of the adjacent lysine residue (Ser-1) for the binding to 14-3-3 (**Figure 3B**).

Phosphorylation of histone H3 serine 10 and serine 28 was previously described as a mitotic event, and it would be interesting to examine the association of 14-3-3 proteins to chromatin in this context. In quiescent human cells, phosphorylation of histone H3 serine 10 combined with lysine acetylations is observed at specific loci (c-fos and c-jun) upon gene activation [54, 55]. Mahadevan's group reports a significant enrichment of 14-3-3 isoforms at these loci upon gene activation, suggesting that the interaction of 14-3-3 isoforms with phosphorylated histones H3 could occur *in vivo* and recruit 14-3-3 to chromatin.

Tandem BRCT

BRCT domains were first described at the carboxy terminus of the breast cancer protein BRCA1. These domains are found singly or in tandem in numerous proteins implicated in the DNA damage and cell cycle checkpoints [56, 57]. The first high resolution structure of a single BRCT domain was obtained for the human DNA repair protein XRCC1 [58]. In 2003, two proteomic studies found that tandem BRCT domains are phospho-peptide binding motifs that are able to discriminate the phosphorylated state of their binding partners [43, 59]. The molecular basis for this recognition was provided by the structure of the tandem BRCT of BRCA1 in complex with Bach1 or a synthetic peptide [60-62].

In 2005, two studies demonstrated that the tandem BRCT domain of MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) binds to phosphorylated H2AX, a mammalian variant of histone H2A that plays a central role in the signaling of DNA double-strand breaks [47, 48]. Upon DNA damage, H2AX is phosphorylated on serine 139 by the ATM, ATR, or DNA protein kinases. Phosphorylated H2AX is called γ H2AX. This phosphorylation recruits a large number of DNA damage signaling and repair partners [63]. A fragment of histone H2AX phosphorylated at serine 139 has been co-crystallized with the MDC1 tandem BRCT and the X-ray structure of this complex reveals the molecular details of the interaction (**Figure 3B**) [48]. The

phospho-binding mode of the MDC1 tandem BRCT is similar to that already described for the tandem BRCT of BRCA1 in complex with Bach1 [61, 62]. γ H2AX binds in an extended conformation in a groove at the interface between the two BRCT domains (**Figure 3C**). The phosphate group establishes electrostatic interactions and hydrogen bonds with three residues of the first BRCT, a lysine, a threonine and a glycine, and five water molecules (**Figure 3D**).

Using oriented peptide libraries, Jackson and coworkers determined the consensus binding motif of MDC1 which is remarkably similar to the γ H2AX C-terminal sequence [48]. In particular, the position of the C-terminus three residues after the phospho-serine (Ser+3) contributes significantly to the binding affinity. The C-terminus of γ H2AX is recognized by the MDC1 tandem BRCT through a network of hydrogen bonds and electrostatic interactions involving one conserved glutamate and arginine of the first BRCT domain (**Figure 3D**). Interestingly, this feature could be predicted from a structural model of the complex obtained by homology with the previously described tandem BRCT in interaction with a phospho-peptide (BRCA1/BACH1), although the interaction did not involve in this case the C-terminus of the BACH1 peptide. This result suggests that the phospho-serine binding mode of the tandem BRCT could be general and opens perspectives for predicting the binding specificities of other tandem BRCT domains. In the case of MDC1, the detailed structural information allowed the design of both tandem BRCT and γ H2AX mutants to prove that this interaction is needed *in vivo* for the recruitment of MDC1 to DNA damage foci [48]. These studies provide a molecular understanding of the mechanisms that couple DNA damage to chromatin signaling through histone phosphorylation.

4. Unmodified histone tail binding domains

Although less information is available concerning unmodified histone tail binding domains, several studies have pointed out their important functional roles. For this reason, we include the SANT domains in the review of histone tail binding motifs.

SANT domains

SANT domains were first identified as small 50-amino-acid motifs present in four nuclear proteins (Switching defective protein 3, Swi3, Adaptor 2, Ada2, Nuclear receptor co-repressor, N-CoR and Transcription factor IIB, TFIIB) [66]. SANT domains are found in a wide range of histone modifying machines, including several histone acetyl transferases (HAT), histone deacetylases (HDAC), histone methyl transferases (HMT) and chromatin remodeling complexes (see [67] for review), thus suggesting an important role in

chromatin associated functions. Sequence and structure prediction analyses of SANT domains have suggested that they share the same fold as c-Myb repeats [66]. Indeed, the SMART (simple modular architecture research tool) domain classification database does not distinguish between the two domain types, although they may be functionally divergent [67]. c-Myb domains recognize specific DNA sequences and their binding mode to DNA is well characterized (**Figure 4A**) [64, 68]. In contrast, the SANT domains were proposed to bind histone tails [67]. This binding property was established for the second SANT domain of SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors), a subunit of the HDAC3 complex. This SANT domain binds the unacetylated histone H4 tail *in vitro*, but not acetylated tails [69]. The molecular basis for this interaction is not known.

Recently, Muller and coworkers solved the structure of the C-terminal region of the *Drosophila* chromatin remodeling factor ISWI [65]. This region

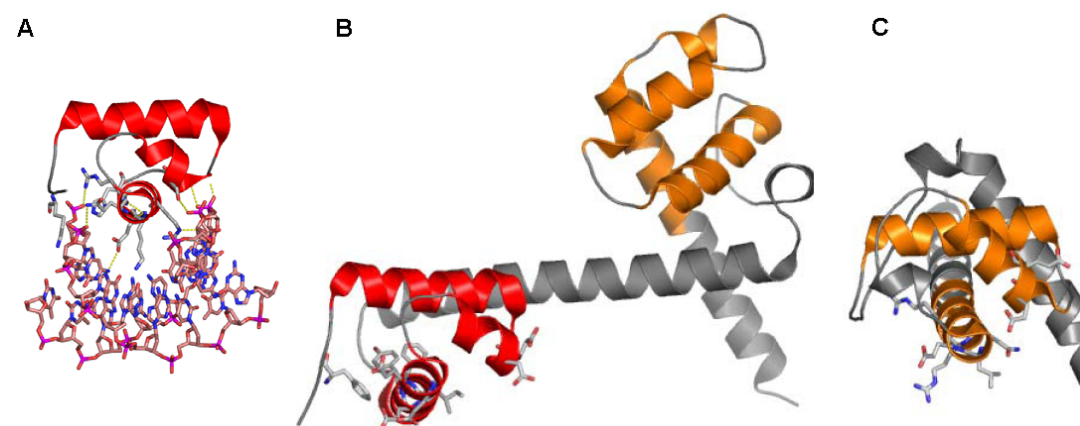


Figure 4. Domains recognizing unmodified histone tails and DNA. Domains are shown with a cartoon representation color coded according to the secondary structure: red or orange α -helices, grey loops. Domain residues are colored by element with a grey color for carbons. **A** : Second c-myb repeat in interaction with DNA [64], pdb code :1h88. The DNA is represented in sticks and atoms are colored by element with a salmon color for carbons. Residues of the domain in contact with the DNA are shown as sticks. **B and C** : C-terminal region of the *Drosophila* ISWI [65], pdb code: 1ofc. The SANT domain α -helices are colored in red whereas SLIDE domain α -helices are colored in orange. Helical insertions are colored in dark grey. **B** : The orientation of the SANT domain corresponds to that of the c-myb second repeat in A. The residues corresponding to the DNA binding residues of c-myb are shown as sticks. It is unlikely that the SANT domain binds DNA similarly to the c-myb second repeat. **C** : The orientation of SANT-like domain SLIDE corresponds to that of the c-myb second repeat in A and of the SANT domain in B. The residues corresponding to the DNA binding residues of c-myb are shown as sticks. The side-chain similarities are consistent with this domain being able to bind DNA.

includes a SANT domain, preceded by a HAND domain which corresponds to a new helical fold, and followed by a SLIDE domain, which shows sequence and structure similarities to the SANT domain. The first high resolution structure of a SANT domain confirms the overall structural similarity to the Myb domains. SANT domains consist of three helices each with a conserved aromatic residue pointing towards the hydrophobic core. In the SANT domain of ISWI as compared to c-myb repeats, the position of the third helix is slightly shifted with respect to the two other helices, and the corresponding DNA binding residues are not conserved (**Figure 4B**). Instead, numerous acidic residues are present that could participate in histone tail binding. The SLIDE domain also superimposes well with the c-myb repeats with an additional helix turn between α_2 and α_3 helices. Structural superimposition reveals that residues corresponding to DNA-contacting residues of c-myb repeats are nearly conserved or conservatively substituted (**Figure 4C**) [65]. Contrary to the SANT domains, the SLIDE domain may thus bind DNA. Simple deletions of the SANT or the SLIDE domains show that, *in vitro*, the SLIDE domain is required for DNA binding as well as for DNA and nucleosome stimulated ATPase activity, nucleosome sliding and nucleosome spacing assays. In contrast, the SANT domain is only required for nucleosome stimulated ATPase activity and nucleosome sliding assays. The double deletion of the SANT and the SLIDE domains impaired nucleosome binding whereas each simple deletion was competent for binding, suggesting that the SLIDE domain binds DNA whereas the SANT domain binds histones. Altogether, these results demonstrate the central role of the SLIDE domain for DNA binding and for stimulating enzymatic activity. In contrast, the SANT module does not appear as absolutely required for ISWI activity *in vitro*.

Several other *in vitro* studies of histone modifying machines have emphasized the critical role of SANT domains for catalytic activity and substrate affinity (for example, the Ada2 subunit of the Gcn5 HAT [70] and the first SANT domain of SMRT [71]). *In vivo*, SANT domains are crucial for the function of Swi3p, Ada2p and the Rsc8p subunits of the yeast SWI/SNF, GCN5 and RSC complexes [70], but it turns out to be difficult to assign a single role for all SANT domains. As in the case of the SANT and the SLIDE domains of ISWI, the SANT1 domain of SMRT regulates the catalytic activity of the enzyme, whereas the SANT2 domain is required for histone tail binding and can not compensate for the loss of SANT1 [69, 71].

To add to the confusion, a recent study suggests that the distinction between SANT and c-myb domains is more blurred than previously thought [67]. Indeed, Leutz and coworkers show that the second repeat of c-myb that was known to bind DNA, the enhancer binding protein β (C/EBP β), and the histone acetyl transferase protein p300, also specifically binds histone H3 and

H3.3 tails [72]. Three oncogenic mutations in the second c-myb repeat found in the retroviral protein v-myb impair its ability to bind the H3 tail and C/EBP β , but not the HAT protein p300. The mutations affect three exposed hydrophobic residues on the opposite side of c-myb relative to the DNA binding site. Mutation of all three residues is critical for abrogating the interaction with the H3 tail, since individual and double substitutions still bind. It is surprising that these mutations modify hydrophobic and not acidic residues (as expected for unmodified histone tail binding), and that these residues are not conserved in other SANT domains known to bind histone tails. Interestingly, the loss of binding of c-myb to H3 tails correlates with the loss of acetylation of c-myb target genes and with the leukemogenic conversion of the oncoprotein variant v-myb. These results suggest that the ability of the second c-myb repeat to bind histone H3 tails would be required for p300 substrate binding and catalytic activity, as shown for other SANT domains [72].

From the above examples, it thus appears that the binding properties of SANT domains are multiple and versatile. Further insights should be brought from structural details of their binding mode to histone tails. Several questions remain open concerning the functional role of SANT domains. They could compete or act in synergy with other histone tail binding motifs, or they could facilitate the enzymatic activity of histone modifying enzymes by modifying histone tail conformations or by interfering with histone tail/DNA interaction.

5. Discussion

Although the domains that recognize histone tails exhibit a wide variety of binding strategies, some common themes can be discerned. A first common feature is the extended conformation of the histone peptide bound to the domain. The unfolded nature of histone tails probably facilitates such conformations. In addition, except for the 14-3-3 binding mode, the binding pockets of all the other modules are shallow and only a limited set of amino acids are commonly involved in the direct binding of the tail. Interaction surfaces are solvated and water molecules take part in the recognition of many modified amino acids such as acetylated lysines or phospho-serines. Hydrophobic interactions are also found to be important and mainly involve aromatic residues (especially in the case of methylated lysines). As illustrated for the chromodomains and the SANT domains, their binding modes can be quite versatile. In accordance with these characteristics, these domains are found to diverge rapidly in sequence and their detection and delimitation may turn out to be quite challenging. The prediction of their binding specificities, i.e., of the sequence motifs surrounding the modified residue is even more challenging. It is still too early to state whether there are more exceptions than

rules in this field, and one can anticipate the identification of novel binding domains for histone tails in the future.

Affinity measurement of domains binding modified histone tails reveals weak to ultra-weak interactions. Low affinities are expected given the limited size of the binding interfaces and the entropic cost of immobilizing the histone tail. In all cases (except for the SANT domains) the affinity for the histone tail is significantly enhanced by the specific posttranslational modification. These low affinities may lead one to question the biological relevance of the interactions observed *in vitro*. However, there are striking examples of ultra-weak interactions playing an important role *in vivo*: the affinity of the yeast GCN5 bromodomain to acetylated histone peptides measured *in vitro* is only 900 μM [10, 11] but this domain is clearly important for the association of SAGA with acetylated chromatin [73]. *In vivo*, the low affinity of histone binding modules for their target may be functionally important. As illustrated by the dynamic association of HP1 with methylated histones, the low affinity allows a fully reversible interaction. This feature is certainly important with regard to the transient nature of post-translational histone modifications. One can imagine that strong binding of a recognition module would definitively block the access of other modifying enzymes to the histone tail. Interestingly, the dissociation of HP1 is achieved by the phosphorylation of the adjacent residue (see above and [25]) which prevents reassociation of the chromodomain with the methylated histone. *In vitro* analyses are important to combine with genetic studies, since the *in vivo* interaction may be indirect. In that light, structural studies provide a wealth of data for the rational design of specific mutants able to disrupt the interaction. Structure-based mutants have been widely used to check the biological significance of the interactions between histone tails and recognition domains.

Histone tail binding modules are present in chromatin-associated complexes as single or as tandem domains. The role of such tandem domains is still an open question. The binding mode of the tandem tudor has not yet been resolved. Interestingly, although chromodomains and tudor domains could be derived from a unique ancestor, the arrangement of the tandem domains is completely different (**Figure 2A** and **Figure 2C**). As illustrated for the tandem chromodomain and the tandem BRCT domains, the association of two domains can create new binding modes where the interface between the two domains plays an important role. In this case, the tandem association provides a larger binding surface and the number of residues of the peptide in contact with the recognition module can be increased. This leads to higher affinity and higher specificity. On the other hand, tandem association allows the recognition of two adjacent modifications (dual binding sites) as proposed for the tandem bromodomains of TAF_{II}250. This possibility is expected since

histone tails present a high concentration of modifications sites. In addition, the histone code appears to rely on several combinations of modifications on a single histone tail or on two histones located in the same nucleosome.

The function of all domains presented in this chapter is neither restricted to histone tail binding nor to the recognition of post-translationally modified residues [74]. In addition to acetyl-lysine recognition, some bromodomains could function as regular protein-protein binding modules [75, 76], and also as DNA-binding modules [77]. Interestingly, mutation of residues involved in acetylated lysine binding also impaired DNA binding. Not all chromodomains may bind methylated lysines since the aromatic cage is not always conserved, as for yeast Esa1, MSL3, and MOF1. Some chromodomains have also been proposed to bind nucleic acids: the chromodomain of MOF, a *Drosophila* histone acetyl transferase, binds RNA. This interaction may target the protein to specific chromosomal sites [78], and the chromo-related chromoshadow domains recognize specifically an unmodified pentapeptide motif [79]. The tandem tudor domains of p53BP1 were also found to bind to DNA *in vitro*, and again, the DNA binding region mapped by NMR was the same as the methylated arginine binding region [15]. The presence of several aromatic residues in the binding interface may account for this result. WD repeats are multifunctional and have been shown to bind highly diverse targets. Some WD repeat proteins also recognize phospho-serines [45]. 14-3-3 proteins are able to interact with atypical sites that are not phosphorylated [80].

For some modifications, the binding modules are still to be identified. A recent phospho-proteomic mass spectrometry approach probed the presence of histone H3 phosphorylated at Thr3 in mitotic human cell extracts [81]. Presently, no binding modules are known for histone phospho-threonines. Although sumoylation of H4 has been shown to mediate gene silencing through recruitment of HDAC and HP1 [82], the domains involved in the recognition of sumoylated histones remain to be identified. This characterization should benefit from the recent determination of a consensus sequence sufficient for interaction in solution with peptides derived from proteins known to interact with SUMO-1 or sumoylated proteins [83].

B. Histone assembly chaperones

Histone chaperones are proteins that associate with histones to facilitate their assembly in chromatin and dissociate afterwards. This terminology was chosen by analogy with other protein chaperones that, generally speaking, associate with a protein target to prevent its misfolding or aggregation and favor its proper folding or its association with other macromolecules. Importantly, protein chaperones are not present in the final assembly. Histone chaperones show a preferential affinity either for H2A/H2B or H3/H4 pairs.

This defines a first classification of histone chaperones. A more functional classification was proposed from their role in regulating histone metabolism [5]: chaperones involved in histone storage, histone targeting to the nucleus, histone buffering in the nucleus, histone assembly in a DNA replication-coupled process and histone assembly in DNA replication-independent processes. However, it appears that the role of each chaperone is partly specific and partly redundant with others, and that the frontiers between each functional class are not as clear as initially thought.

Although multiple histone chaperones have been identified to date [5], structural information is only available for three histone chaperones types : Nucleoplasmin (and nucleoplasmin-like), Nap-1 (Nucleosome assembly protein 1), and Asf1 (Anti-silencing function 1). This section is dedicated to a rapid overview of histone chaperones, the analysis of the known structures, and a description of working hypotheses for histone binding and functional consequences.

1. Histone storage chaperones : Nucleoplasmin, N1/N2

Nucleoplasmin and N1/N2 are two different histone chaperones involved in histone storage of H2A/H2B and H3/H4 respectively [86, 87]. These chaperones are the most abundant proteins in the nuclei of *Xenopus* oocytes [88]. Nucleoplasmin and N1/N2 complexes progressively release histones after fertilization for their assembly into chromatin and play a crucial role in early development. In addition to their storage function, they can mediate nucleosome assembly in the absence of other chaperones [89]. They are not found in yeast, worms or plants. Thus these chaperones have evolved only in higher organisms and are often present in germinal cells.

The crystal structure of three different nucleoplasmin-like proteins have been determined, the N-terminal domain of *Xenopus* nucleoplasmin (Np-core), of *Drosophila* nucleoplasmin (dNLP), and NO38, a *Xenopus* nucleoplasmin-like protein [84, 90, 91]. The three proteins show similar structures and identical arrangements. Each monomer is composed of eight β -strands arranged in two sheets. Five monomers assemble together in a circular pentameric arrangement and two pentamers are tightly packed face to face to form a decameric complex (**Figure 5A**). In each monomer, an acidic stretch between strands β 2 and β 3 is exposed to the surface and could associate with highly basic histone tails. β 4 and β 5 stands form a long hairpin that protrudes out of the surface (**Figure 5A**). The position of this hairpin varies from one isoform to another, suggesting that some rearrangement could occur in this region upon histone binding. Akey and collaborators propose that the decameric arrangement could play a functional role for the binding of H2A/H2B dimers inserted into histone octamers. The decameric Np-core complex

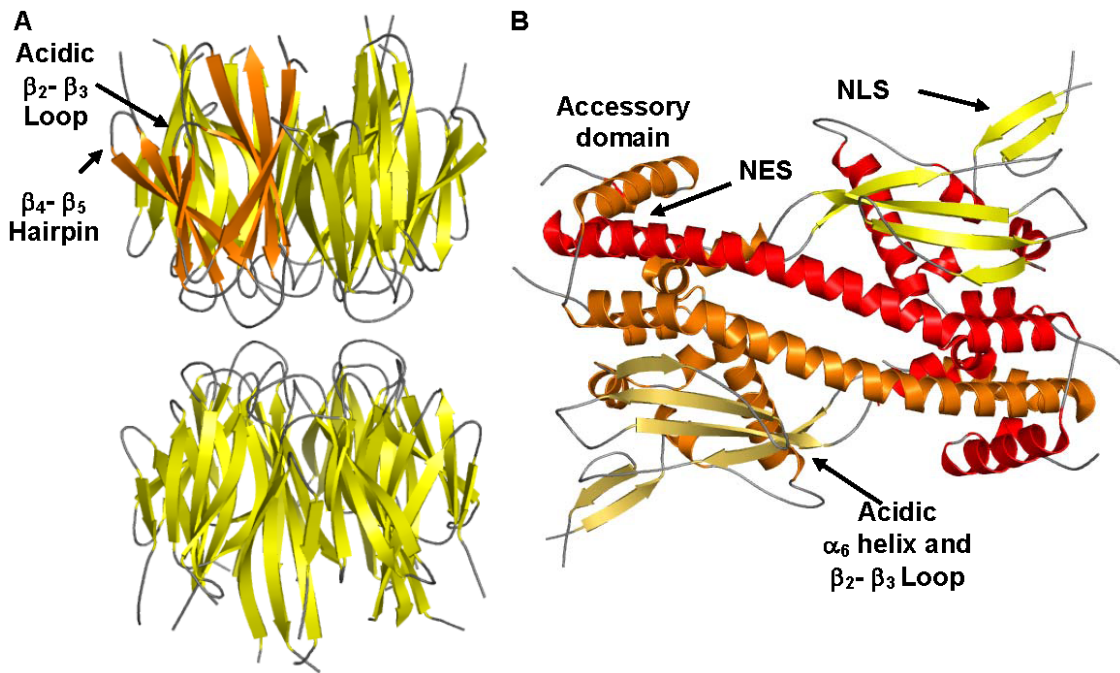


Figure 5. Histone chaperones associated with H2A/H2B. Structures are shown with a cartoon representation color coded according to the secondary structure: red or orange α -helices, yellow or orange β -sheets, grey loops **A** : Crystal structure of the drosophila Nucleoplasmin-like conserved domain NO38 [84], pdb code : 1xe0. Five monomers are assembled in a circular arrangement and two pentamers are tightly packed face to face to form a decameric complex. One monomer is shown in orange. The acidic β_2 - β_3 loop and the exposed β_4 - β_5 hairpin of this monomer are indicated, **B**: Crystal structure of yeast Nap-1 conserved domain [85] pdb code: 2ayu, the protein is dimeric. α -helices and β -sheets of the first monomer are shown in red and yellow respectively, the secondary structures of the second monomer are shown in orange. The nuclear export signal (NES) located at the end of the long dimerization α -helix is partly buried by the accessory domain of the second monomer as indicated. The nuclear localization signal (NLS) of the first monomer is located in the indicated exposed β -hairpin. The acidic region of the second monomer comprising α_6 helix and β_2 - β_3 loop is indicated.

could bind five histone octamers (containing ten H2A/H2B dimers, each nucleoplasmin monomer being associated with one H2A/H2B dimer). However, no experimental information about the histone binding mode of nucleoplasmin-like proteins is available yet.

2. Histone nuclear targeting chaperones : Nap-1

Nap-1 (Nucleosome assembly protein 1) has been proposed to shuttle histones from the cytoplasm to the nucleus. In yeast, this mechanism involves a complex composed of Nap-1, histones H2A/H2B and the karyoprotein Kap114. Kap114 recognizes the nuclear localization signal (NLS) of Nap-1

and crosses the nuclear envelope by associating with the nuclear pore complex [92, 93]. However, this mechanism is quite complex, since Kap114 and other karyoproteins also appear to bind histones and shuttle histones independently from Nap-1 [94, 95]. Nap-1 is also involved in the deposition of H2A/H2B on the nucleosome after H3/H4 deposition in different pathways that may include DNA synthesis dependent and independent pathways [96-98]. Interestingly, Kap114 negatively regulates histone deposition by Nap-1 [92]. In addition to its nucleosome assembly and histone binding activity, yeast Nap-1 is involved in the control of mitotic events through interactions with others partners such as the B type cyclin Clb2 and the protein kinase Gin4 [99, 100].

The high resolution structure of yeast Nap-1 was solved in 2006 [85]. The protein is dimeric. A long α -helix is implicated in most of the dimerization interface and also contains the nuclear export signal (NES). Upon dimerization, this region is partially masked by the accessory domain of the second Nap1 molecule, suggesting that Nap-1 export may require the unmasking of this region (**Figure 5B**). Since nuclear transport is often regulated by phosphorylation, it was suggested that Nap-1 phosphorylation by casein kinase II in the accessory domain could destabilize the masking of the NES and promote the export of the protein to the cytoplasm [85, 101]. On the opposite side, the nuclear localization signal (NLS) is located in a β -hairpin highly exposed to solvent and accessible for interacting with Kap114. Nap-1 also comprises a globular domain composed of a four strand β -sheet packed against three α -helices. This domain is stabilized by a network of aromatic residues.

Little information concerning the histone binding mode of Nap-1 is available. *In vitro*, Nap-1 interacts with all core histones (H2A/H2B and H3/H4) with no preferences [102, 103]. Histone tails may play a role in histone selectivity, but surprisingly, *in vitro*, Nap-1 prefers the H3/H4 tetramer to the H2A/H2B dimer. This preference is achieved by a direct interaction of Nap-1 with histone H3 and H4 tails, but not histone H2A and H2B tails [102]. In contrast, *in vivo*, Nap-1 is mainly associated with H2A/H2B [92]. The persistent association of Nap-1 with the karyoprotein Kap114 which binds histone H2A tails could account for this paradox [92]. Based on the clustering of numerous acidic residues in helix α 6 and in the loop connecting strands β 3 and β 4 of Nap-1, Luger and coworkers suggest that this region could be involved in neutralizing histone tails, but no experimental data are available concerning the Nap-1 histone binding mode.

3. Histone buffering in the nucleus: Asf1

In the nucleus, histones H3/H4 are associated with several histone chaperones, including Asf1 (anti-silencing function 1). In *Drosophila*, this

complex called RCAF (replication-coupling assembly factor), facilitates replication coupled assembly of nucleosomes with the histone chaperone CAF-1 (Chromatin assembly factor -1, see below) [104, 105]. During the S-phase of the cell cycle, newly synthesized H3/H4 histones are associated with Asf1 in a complex including other histone chaperones that has a high chromatin assembly capacity. Asf1 may bind soluble H3/H4 complexes and keep them in a state where they can be rapidly incorporated into chromatin without exhibiting the toxic effects associated with the accumulation of free histones in cells [106]. Asf1 also appears to be linked to gene silencing [107][108] and to DNA replication independent nucleosome assembly and disassembly pathways [109, 110]. Since Asf1 interacts independently with two specialized histone assembly chaperones, CAF-1 [104, 111] and the Hir proteins (Histone regulation, see below) [110, 112], Asf1 may be positioned to coordinate the action of different histone assembly and disassembly pathways [109, 113]. Asf1 is also necessary for the cellular response to DNA damage. In yeast, Asf1 interacts with the checkpoint kinase Rad53 which coordinates cell cycle arrest after DNA damage [114, 115].

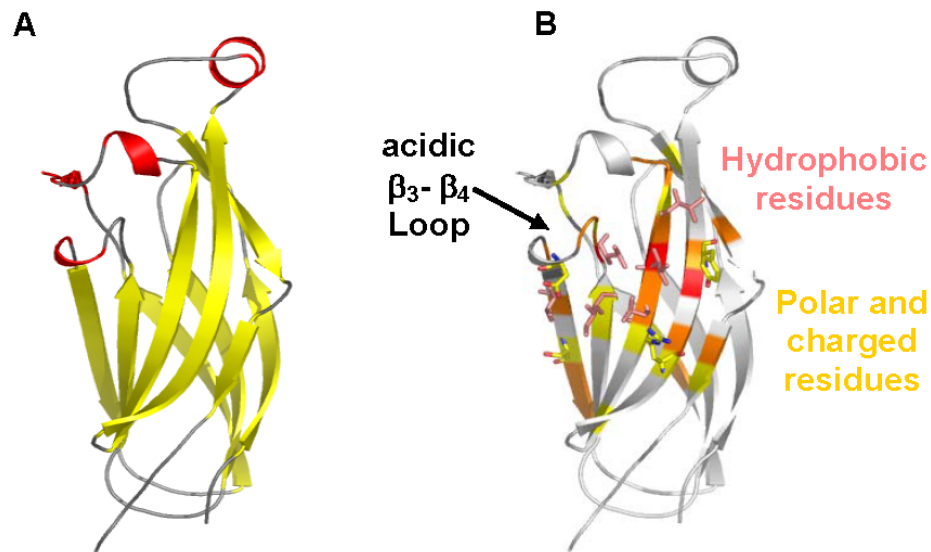


Figure 6. Structure of hAsf1a, an H3/H4 histone chaperone. A and B : NMR structure of the conserved domain of human Asf1a [116], pdb code: 1tey, **A :** The structure is shown with a cartoon representation color coded according to the secondary structure: red for α -helices, yellow for β -sheets, grey for loops, **B :** The structure is shown with the same orientation as in A. The cartoon is color coded according to the chemical shift perturbation upon binding of the C-terminal helix of histone H3. Highly affected residues are shown in red, less affected residues in orange, slightly affected in yellow and not affected in grey. Exposed residues of the binding interface are shown as sticks, hydrophobic residues are colored in salmon, polar and charged residues are colored by element with a yellow color for carbons. The acidic loop β_3 - β_4 is indicated.

The structure of the conserved core of human and yeast Asf1 has been solved by NMR and crystallography, respectively [116, 117]. The structure comprises ten β -strands organized into an immunoglobulin-like fold composed of three β -sheets topped by two short α helices (**Figure 6A**). Asf1 interacts with the C-terminus of the histone H3 core [118]. The structural basis for this interaction has been characterized by NMR [116]. The C-terminal helix of histone H3 interacts with a well-conserved hydrophobic groove of Asf1 surrounded by charged residues (**Figure 6B**). In close proximity, an acidic stretch between strands β 3 and β 4 is exposed to the surface. This study constitutes the first characterization of the binding interface of a histone chaperone with its target. Point mutations of residues within the interface have highlighted the importance of hydrophobic residues for histone binding. The large participation of hydrophobic residues to the binding of histone was quite surprising since it was previously thought that histone chaperone association with histones would involve mainly electrostatic interactions. The significant contribution of hydrophobic residues at the interface probably ensures the specificity of the interaction. A high resolution structure of the interface should provide more information about the mechanism of histone storage and assembly by Asf1. *In vivo* mutations disrupting the interaction of yeast Asf1 with histones H3/H4 led to transcriptional silencing defects, DNA damage sensitivity, and thermo sensitive growth, suggesting that histone binding is required for almost all Asf1 functions.

4. Histone assembly chaperones: CAF-1, HirA

Most nucleosome assembly in proliferating cells is tightly coupled to DNA synthesis. CAF-1 (Chromatin assembly factor -1) is the chaperone responsible for histone H3/H4 assembly coupled to DNA synthesis and to DNA damage repair [119-122]. CAF-1 is composed of three subunits (human p150/p60/RbAp48, corresponding respectively to Cac1, Cac2, and Cac3 in yeast) [123]. The association of CAF-1 with the replication fork is maintained by its interaction with PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), a polymerase processivity factor that forms sliding clamps around DNA [124]. CAF-1 also plays a role in gene silencing [125-127] and associates with heterochromatin protein HP1 [128]. The molecular basis for this interaction is well documented, but is out of the scope of this review since only a five residue peptide from CAF is involved in the interaction [129, 130]. No high resolution data concerning the entire CAF-1 complex is available and biochemical data provide a poor understanding of the molecular mechanisms associated with its histone chaperone activity [120, 131-133]. A recent high throughput study of cellular complexes by cryo-electron microscopy mentioned the CAF-1 complex among the targets with data of promising

quality for soon obtaining a low resolution structure of the CAF-1 complex [134].

The histone chaperone HirA (Histone regulation) is mainly involved in integration of H3/H4 histones into chromatin independently of DNA synthesis [135, 136]. It plays a role in gene silencing and appears to be redundant with CAF-1 for some of its functions [110, 125, 137, 138]. Both chaperones show sequence similarities (CAF-1 p60 and HirA [125]), interact with each other (CAF-1 p48 with HirA [139]), and both interact with Asf1 [104, 110-112]. HirA and Asf1, but not CAF-1, regulate histone gene transcription [140, 141]. Finally, HirA is also partly redundant with histone chaperones FACT (facilitates chromatin transcription) and Spt6 which are involved in nucleosome assembly coupled to transcription [142-146].

A model has been proposed for nucleosome disassembly and assembly coupled to transcription elongation [147]. In this model, histone chaperones FACT and Spt6 facilitate the passage of the polymerase II through nucleosomes by destabilizing the contacts between H2A/H2B dimers and H3/H4 tetramers, dissociating the octamer from DNA and repositioning the octamer immediately behind the polymerase. In this model, H2A/H2B dimers would be taken in charge by FACT and H3/H4 tetramers by Spt6. Other histone chaperone and chromatin remodeling factors may also contribute to the process. The molecular basis for this proposed mechanism is still unknown. There is currently no strong indication that HirA functions in a similar pathway.

5. Discussion

As illustrated above, the structural biology of histone chaperones is at its beginning. Only a few structures have been solved and the molecular basis for histone binding still lacks high resolution data. This can be explained by the experimental difficulties in manipulating highly charged proteins such as histone chaperones and histones. In addition, the association of histone chaperones with their targets is by nature transient, since they have to dissociate after nucleosome assembly. The dynamic nature of the interaction may hinder the crystallization process. Despite their specificities, histone chaperones exhibit common features that are discussed below.

Several histone chaperones present long stretches of consecutive acidic residues that can reach up to 70 residues, as in yeast Asf1 [5]. The role of these acidic stretches is still an open question. It has been proposed that the long acidic tails could play an important role in the histone assembly process [148, 149]. This hypothesis refers to several *in vitro* assembly experiments showing that the simple mixing of DNA with histones leads to non-specific aggregation. Conversely, the addition of either high salt or polyacidic peptides allowed core

histones to assemble into nucleosome core particles on DNA [149]. The acidic tails are not always present in the sequence of higher eukaryotic histone chaperones, but they can be replaced by post-translational polyglutamylations as for human Nap-1 [150]. Thus, the long acidic tails of histone chaperones could be directly involved in the histone assembly process by preventing aggregation of DNA with histones in a non-specific manner. The acidic tail of human FACT is required for its activity in transcription-coupled nucleosome assembly *in vitro* [145]. In contrast, the acidic domains in Nap1, Nucleoplasmin, and yeast Asf1 chaperones are not essential for their chaperoning function *in vitro* and *in vivo* [102, 117, 151, 152]. The acidic tail of yeast Nap-1 only slightly increases the stability of the complex with histones [85], [102]. Interestingly, deletion of the acidic tail of FACT abrogates its ability to dissociate H2A/H2B dimers from H3/H4 tetramers and this disassembly is required for transcription coupled FACT activity [145]. Thus, rather than participating in nucleosome assembly, the acidic tail of histone chaperones could be important for nucleosome disassembly.

Beside these long acidic tails, the known histone chaperone structures present short acidic loops (**Figure 5A**, **Figure 5B**, and **Figure 6B**) that could neutralize histone tails. However, the direct participation of histone N-terminal tails to histone chaperone binding has not been clearly established. The N terminal tails of histones H3 and H4 are not required for nucleosome assembly by CAF-1 *in vitro* [131], but functional CAF-1 complexes *in vivo* contain histones H3 and H4 modified with a specific acetylation pattern characteristic of newly synthesized histones [153, 154]. The direct involvement of CAF-1 in the recognition of modified histone tails remains an open question.

The interaction of histone chaperones with the folded domain of histones appears to be a general property [118, 120, 132, 133, 135, 136, 155]. In addition, when the binding region has been more precisely mapped, it corresponds to regions of histones that are buried in the entire nucleosome: the CAF-1 small subunit, Rbp48, binds helix $\alpha 1$ of histone H4 [132, 133], and Asf1 binds histone H3 helices $\alpha 2$ and $\alpha 3$ [118]. The precise binding region of FACT has not been determined, but interestingly, FACT has a reduced affinity for the nucleosome compared to its affinity for isolated H2A/H2B dimers or H3/H4 tetramers [143, 145]. The histone binding site of Asf1 has been mapped by NMR [116] and unexpectedly involves mainly hydrophobic residues and conserved charged positions. The interaction of Asf1 with H3/H4 histones appears to be highly specific. The mechanism for nucleosome assembly by histone chaperones could thus involve the interaction with histones surfaces that become exposed to solvent when the histone is not assembled in the nucleosome. Such binding interfaces would be buried after nucleosome assembly and would release the chaperone from the nucleosome.

The multimeric states of histone chaperones may be functionally important. Nucleoplasmin-like chaperones arrange in a decameric complex that likely promotes the generation of high avidity, stable Nucleoplasmin-histone complexes for embryonic histone storage [148]. The stable Nap-1 dimer provides two binding sites for the two H2A/H2B dimers of the nucleosome. The monomeric state of Asf1 is clearly established, but the stoichiometry of the complex with histones H3/H4 is still an open question. Asf1 could bind the hetero-tetrameric or dimeric form of histones H3/H4. The H3/H4 tetramers are very stable after their deposition onto DNA, and do not seem to dissociate readily into heterodimers when they are redistributed between DNA strands during the S phase of the cell cycle [156]. Unexpectedly, soluble predeposition complexes purified from HeLa cells using tagged H3.1 and H3.3 appear to contain heterodimeric forms of H3/H4 in association with a series of other proteins including Asf1 and either CAF-I or HirA respectively [113]. It is thus possible that deposition of H3/H4 heterotetramers is accomplished by the concerted deposition of two H3/H4 heterodimers. This hypothesis is reinforced by the recent description of a dimeric form of H3/H4 associated with Asf1 in a recombinant complex produced by co-expression of all three proteins in *E. coli* [157]. Nevertheless, it remains possible that Asf1 is associated with heterotetrameric forms of H3/H4 in some complexes within eukaryotic cells. Determining the structure of H3/H4 complexes with its various chaperones will be crucial in understanding the nucleosome assembly mechanisms used in cells.

C. Conclusion

Throughout this structural overview of histones-associated proteins, we first presented the different known histone tail binding domains. Histone tail binding domains are mainly found in molecular machines that harbor various enzymatic activities such as histone acetylation, deacetylation, methylation, or chromatin remodeling. In these complexes, they can either target the whole machinery to specific chromatin loci, modulate its enzymatic activity, or they can protect chromatin against other modifications. The structural features responsible for the specific recognition of the histone modifications are well documented for acetylated-lysine by bromodomains, for methylated-lysines by chromodomains and for phospho-serine by 14-3-3 and tandem BRCT domains. These studies have greatly contributed to unraveling the molecular basis of the epigenetic code. Nevertheless, as illustrated in this review, numerous questions remain unanswered and further structural studies associated with functional characterizations will be needed for the field to progress. In our overview of histone chaperones, we highlighted their ability to associate with each other. Furthermore, histone chaperones are also tightly coupled to other chromatin

associated proteins, including histone tail binding modules. For example, Asf1 interacts with the tandem bromodomains of TAF_{II}250 [76], a subunit of the transcription factor TF_{II}D, with the *Drosophila* chromatin remodeling Brahma complex [158], and with the Sas2 histone acetyl transferase complex (HAT) [108, 126]. Along these lines, CAF-1 p150 interacts with the chromoshadow domain of HP1. These observations demonstrate that the functional framework of histone binding partners is best viewed as an interacting network of histone chaperones and histone-associated proteins.

Bibliography

1. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. 1997, *Nature*, 389, 251-60.
2. Ramakrishnan, V., Finch, J. T., Graziano, V., Lee, P. L., and Sweet, R. M. 1993, *Nature*, 362, 219-23.
3. de la Cruz, X., Lois, S., Sanchez-Molina, S., and Martinez-Balbas, M. A. 2005, *Bioessays*, 27, 164-75.
4. Jenuwein, T., and Allis, C. D. 2001, *Science*, 293, 1074-80.
5. Loyola, A., and Almouzni, G. 2004, *Biochim Biophys Acta*, 1677, 3-11.
6. Verreault, A. 2000, *Genes Dev*, 14, 1430-8.
7. Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. 1999, *Nature*, 399, 491-6.
8. Haynes, S. R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., and Dawid, I. B. 1992, *Nucleic Acids Res*, 20, 2603.
9. Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R. 1997, *Trends Biochem Sci*, 22, 151-3.
10. Owen, D. J., Ornaghi, P., Yang, J. C., Lowe, N., Evans, P. R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., and Travers, A. A. 2000, *Embo J*, 19, 6141-9.
11. Hudson, B. P., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., and Wright, P. E. 2000, *J Mol Biol*, 304, 355-70.
12. Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S., and Tjian, R. 2000, *Science*, 288, 1422-5.
13. Kanno, T., Kanno, Y., Siegel, R. M., Jang, M. K., Lenardo, M. J., and Ozato, K. 2004, *Mol Cell*, 13, 33-43.
14. Kasten, M., Szerlong, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Werner, M., and Cairns, B. R. 2004, *Embo J*, 23, 1348-59.
15. Charier, G., Couprie, J., Alpha-Bazin, B., Meyer, V., Quemeneur, E., Guerois, R., Callebaut, I., Gilquin, B., and Zinn-Justin, S. 2004, *Structure*, 12, 1551-62.
16. Jacobs, S. A., and Khorasanizadeh, S. 2002, *Science*, 295, 2080-3.
17. Flanagan, J. F., Mi, L. Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K. L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., and Khorasanizadeh, S. 2005, *Nature*, 438, 1181-5.
18. Paro, R., and Hogness, D. S. 1991, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 263-7.
19. Jones, D. O., Cowell, I. G., and Singh, P. B. 2000, *Bioessays*, 22, 124-37.
20. Ball, L. J., Murzina, N. V., Broadhurst, R. W., Raine, A. R., Archer, S. J., Stott, F. J., Murzin, A. G., Singh, P. B., Domaille, P. J., and Laue, E. D. 1997, *Embo J*, 16, 2473-81.

21. Messmer, S., Franke, A., and Paro, R. 1992, *Genes Dev*, 6, 1241-54.
22. Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. 2001, *Nature*, 410, 120-4.
23. Nielsen, P. R., Nietlispach, D., Mott, H. R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A. G., Murzina, N. V., and Laue, E. D. 2002, *Nature*, 416, 103-7.
24. Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H., and Allis, C. D. 2005, *Nature*, 438, 1116-22.
25. Hirota, T., Lipp, J. J., Toh, B. H., and Peters, J. M. 2005, *Nature*, 438, 1176-80.
26. Cheutin, T., McNairn, A. J., Jenuwein, T., Gilbert, D. M., Singh, P. B., and Misteli, T. 2003, *Science*, 299, 721-5.
27. Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E., and Sauer, F. 2002, *Nature*, 419, 857-62.
28. Daujat, S., Zeissler, U., Waldmann, T., Happel, N., and Schneider, R. 2005, *J Biol Chem*, 280, 38090-5.
29. Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D., and Khorasanizadeh, S. 2003, *Genes Dev*, 17, 1870-81.
30. Ponting, C. P. 1997, *Trends Biochem Sci*, 22, 51-2.
31. Raker, V. A., Hartmuth, K., Kastner, B., and Luhrmann, R. 1999, *Mol Cell Biol*, 19, 6554-65.
32. Selenko, P., Sprangers, R., Stier, G., Buhler, D., Fischer, U., and Sattler, M. 2001, *Nat Struct Biol*, 8, 27-31.
33. Maurer-Stroh, S., Dickens, N. J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., and Ponting, C. P. 2003, *Trends Biochem Sci*, 28, 69-74.
34. Sprangers, R., Groves, M. R., Sinning, I., and Sattler, M. 2003, *J Mol Biol*, 327, 507-20.
35. Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A., Jr., Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Petty, T. J., Sheston, E. A., Mellert, H. S., Stavridi, E. S., and Halazonetis, T. D. 2004, *Nature*, 432, 406-11.
36. Kim, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., Zhang, Y., and Bedford, M. T. 2006, *EMBO Rep*.
37. Fong, H. K., Hurley, J. B., Hopkins, R. S., Miake-Lye, R., Johnson, M. S., Doolittle, R. F., and Simon, M. I. 1986, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 2162-6.
38. Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E. J. 1999, *Trends Biochem Sci*, 24, 181-5.
39. Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. 1995, *Cell*, 83, 1047-58.
40. Fulop, V., and Jones, D. T. 1999, *Curr Opin Struct Biol*, 9, 715-21.
41. Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H., and Allis, C. D. 2005, *Cell*, 121, 859-72.
42. Elia, A. E., Rellos, P., Haire, L. F., Chao, J. W., Ivins, F. J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., and Yaffe, M. B. 2003, *Cell*, 115, 83-95.
43. Manke, I. A., Lowery, D. M., Nguyen, A., and Yaffe, M. B. 2003, *Science*, 302, 636-9.

44. Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. 2005, *Genes Dev*, 19, 1401-15.
45. Yaffe, M. B., and Elia, A. E. 2001, *Curr Opin Cell Biol*, 13, 131-8.
46. Macdonald, N., Welburn, J. P., Noble, M. E., Nguyen, A., Yaffe, M. B., Clynes, D., Moggs, J. G., Orphanides, G., Thomson, S., Edmunds, J. W., Clayton, A. L., Endicott, J. A., and Mahadevan, L. C. 2005, *Mol Cell*, 20, 199-211.
47. Lee, M. S., Edwards, R. A., Thede, G. L., and Glover, J. N. 2005, *J Biol Chem*, 280, 32053-6.
48. Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., and Jackson, S. P. 2005, *Cell*, 123, 1213-26.
49. Boxer, L. A., Richardson, S., and Floyd, A. 1976, *Nature*, 263, 249-51.
50. Aitken, A. 1995, *Trends Biochem Sci*, 20, 95-7.
51. Xiao, B., Smerdon, S. J., Jones, D. H., Dodson, G. G., Soneji, Y., Aitken, A., and Gamblin, S. J. 1995, *Nature*, 376, 188-91.
52. Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M., and Shaw, A. S. 1996, *Cell*, 84, 889-97.
53. Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J., and Cantley, L. C. 1997, *Cell*, 91, 961-71.
54. Barratt, M. J., Hazzalin, C. A., Cano, E., and Mahadevan, L. C. 1994, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4781-5.
55. Clayton, A. L., Rose, S., Barratt, M. J., and Mahadevan, L. C. 2000, *Embo J*, 19, 3714-26.
56. Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A. F., Altschul, S. F., and Koonin, E. V. 1997, *Faseb J*, 11, 68-76.
57. Callebaut, I., and Mornon, J. P. 1997, *FEBS Lett*, 400, 25-30.
58. Zhang, X., Morera, S., Bates, P. A., Whitehead, P. C., Coffey, A. I., Hainbucher, K., Nash, R. A., Sternberg, M. J., Lindahl, T., and Freemont, P. S. 1998, *Embo J*, 17, 6404-11.
59. Yu, X., Chini, C. C., He, M., Mer, G., and Chen, J. 2003, *Science*, 302, 639-42.
60. Clapperton, J. A., Manke, I. A., Lowery, D. M., Ho, T., Haire, L. F., Yaffe, M. B., and Smerdon, S. J. 2004, *Nat Struct Mol Biol*, 11, 512-8.
61. Shiozaki, E. N., Gu, L., Yan, N., and Shi, Y. 2004, *Mol Cell*, 14, 405-12.
62. Williams, R. S., Lee, M. S., Hau, D. D., and Glover, J. N. 2004, *Nat Struct Mol Biol*, 11, 519-25.
63. Thiriet, C., and Hayes, J. J. 2005, *Mol Cell*, 18, 617-22.
64. Tahirov, T. H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S., and Ogata, K. 2002, *Cell*, 108, 57-70.
65. Grune, T., Brzeski, J., Eberharter, A., Clapier, C. R., Corona, D. F., Becker, P. B., and Muller, C. W. 2003, *Mol Cell*, 12, 449-60.
66. Aasland, R., Stewart, A. F., and Gibson, T. 1996, *Trends Biochem Sci*, 21, 87-8.
67. Boyer, L. A., Latek, R. R., and Peterson, C. L. 2004, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 158-63.
68. Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S., and Nishimura, Y. 1994, *Cell*, 79, 639-48.
69. Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M. G., and Lazar, M. A. 2003, *Embo J*, 22, 3403-10.

70. Boyer, L. A., Langer, M. R., Crowley, K. A., Tan, S., Denu, J. M., and Peterson, C. L. 2002, *Mol Cell*, 10, 935-42.
71. Guenther, M. G., Barak, O., and Lazar, M. A. 2001, *Mol Cell Biol*, 21, 6091-101.
72. Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Laumonier, Y., Xu, H., and Leutz, A. 2005, *Genes Dev*, 19, 2447-57.
73. Hassan, A. H., Prochasson, P., Neely, K. E., Galasinski, S. C., Chandy, M., Carrozza, M. J., and Workman, J. L. 2002, *Cell*, 111, 369-79.
74. Yang, X. J. 2004, *Bioessays*, 26, 1076-87.
75. Barlev, N. A., Poltoratsky, V., Owen-Hughes, T., Ying, C., Liu, L., Workman, J. L., and Berger, S. L. 1998, *Mol Cell Biol*, 18, 1349-58.
76. Chimura, T., Kuzuhara, T., and Horikoshi, M. 2002, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 9334-9.
77. Remboutsika, E., Yamamoto, K., Harbers, M., and Schmutz, M. 2002, *J Biol Chem*, 277, 50318-25.
78. Akhtar, A., Zink, D., and Becker, P. B. 2000, *Nature*, 407, 405-9.
79. Smothers, J. F., and Henikoff, S. 2000, *Curr Biol*, 10, 27-30.
80. Seimiya, H., Sawada, H., Muramatsu, Y., Shimizu, M., Ohko, K., Yamane, K., and Tsuruo, T. 2000, *Embo J*, 19, 2652-61.
81. Garcia, B. A., Barber, C. M., Hake, S. B., Ptak, C., Turner, F. B., Busby, S. A., Shabanowitz, J., Moran, R. G., Allis, C. D., and Hunt, D. F. 2005, *Biochemistry*, 44, 13202-13.
82. Shii, Y., and Eisenman, R. N. 2003, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13225-30.
83. Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G., and Chen, Y. 2004, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14373-8.
84. Namboodiri, V. M., Akey, I. V., Schmidt-Zachmann, M. S., Head, J. F., and Akey, C. W. 2004, *Structure*, 12, 2149-60.
85. Park, Y. J., and Luger, K. 2006, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1248-53.
86. Dilworth, S. M., Black, S. J., and Laskey, R. A. 1987, *Cell*, 51, 1009-18.
87. Philpott, A., and Leno, G. H. 1992, *Cell*, 69, 759-67.
88. Mills, A. D., Laskey, R. A., Black, P., and De Robertis, E. M. 1980, *J Mol Biol*, 139, 561-8.
89. Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D., and Finch, J. T. 1978, *Nature*, 275, 416-20.
90. Dutta, S., Akey, I. V., Dingwall, C., Hartman, K. L., Laue, T., Nolte, R. T., Head, J. F., and Akey, C. W. 2001, *Mol Cell*, 8, 841-53.
91. Namboodiri, V. M., Dutta, S., Akey, I. V., Head, J. F., and Akey, C. W. 2003, *Structure*, 11, 175-86.
92. Mosammaparast, N., Del Rosario, B. C., and Pemberton, L. F. 2005, *Mol Cell Biol*, 25, 1764-78.
93. Mosammaparast, N., Ewart, C. S., and Pemberton, L. F. 2002, *Embo J*, 21, 6527-38.
94. Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Pemberton, L. F. 2002, *J Biol Chem*, 277, 862-8.
95. Mosammaparast, N., Jackson, K. R., Guo, Y., Brame, C. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Pemberton, L. F. 2001, *J Cell Biol*, 153, 251-62.
96. Chang, L., Loranger, S. S., Mizzen, C., Ernst, S. G., Allis, C. D., and Annunziato, A. T. 1997, *Biochemistry*, 36, 469-80.

97. Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R., and Kadonaga, J. T. 1996, *Mol Cell Biol*, 16, 3112-24.
98. Levchenko, V., and Jackson, V. 2004, *Biochemistry*, 43, 2359-72.
99. Altman, R., and Kellogg, D. 1997, *J Cell Biol*, 138, 119-30.
100. Shimizu, Y., Akashi, T., Okuda, A., Kikuchi, A., and Fukui, K. 2000, *Gene*, 246, 395-404.
101. Li, M., Strand, D., Krehan, A., Pyerin, W., Heid, H., Neumann, B., and Mechler, B. M. 1999, *J Mol Biol*, 293, 1067-84.
102. McBryant, S. J., Park, Y. J., Abernathy, S. M., Laybourn, P. J., Nyborg, J. K., and Luger, K. 2003, *J Biol Chem*, 278, 44574-83.
103. McQuibban, G. A., Commisso-Cappelli, C. N., and Lewis, P. N. 1998, *J Biol Chem*, 273, 6582-90.
104. Mello, J. A., Sillje, H. H., Roche, D. M., Kirschner, D. B., Nigg, E. A., and Almouzni, G. 2002, *EMBO Rep*, 3, 329-34.
105. Tyler, J. K., Adams, C. R., Chen, S. R., Kobayashi, R., Kamakaka, R. T., and Kadonaga, J. T. 1999, *Nature*, 402, 555-60.
106. Groth, A., Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Lukas, J., Bartek, J., and Almouzni, G. 2005, *Mol Cell*, 17, 301-11.
107. Le, S., Davis, C., Konopka, J. B., and Sternglanz, R. 1997, *Yeast*, 13, 1029-42.
108. Osada, S., Sutton, A., Muster, N., Brown, C. E., Yates, J. R., 3rd, Sternglanz, R., and Workman, J. L. 2001, *Genes Dev*, 15, 3155-68.
109. Adkins, M. W., Howar, S. R., and Tyler, J. K. 2004, *Mol Cell*, 14, 657-66.
110. Sharp, J. A., Fouts, E. T., Krawitz, D. C., and Kaufman, P. D. 2001, *Curr Biol*, 11, 463-73.
111. Tyler, J. K., Collins, K. A., Prasad-Sinha, J., Amiott, E., Bulger, M., Harte, P. J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J. T. 2001, *Mol Cell Biol*, 21, 6574-84.
112. 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. 2005, *Dev Cell*, 8, 19-30.
113. Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. 2004, *Cell*, 116, 51-61.
114. Emili, A., Schieltz, D. M., Yates, J. R., 3rd, and Hartwell, L. H. 2001, *Mol Cell*, 7, 13-20.
115. Hu, F., Alcasabas, A. A., and Elledge, S. J. 2001, *Genes Dev*, 15, 1061-6.
116. Mousson, F., Lautrette, A., Thuret, J. Y., Agez, M., Courbeyrette, R., Amigues, B., Becker, E., Neumann, J. M., Guerois, R., Mann, C., and Ochsenbein, F. 2005, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5975-80.
117. Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Lam, W. M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A. A., Brill, S. J., Adams, P. D., Berger, J. M., and Kaufman, P. D. 2003, *Curr Biol*, 13, 2148-58.
118. Munakata, T., Adachi, N., Yokoyama, N., Kuzuhara, T., and Horikoshi, M. 2000, *Genes Cells*, 5, 221-33.
119. Gaillard, P. H., Martini, E. M., Kaufman, P. D., Stillman, B., Moustacchi, E., and Almouzni, G. 1996, *Cell*, 86, 887-96.
120. Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N., and Stillman, B. 1995, *Cell*, 81, 1105-14.

121. Lewis, L. K., Karthikeyan, G., Cassiano, J., and Resnick, M. A. 2005, *Nucleic Acids Res*, 33, 4928-39.
122. Linger, J., and Tyler, J. K. 2005, *Genetics*, 171, 1513-22.
123. Ridgway, P., and Almouzni, G. 2000, *J Cell Sci*, 113 (Pt 15), 2647-58.
124. Tsurimoto, T. 1998, *Biochim Biophys Acta*, 1443, 23-39.
125. Kaufman, P. D., Cohen, J. L., and Osley, M. A. 1998, *Mol Cell Biol*, 18, 4793-806.
126. Meijnsing, S. H., and Ehrenhofer-Murray, A. E. 2001, *Genes Dev*, 15, 3169-82.
127. Tchenio, T., Casella, J. F., and Heidmann, T. 2001, *Mol Cell Biol*, 21, 1953-61.
128. Murzina, N., Verreault, A., Laue, E., and Stillman, B. 1999, *Mol Cell*, 4, 529-40.
129. Quivy, J. P., Roche, D., Kirschner, D., Tagami, H., Nakatani, Y., and Almouzni, G. 2004, *Embo J*, 23, 3516-26.
130. Thiru, A., Nietlispach, D., Mott, H. R., Okuwaki, M., Lyon, D., Nielsen, P. R., Hirshberg, M., Verreault, A., Murzina, N. V., and Laue, E. D. 2004, *Embo J*, 23, 489-99.
131. Shibahara, K., Verreault, A., and Stillman, B. 2000, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7766-71.
132. Vermaak, D., Wade, P. A., Jones, P. L., Shi, Y. B., and Wolffe, A. P. 1999, *Mol Cell Biol*, 19, 5847-60.
133. Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R., and Stillman, B. 1998, *Curr Biol*, 8, 96-108.
134. Aloy, P., Bottcher, B., Ceulemans, H., Leutwein, C., Mellwig, C., Fischer, S., Gavin, A. C., Bork, P., Superti-Furga, G., Serrano, L., and Russell, R. B. 2004, *Science*, 303, 2026-9.
135. Lorain, S., Quivy, J. P., Monier-Gavelle, F., Scamps, C., Lecluse, Y., Almouzni, G., and Lipinski, M. 1998, *Mol Cell Biol*, 18, 5546-56.
136. Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Scamps, C., Martini, E. M., Lipinski, M., and Almouzni, G. 2002, *Mol Cell*, 9, 1091-100.
137. Krawitz, D. C., Kama, T., and Kaufman, P. D. 2002, *Mol Cell Biol*, 22, 614-25.
138. Sharp, J. A., Franco, A. A., Osley, M. A., and Kaufman, P. D. 2002, *Genes Dev*, 16, 85-100.
139. Ahmad, A., Takami, Y., and Nakayama, T. 2003, *Biochem Biophys Res Commun*, 312, 1266-72.
140. Spector, M. S., Raff, A., DeSilva, H., Lee, K., and Osley, M. A. 1997, *Mol Cell Biol*, 17, 545-52.
141. Sutton, A., Bucaria, J., Osley, M. A., and Sternglanz, R. 2001, *Genetics*, 158, 587-96.
142. Formosa, T., Ruone, S., Adams, M. D., Olsen, A. E., Eriksson, P., Yu, Y., Rhoades, A. R., Kaufman, P. D., and Stillman, D. J. 2002, *Genetics*, 162, 1557-71.
143. Orphanides, G., Wu, W. H., Lane, W. S., Hampsey, M., and Reinberg, D. 1999, *Nature*, 400, 284-8.
144. Adkins, M. W., and Tyler, J. K. 2006, *Mol Cell*, 21, 405-16.
145. Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M., and Reinberg, D. 2003, *Science*, 301, 1090-3.
146. Kaplan, C. D., Laprade, L., and Winston, F. 2003, *Science*, 301, 1096-9.
147. Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. 2004, *Curr Opin Genet Dev*, 14, 139-46.
148. Akey, C. W., and Luger, K. 2003, *Curr Opin Struct Biol*, 13, 6-14.

149. Stein, A., Whitlock, J. P., Jr., and Bina, M. 1979, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 5000-4.
150. Regnard, C., Desbruyeres, E., Huet, J. C., Beauvallet, C., Pernollet, J. C., and Edde, B. 2000, *J Biol Chem*, 275, 15969-76.
151. Arnan, C., Saperas, N., Prieto, C., Chiva, M., and Ausio, J. 2003, *J Biol Chem*, 278, 31319-24.
152. Umehara, T., Chimura, T., Ichikawa, N., and Horikoshi, M. 2002, *Genes Cells*, 7, 59-73.
153. Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R., and Stillman, B. 1996, *Cell*, 87, 95-104.
154. Glowczewski, L., Waterborg, J. H., and Berman, J. G. 2004, *Mol Cell Biol*, 24, 10180-92.
155. Magnaghi, P., Roberts, C., Lorain, S., Lipinski, M., and Scambler, P. J. 1998, *Nat Genet*, 20, 74-7.
156. Annunziato, A. T. 2005, *J Biol Chem*, 280, 12065-8.
157. English, C. M., Maluf, N. K., Tripet, B., Churchill, M. E., and Tyler, J. K. 2005, *Biochemistry*, 44, 13673-82.
158. Moshkin, Y. M., Armstrong, J. A., Maeda, R. K., Tamkun, J. W., Verrijzer, P., Kennison, J. A., and Karch, F. 2002, *Genes Dev*, 16, 2621-6.

Structural basis for the interaction of Asf1 with histone H3 and its functional implications

Florence Mousson^{*†}, Aurélie Lautrette^{*}, Jean-Yves Thuret[‡], Morgane Agez^{*}, Régis Courbeyrette[‡], Béatrice Amigues^{*}, Emmanuelle Becker^{*}, Jean-Michel Neumann^{*}, Raphaël Guerois^{*}, Carl Mann^{§¶}, and Françoise Ochsenbein^{*¶}

^{*}Service de Biophysique des Fonctions Membranaires and [‡]Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Département de Biologie Joliot-Curie, Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA/Saclay), F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Edited by Gary Felsenfeld, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved March 17, 2005 (received for review January 7, 2005)

Asf1 is a conserved histone chaperone implicated in nucleosome assembly, transcriptional silencing, and the cellular response to DNA damage. We solved the NMR solution structure of the N-terminal functional domain of the human Asf1a isoform, and we identified by NMR chemical shift mapping a surface of Asf1a that binds the C-terminal helix of histone H3. This binding surface forms a highly conserved hydrophobic groove surrounded by charged residues. Mutations within this binding site decreased the affinity of Asf1a for the histone H3/H4 complex *in vitro*, and the same mutations in the homologous yeast protein led to transcriptional silencing defects, DNA damage sensitivity, and thermosensitive growth. We have thus obtained direct experimental evidence of the mode of binding between a histone and one of its chaperones and genetic data suggesting that this interaction is important in both the DNA damage response and transcriptional silencing.

Asf1 histone chaperone | chromatin | DNA damage | NMR chemical shift mapping | nucleosome assembly

DNA in eukaryotic cells is packaged as nucleosome core particles containing ≈ 145 bp of DNA wrapped around an octamer comprised of two copies each of histones H2A, H2B, H3, and H4 (1). Assembly of histones into nucleosomes is a tightly orchestrated process (2, 3). Asf1 is a highly conserved histone chaperone that has been linked to both nucleosome assembly and disassembly (4–7). Asf1 interacts with two functional classes of protein: chromatin components, including histone H3 (8), the Hir proteins (9, 10), and the second subunit of CAF-I (5, 11, 12), and checkpoint kinases, including the Rad53 checkpoint kinase in budding yeast (13, 14) and the Tousled-like kinases in metazoans (15). The function of most of these interactions has not been defined. However, a Hir binding region of Asf1 was implicated in telomeric silencing but not required for resistance to genotoxic stress (16). Further work is necessary to determine the functional role of the remaining interactions and, in particular, for defining which Asf1 partners are required for the DNA damage response and for optimal cell growth. In this work, we present the solution structure of the functional N-terminal domain of human Asf1a, and we identify its histone H3 binding site. We show that Asf1 mutants severely defective in histone H3/H4 binding are incompetent in silencing and in providing resistance to DNA damage.

Methods

Protein Production. pETM30 allowed the production of recombinant (His)₆-GST-Tev site-fusion proteins in *Escherichia coli* strain BL21 gold (λ DE3). Unlabeled and uniformly labeled proteins were obtained as described in ref. 17. After Tev cleavage, the ¹⁵N-labeled-H3 (122–135) peptide was further purified by reverse-phase chromatography. The NMR buffer was described in ref. 17. An unlabeled peptide spanning the 122–133 sequence of histone H3 was obtained by chemical synthesis (Epytop, Nîmes, France). The protein concentrations were precisely measured by amino acid analysis.

NMR Structure Determination and Binding Experiments. NMR experiments were carried out on a Bruker DRX-600 spectrometer equipped with a triple-resonance broadband inverse probe or a cryoprobe. ¹H, ¹⁵N, and ¹³C resonance assignments were obtained as described in ref. 17. Peak intensities of the ¹⁵N- and ¹³C-edited 3D NOESY-heteronuclear single quantum correlation (HSQC) spectra (with a mixing time of 120 ms) were converted to distance restraints by using ARIA (ambiguous restraints for iterative assignment) (18, 19). One hundred thirteen (ϕ, ψ) restraints were derived by using TALOS (20) and 57 ϕ restraints by using ³J_{HNH α couplings constants derived from the 3D HNHA spectrum (21); on the basis of the empirical Karplus relation, they were set to $-60 \pm 40^\circ$ for J_{HN-H α} < 6 Hz and to $-120 \pm 60^\circ$ for J_{HN-H α} > 8 Hz. An overview of the constraints is given in Table 1, which is published as supporting information on the PNAS web site. ARIA was used to calculate 20 structures, starting from random conformations with the standard procedure. Cumulative chemical shift variation upon binding was calculated as $\Delta\delta = [(\delta_{\text{HN}^b} - \delta_{\text{HN}^f})^2 + (2.75(\delta_{\text{H}\alpha}^b - \delta_{\text{H}\alpha}^f))^2 + (0.17(\delta_{\text{N}^b} - \delta_{\text{N}^f}))^2]^{1/2}$, where *b* and *f* refer to the bound and free form, respectively. The scaling factors normalize the magnitude of the ¹H_N, ¹H α , and ¹⁵N chemical shift changes (in ppm) (22). These factors were established from estimates of atom-specific chemical shift ranges in proteins: 5.5 ppm for ¹H_N, 2 ppm for ¹H α , and 32 ppm for ¹⁵N. Assignments of the HSQC spectra of complexed Asf1 (1–156) and H3 (122–135) were obtained with 3D ¹⁵N edited NOESY-HSQC and total correlation spectroscopy-HSQC spectra.}

Phenotypic Testing of *asf1* Mutants. Wild-type and *asf1* mutants containing a 13myc C-terminal tag were expressed from the endogenous *ASF1* promoter on the centromeric *TRP1* vector pRS314. These plasmids were introduced into the following four yeast strains to test their ability to complement the DNA damage sensitivity, the thermosensitive growth defect, and the transcriptional silencing defect of *asf1* Δ or *asf1* Δ *cac2* Δ mutants. UCC6562 (a generous gift of Dan Gottschling, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle) = *Mat α ade2 Δ ::hisG lys2 Δ 0 met15 Δ 0 trp1- Δ 63 his3 Δ 200 ura3-52 leu2 Δ 0 DIA5-1 ppr1::LYS2 adh4::TEL(VIII)-URA3 *asf1*::HIS3; CMY1317 = as for*

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviation: TAP, tandem affinity purification.

Data deposition: The atomic coordinates and structure factors for human Asf1a have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID code 1TEY). The NMR chemical shifts for human Asf1a have been deposited in the BioMagResBank, www.bmrb.wisc.edu (accession no. 6298).

[†]Present address: Department of Physiological Chemistry, Division of Biomedical Genetics, University Medical Center Utrecht, Universiteitsweg 100, 3584CG Utrecht, The Netherlands.

[§]Present address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, F. Edward Hébert School of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, 4301 Jones Bridge Road, Bethesda, MD 20814-4799.

[¶]To whom correspondence may be addressed. E-mail: cmann@usuhhs.mil or ochsenbe@dsvidf.cea.fr.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

UCC6562, but *asf1::HIS3 cac2::kanMX*; CMY1312 = *Mata ade2-101 lys2-801 trp1-Δ63 his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 hmlα::URA3 asf1::HIS3 cac2::kanMX*; CMY1314 = *Mata ade2-101 lys2-801 trp1-Δ63 his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 hmrα::URA3 asf1::HIS3 cac2::kanMX*. Preparation of protein extracts, SDS/PAGE, and immunoblotting analysis were performed as described in ref. 23. Silencing of the *URA3* reporter gene was monitored by the ability of strains to grow on a medium containing 5-fluoroorotic acid as described in ref. 24.

GST Pull-Down Assays. Twenty micrograms of purified (His)₆-GST-fusion proteins were immobilized on reduced glutathione agarose beads and equilibrated with 200 μl of buffer H150 (20 mM Hepes-NaOH, pH 7.4/150 mM NaCl/0.5% Nonidet P-40/1 mM EDTA). One microgram of purified native chicken histones H3-H4, kindly provided by A. Prunell (Institut Jacques Monod, Paris) (25), was added to beads. Beads were washed successively with buffers identical to buffer H150 with increasing NaCl concentration up to 2 M. Bound H3 proteins were analyzed by SDS/PAGE and revealed by an antibody against the carboxyl terminus of histone H3 (Abcam, Cambridge, U.K.). (His)₆-GST fusion proteins were revealed by a polyclonal antibody against the (His)₆ tag (Novagen).

Tandem Affinity Purification (TAP) Tag Purifications of Asf1 and Asf1-V94R. pRS304-*TRP1-ASF1-13myc* and pRS304-*TRP1-asf1-V94R-13myc* were linearized with MluI and integrated at their normal chromosomal locus by transforming strain W303-1b *asf1::kanMX* and selecting Trp⁺ colonies. The 13myc tag was replaced with the TAP tag by transforming these strains with an *ASF1-TAP::HIS3MX6* PCR cassette. This cassette contained 111 bp of *ASF1* coding sequence upstream of the stop codon in front of the TAP sequence and 110 bp of *ASF1* 3' noncoding sequences downstream of the *HIS3MX6* sequence. Two liters of wild-type and *asf1-V94R* cells were grown to an optical density of 2 in a rich yeast extract/peptone/dextrose medium and the TAP-tagged proteins were purified by the standard protocol in ref. 26 after breaking cells in an Eaton press. Proteins copurifying with Asf1 were separated by SDS/PAGE and stained with Coomassie blue. The bands corresponding to Asf1 and the histones H3 and H4 were identified by a combination of mass spectrometry and immunoblotting (data not shown).

Supporting Information. A description of the DNA constructs and methods of site-specific mutagenesis used in this work is provided as *Supporting Methods*, which is published as supporting information on the PNAS web site.

Results

The Structure of the Asf1 N-Terminal Domain Is Highly Conserved. We determined the structure of the conserved N-terminal domain of human Asf1a (amino acid 1–156) by using multidimensional NMR spectroscopy (Fig. 1a and Table 1). The structure comprises 10 β-strands organized into an Ig-like fold composed of three β-sheets topped by two short α-helices. The ¹⁵N relaxation parameters R₁, R₂, and the ¹⁵N{¹H}-nuclear Overhauser effect are consistent with a monomeric globular domain that presents limited internal motions with significant flexibility in the loops connecting β₃-β₄, β₄-β₅, and β₈-β₉ (see Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site). In contrast, the C-terminal region of human Asf1a is fully unfolded (see Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site) as indicated by the null or negative values of ¹⁵N{¹H}-nuclear Overhauser effects (data not shown).

The x-ray crystal structure of the N-terminal domain of *S. cerevisiae* Asf1 was recently described in ref. 16. Although the sequence of the Asf1 N-terminal domain is highly conserved (58% sequence identity between *S. cerevisiae* Asf1 and human

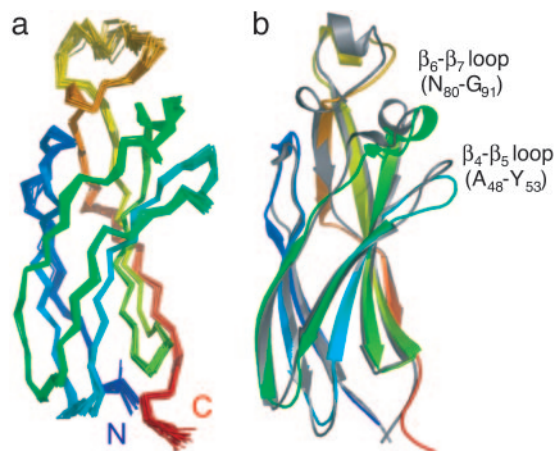


Fig. 1. The structure of the human Asf1a N-terminal domain is well conserved. (a) Bundle of 20 structures of human Asf1a (1–156) calculated as indicated in *Methods*. The coloring scheme indicates the relative position of the backbone atoms with the warmest colors being closest to the carboxyl terminus. (b) Schematic ribbon diagram (generated with PYMOL, DeLano Scientific, South San Francisco, CA) of the human Asf1a (1–156) structure closest to the mean (colored as in a) superimposed on the crystallographic structure of the homologous domain of *S. cerevisiae* Asf1 (16) (gray).

Asf1a), some genetic data highlight functional differences. The human protein does not complement *asf1Δ* mutants of either *S. pombe* (27) or *S. cerevisiae* (data not shown), whereas the *S. cerevisiae* Asf1 N-terminal domain does complement both mutants (16, 27). The NMR solution structure of the N-terminal domain of human Asf1a superimposes well on the x-ray crystal structure of the corresponding domain from *S. cerevisiae* with a root mean square deviation of 1.78 Å for all Cα atoms and 0.83 Å for the Cα atoms of the 10 β-strands (Fig. 1b). The major dissimilarities are observed for the A₄₈-Y₅₃ and N₈₀-G₉₁ loops connecting strands β₄-β₅ and strands β₆-β₇, respectively, and the sequences of these two loops are among the most divergent regions between the human and yeast proteins (only 24% identity) (Fig. 8, which is published as supporting information on the PNAS web site). These variations may help in identifying the important factors responsible for the functional differences between the human and yeast proteins.

Interaction of Asf1 with the C-Terminal Helix of Histone H3. The histone H3/H4 complex is the best-characterized and most highly conserved partner of Asf1. However, nothing is known concerning the structural basis of this interaction or the functional pathways for which it is required. The C-terminal amino acids 97–135 of histone H3 were implicated in this interaction in a two-hybrid screen (8). This segment spans half of the helix α₂ and full-length helix α₃ of histone H3 in the crystal structure of the nucleosome (1). We characterized the interaction between human Asf1a and histone H3 by NMR. Addition of the H3 peptide spanning residues 97–135 to ¹⁵N-Asf1a (1–156) led to line broadening due to an intermediate exchange rate, preventing further NMR characterization (data not shown). Further two-hybrid analyses indicated that shorter H3 C-terminal peptides could still interact with Asf1a (data not shown). We thus tried the shortened H3 C-terminal peptide (amino acid 122–135) in our NMR experiments and found that it led to significant variations in the Asf1 ¹⁵N-HSQC spectrum with a rapid exchange rate (Fig. 2a). Transposing the mean square chemical shift variation upon titration (Fig. 2b) on the protein structure revealed a well defined binding surface on Asf1 located in a concave groove of the protein (Fig. 3). This groove is highly conserved, principally hydrophobic with residue V94 at its

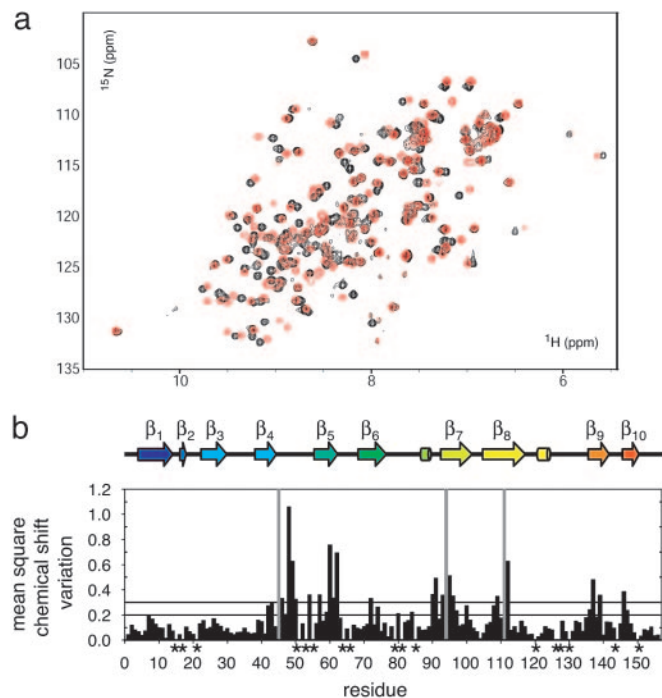


Fig. 2. Interaction of human Asf1a (1–156) with histone H3 (122–135). (a) Superposition of the HSQC spectrum of human Asf1a (1–156) (80 μM) with (red) and without (black) an excess of histone H3 (122–135) (160 μM) at 298 K. (b) Mean-square chemical shift variation calculated as described in *Methods* for human Asf1a (1–156) upon binding of H3 (122–135) as a function of the sequence. Horizontal lines at 0.2 and 0.3 show the cutoff for the color-coded representation of the protein surface in Fig. 3. The chemical exchange rate was rapid for most of the residues except the highly affected residues 45, 94, and 111, indicated with a vertical gray bar, that exhibited an intermediate exchange rate and severe line broadening due to chemical exchange that led to their absence from the ^{15}N -HSQC spectrum of the complex. Stars indicate missing values (proline residues or unassigned because of signal overlaps).

center, and surrounded by polar and charged residues such as D54 and R108 (Fig. 3).

The conformation of H3 (122–135) was investigated with an ^{15}N -labeled peptide. In the absence of Asf1a, the peptide was unfolded as revealed by the reduced dispersion of the HSQC spectrum (Fig. 4a) and by the $\text{H}\alpha$ chemical shift index (Fig. 4b). Large chemical shift variations were observed upon addition of unlabeled Asf1a (1–156) (Fig. 4a and c), and the ^{15}N -H3 (122–135) peptide adopted a helical conformation from residues 122 to 131 (Fig. 4b) that corresponds to the C-terminal helix $\alpha 3$ of H3 found in the nucleosome core particle (1). The $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -nuclear Overhauser effect values of the bound peptide are consistent with a structure as rigid as the Asf1a core domain (Figs. 4d and 6d) and indicate a specific binding interaction with Asf1a. Based on titration experiments, the affinity of the peptide for Asf1a (1–156) was measured to be $100 \pm 20 \mu\text{M}$.

In Vitro Analysis of Asf1a Binding to the Purified Histone H3/H4 Complex. Our NMR experiments identified a site on the surface of Asf1a that was involved in binding the 13 C-terminal residues of histone H3 and was thus likely to be involved in binding the histone H3/H4 complex (Fig. 3). We made Asf1a mutants within this site in the context of GST fusion proteins to test their ability to bind the H3/H4 complex *in vitro*. The V94R mutant was chosen because it converts a conserved exposed hydrophobic residue at the center of the H3 (122–135) binding site into a positively charged arginine residue. The D54R and R108E mutants reversed the charge of two conserved residues whose

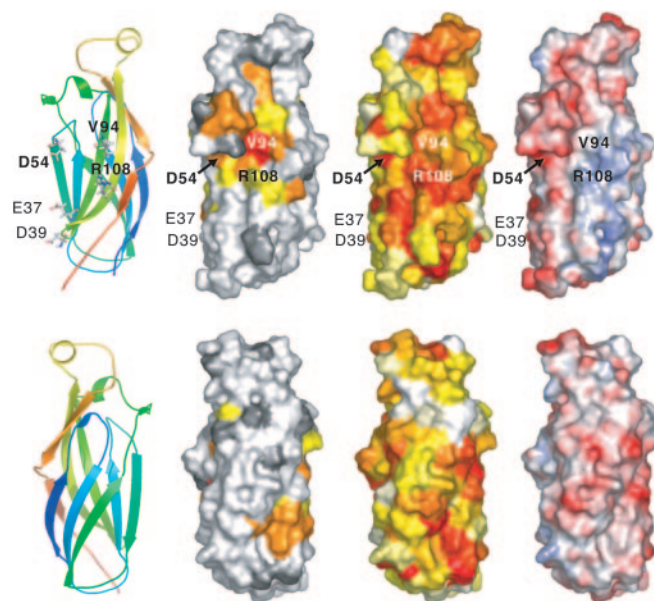


Fig. 3. Structure mapping of the chemical shift variation of Asf1a upon H3 (122–135) binding. Two orientations of the protein are presented in *Upper* and *Lower*. (Left) Ribbon representation of the protein. (Left Center) Surface color-coded representation of the mean-square chemical shift variation of Asf1a upon H3 (122–135) binding. The three line-broadened residues are shown in red, residues with $\Delta\delta > 0.3$ in orange, residues with $0.2 < \Delta\delta < 0.3$ in yellow, residues with $\Delta\delta < 0.2$ in white and undetermined residues in gray. (Right Center) Surface color-coded representation of the residue conservation of Asf1. The conservation was determined by using the RATEASITE program (38) based on an alignment of 17 Asf1 sequences. The color code is a gradient from red (fully conserved residues) to white (unconserved residues). (Right) Color-coded representation of the electrostatic potential of human Asf1a. The potential was calculated with the software APBS (39). The color code is red for negative values, white for near zero values, and blue for positive values. Figures were generated with PYMOL, and residues mutated in this work are labeled.

chemical shift was perturbed by the H3 peptide and that are found at either side of the hydrophobic groove containing V94. Finally, a D37R+E39R double mutant was made, affecting two acidic residues that reside within a known HirA-interacting region (16) that is outside of the putative H3-binding site to compare its effect to that of the three mutants within the H3 binding site. All these residues are highly conserved and are identical in the human and the yeast proteins (Fig. 8). We also verified that the HSQC spectra of the four Asf1a (1–156) mutants were nearly superimposable with that of the wild type (data not shown), indicating that these surface mutations do not affect their global folding and structural integrity.

We used a GST pull-down assay to study the binding of wild-type and mutant Asf1a proteins (D37R+E39R, D54R, V94R, and R108E) to histone H3 within purified chicken histone H3/H4 complex (Fig. 5a). This native histone complex can form (H3-H4)₂ tetrameric particles when assembled onto DNA (25). Wild-type Asf1a and the D37R+E39R mutant strongly bound H3 within the H3/H4 complex. In contrast, the V94R mutation nearly completely abolished H3 binding, whereas the D54R mutation, and to a lesser extent the R108E mutation, partially inhibited the binding.

The inability of the Asf1a-V94R mutant to bind histones was confirmed by two independent methods. First, we added Asf1-V94R to the ^{15}N -H3 122–135 peptide and found that it was unable to induce helical formation of the H3 peptide (Fig. 9, which is published as supporting information on the PNAS web site). This finding shows that the induced helical conformation

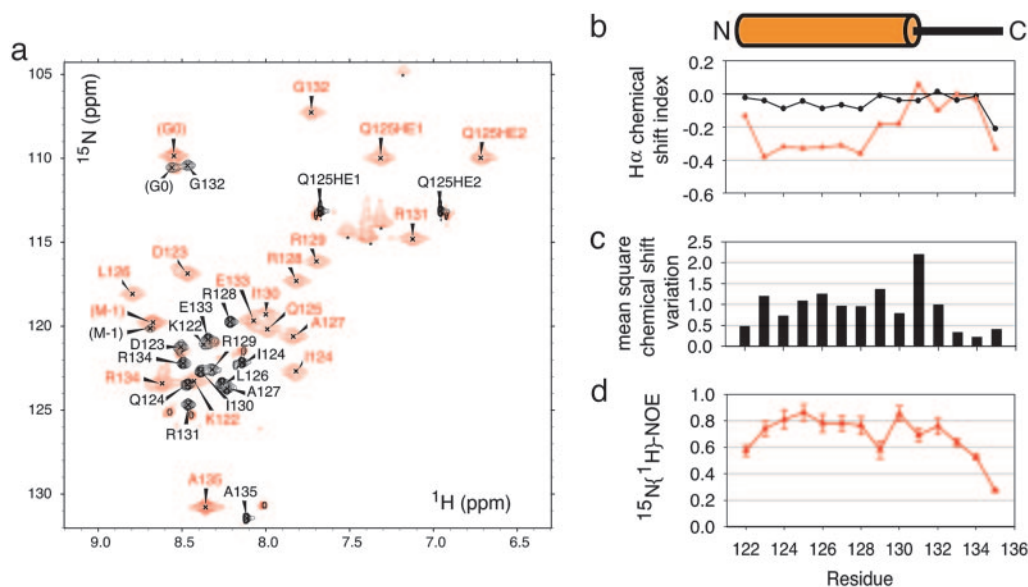


Fig. 4. H3 (122–135) folds into the native structure upon Asf1a binding. (a) Superposition of the ¹⁵N-HSQC spectrum of ¹⁵N-labeled H3 (122–135) (200 μM) with (red) and without (black) an excess of unlabeled human Asf1a (1–156) (250 μM) at 283 K. At this temperature, the chemical exchange rate was slow compared with the chemical shift variations. G₀ and M₋₁ indicate the two amino acids N-terminal to the H3 (122–135) sequence that were required for cloning the sequence in the *E. coli* expression vector as described in *Methods*. (b) H_α chemical shift index [$\delta_{\text{H}\alpha}^{\text{exp}} - \delta_{\text{H}\alpha}^{\text{RC}}$, where exp and RC refer to the experimental and random coil values, respectively, (40)] of the free (black) and bound (red) H3 (122–135). The orange cylinder shows the position of the native C-terminal α3 helix of H3 as observed in the structure of the nucleosome (1). (c) Mean square chemical shift variation calculated as described in *Methods* of ¹⁵N-H3 (122–135) upon binding of human Asf1a (1–156) as a function of the sequence. (d) Heteronuclear ¹⁵N{¹H}-nuclear Overhauser effect of the bound H3 (122–135).

of the peptide results from a highly specific interaction with the Asf1 surface identified by chemical shift mapping and centered on V94. Second, we transposed the wild type and the V94R mutant in the context of a TAP (tandem affinity purification)-tagged version of the *S. cerevisiae* Asf1 protein. Consistent with previous work (14), the histones H3 and H4 were major partners that copurified with wild-type Asf1 through tandem affinity purification. In contrast, no H3 or H4 was associated with the Asf1-V94R mutant (Fig. 5b). This result confirms the strong histone-binding defect of the V94R mutant.

In Vivo Analysis of asf1 Mutants. We examined the *in vivo* effects of mutations within the histone H3 or Hir binding sites of Asf1 by making V94R, D54R, R108E, D54R+R108E, and D37R+E39R mutants of the *S. cerevisiae* Asf1 protein and testing their ability to complement the phenotypes of *asf1Δ* mutants. In *S. cerevisiae*, *asf1Δ* mutants are viable, but they are temperature-sensitive for growth at 37°C (Fig. 5d), are highly sensitive to DNA-damaging agents that create DNA double-strand breaks (4, 13, 14), and they show defects in transcriptional silencing (9, 10, 12, 24, 28, 29). We used camptothecin and hydroxyurea as genotoxic stresses for the *asf1Δ* mutant. Camptothecin is an anticancer agent that stabilizes the covalent intermediary formed between DNA and topoisomerase I during its enzymatic relaxation of DNA (30). Collision of replication forks with these complexes leads to DNA double-strand breaks. Hydroxyurea depletes dNTP pools by inhibiting ribonucleotide reductase. Prolonged fork stalling is also thought to lead to DNA double-strand breaks (31). To examine transcriptional silencing, we used strains containing the *URA3* gene reporter inserted at three different silenced loci: the chromosome VIII telomere (*TEL::URA3*) and the *HMRa* (*HMRa::URA3*) and *HMLα* (*HMLα::URA3*) silent mating-type cassettes. Transcriptional repression is stronger at the *HMRa* and *HMLα* silent mating cassettes compared with the telomeres (32). The single *asf1Δ* mutant has only weak silencing defects, whereas *asf1Δ cacΔ* double mutants have strong silencing defects (9, 10, 12, 24). We

thus tested transcriptional silencing in an *asf1Δ TEL::URA3* strain, as well as in *asf1Δ cac2Δ* double-mutant strains containing the *TEL::URA3*, *HMRa::URA3*, and *HMLα::URA3* gene reporters. Expression of wild-type Asf1 containing a 13myc epitope fused to its carboxyl terminus from its endogenous promoter on a centromeric plasmid complemented the *asf1Δ* mutant phenotypes (Fig. 5d and e). We then tested the function of the five Asf1 mutants in this same context. All of the mutant proteins were stably expressed in yeast at approximately the same level as the wild-type protein (Fig. 5c). The Asf1-V94R mutant was unable to complement any of the *asf1Δ* phenotypes. The R108E, D54R, and D54R+R108E mutants showed a graded increase in defective function. The Asf1-R108E mutant was indistinguishable from the wild-type protein in all phenotypic tests but one: it complemented the telomeric silencing defect of the *asf1Δ cac2Δ* double mutant slightly less than the wild-type protein (Fig. 5e). The Asf1-D54R mutant efficiently complemented the DNA damage sensitivity and growth defects of the *asf1Δ* mutant but appeared to function less than the wild type and Asf1-R108E mutant in all silencing strains. Finally, the D54R+R108E double mutant was clearly more defective than either single mutant in that it showed some detectable sensitivity to genotoxic stress and to growth at 37°C, as well as being totally deficient in silencing function (Fig. 5d and e). The strong thermosensitive growth defect of the V94R mutant and the weak defect of the D54R+R108E double mutant were not due to proteolysis of the mutant proteins at 37°C (Fig. 5c). In conclusion, mutants defective in histone H3/H4 binding *in vitro* also showed defects in transcriptional silencing and were sensitive to DNA damaging agents and to growth at high temperatures. The severity of the phenotypes for each mutant *in vivo* was nicely correlated with the severity of their histone H3 binding defects *in vitro*.

In contrast to the H3 binding mutants, the Asf1-D37R+E39R double mutant showed silencing defects but no sensitivity to DNA damaging agents or to growth at high temperatures. These phenotypes are in agreement with those reported for a very similar Asf1-H36R+D37R double mutant. The homologous

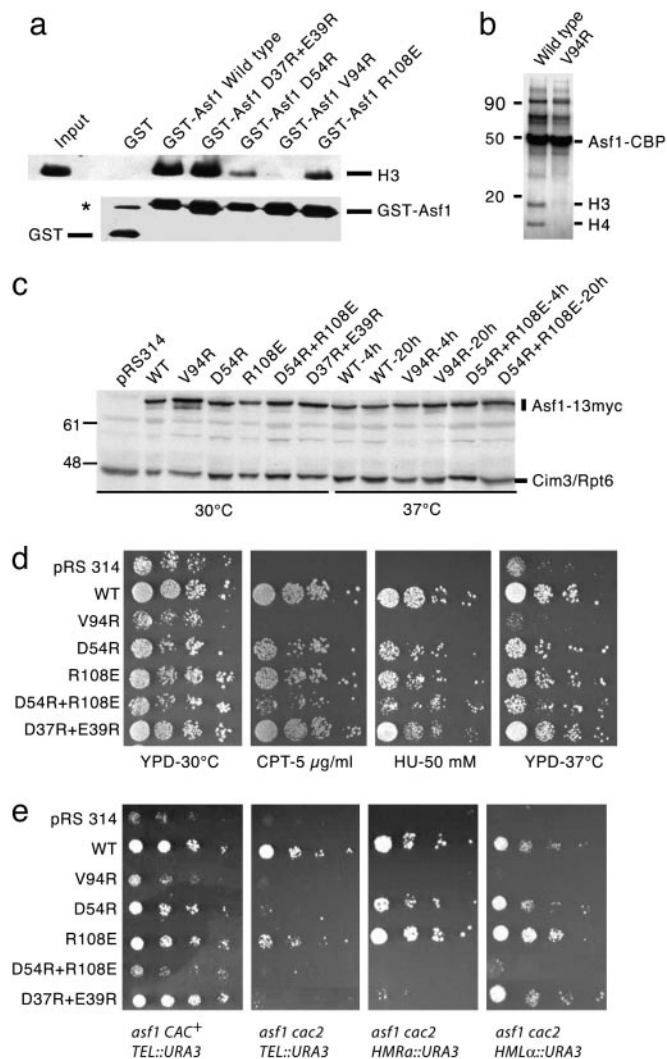


Fig. 5. *In vitro* and *in vivo* analysis of Asf1 mutants. (a) V94R, D54R, and R108E are involved in the binding of Asf1 to the histone H3/H4 complex. Equal amounts of purified recombinant (His)₆-GST, (His)₆-GST-Asf1a (1–156), and the indicated mutants were bound to glutathione agarose beads. Lower is an anti-GST immunoblot showing the equal quantities of fusion protein bound to the beads. A small quantity of the (His)₆-GST control protein appears as a dimerized species that migrates near the position of the (His)₆-GST-Asf1a proteins (indicated with a star). Binding of histone H3 within H3/H4 complexes to the GST proteins is shown in *Upper*. H3 was visualized by immunoblotting with anti-H3 antibodies. Input shows the amount of histone used for each binding reaction. (b) Coomassie blue-stained gel of wild-type Asf1-TAP and Asf1-V94R-TAP purified from yeast cell extracts by using the tandem affinity purification protocol. (c) Wild-type and mutant Asf1–13myc proteins are expressed at similar levels in yeast. The UCC6562 *asf1*Δ strain was transformed with pRS314 (*CEN-TRP1*) or pRS314 plasmids containing DNA fragments, allowing expression from the endogenous *ASF1* promoter of wild-type (WT) or mutant Asf1–13myc proteins as indicated. Protein extracts from exponentially growing cells at 30°C or from cells transferred to 37°C for 4 or 20 h as indicated were analyzed by immunoblotting with anti-myc antibodies to visualize the tagged Asf1 proteins. Asf1–13myc migrated as a closely spaced doublet of bands at ≈75 kDa. The quantity of the faster-migrating band varied between experiments, but no reproducible difference in the ratio of the two forms was seen between the wild type and any of the mutants. After developing the anti-myc blot, membranes were incubated with anti-Cim3/Rpt6 antiserum directed against a 45-kDa subunit of the 26S proteasome to verify that equal quantities of protein extract were loaded in each lane. (d) Sensitivity of *asf1* mutants to genotoxic stress and to growth at 37°C. UCC6562 *asf1*Δ strains transformed with the pRS314 plasmids allowing the expression of wild-type and mutant Asf1–13myc proteins described in a were grown to early stationary phase in synthetic complete medium without tryptophan to maintain selection for the pRS314 plasmids. The 10-fold serial dilutions of

Asf1a-H36R+D37R mutant was defective in HirA binding *in vitro* (16). Interestingly, the Asf1-D37R+E39R mutant showed residual silencing function that was clearly superior to that of the Asf1-V94R and Asf1-D54R+R108E mutants in the context of the *asf1*Δ *TEL::URA3* and *asf1*Δ *cac2*Δ *HMLα::URA3* strains. Overall, these results suggest that the Asf1-H3/H4 interaction is required for silencing at telomeres and at both silent mating cassettes.

Discussion

Characteristics of the Asf1-H3/H4 Binding Mode. We identified crucial Asf1 residues involved in the recognition of the H3/H4 complex, and we showed that the carboxyl terminus of H3 bound to Asf1 adopts a native helical conformation. Our NMR and mutational analyses suggest that the H3 C-terminal sequence is a crucial part of its interaction with the H3/H4 complex. Disrupting this interaction with the Asf1-V94R mutation prevents both interaction with the H3 C-terminal peptide and binding to the intact H3/H4 complex. Neutralization of the highly basic core histones either by using high salt concentration or adding polyacidic peptides allows assembly of core histones and DNA into nucleosome core particles *in vitro* (33, 34). It was thus reasonable to assume that electrostatic interactions would be crucial components in the interaction of physiological chaperones with core histones and, indeed, several such chaperones contain blocks of acidic sequences that may serve this role, although these acidic domains in chaperones such as Nap1, nucleoplamin, and yeast Asf1 are not essential for their function as chaperones (16, 27, 33, 35, 36). Here, we show that the core of the Asf1a binding interface includes a conserved patch of hydrophobic residues. V94 is centrally located in this hydrophobic surface, whose chemical shifts were affected by the presence of the H3 C-terminal helix, and was also crucial for binding the intact H3/H4 complex *in vitro*. Furthermore, the yeast Asf1-V94R mutant exhibited a histone-binding defect and a strongly deleterious phenotype *in vivo*. Surrounding the hydrophobic core, charged residues such as D54 and R108 contributed to a lesser extent to the binding interface as revealed by the *in vitro* assays. A nonspecific long-range repulsive effect of the D54R mutation can be excluded because *in vitro*, the D37R+E39R double mutant affecting the same side of Asf1, binds histones H3/H4 identically to the wild type. Although the net charge of Asf1 has been maintained highly negative throughout evolution, only a few charged positions remain strictly conserved and include, in particular, the residues D54 and R108. Altogether, our results are consistent with a highly specific binding mode of Asf1 with histones H3/H4 involving hydrophobic interactions and strictly conserved charged positions.

cultures were then spotted on yeast extract/peptone/dextrose plates, containing where indicated 5 μg/ml camptothecin (CPT) or 50 mM hydroxyurea (HU) and incubated at 30°C to test for sensitivity to genotoxic stress or at 37°C to test for thermosensitive growth. (e) The same pRS314 plasmids described above were used to test the transcriptional silencing function of the indicated wild-type and mutant Asf1–13myc proteins. These plasmids were transformed into four different silencing reporter strains: UCC6562 (*asf1* *CAC+* *TEL::URA3*) tests telomeric silencing in an *asf1* *CAC+* background, CMY1317 (*asf1* *cac2* *TEL::URA3*) tests telomeric silencing in an *asf1* *cac2* double-mutant background, CMY1314 (*asf1* *cac2* *HMRa::URA3*) tests silencing at *HMRa* in an *asf1* *cac2* background, and CMY1312 (*asf1* *cac2* *HMLα::URA3*) tests silencing at *HMLα* in an *asf1* *cac2* background. Strains were grown to early stationary phase in synthetic complete medium without tryptophan to select for the plasmid, and 10-fold dilutions of the cultures were then spotted on plates containing 5-fluoroorotic acid (5-FOA). Repression of the *URA3* reporter gene by transcriptional silencing allows growth on the FOA plates (24).

Differential Roles for Histone H3 and Hir Protein Binding in Asf1 Function. Asf1 has been implicated in nucleosome assembly (4, 5, 8), in transcriptional silencing (9, 10, 12, 24, 28, 29, 37), and in the cellular response to DNA damage (13, 14). In yeast, it is also required for growth at high temperatures (Fig. 5) and for the transcriptional regulation of histone gene expression (9). Consistent with its multiple functions, Asf1 has been shown to physically and functionally interact with a large number of partners. The identification of these multiple interacting partners raises the question as to their role in the different pathways in which Asf1 functions. Like Asf1, many of these partners have been implicated in transcriptional activation, transcriptional silencing, and the DNA damage response. It is thus not possible to attribute specific functions to each Asf1 partner on the basis of the phenotype of individual null mutants. One approach that should allow a more precise delimitation of functions involves the identification and study of mutants that affect the interaction of Asf1 with specific partners. Recently, some mutants of Asf1a were described that decrease its binding to HirA *in vitro* (16). Analysis of one of the corresponding yeast mutants revealed that it was defective in transcriptional silencing but provided a normal level of resistance to genotoxic stress. These results thus suggested that the Asf1–Hir interaction contributes to transcriptional silencing but is not required for Asf1's role in the DNA damage response. In this study, we identified mutants of Asf1a with decreased affinity for histone H3/H4 complexes *in vitro*. Interestingly, we found an excellent correlation between the

severity of the *in vitro* binding defects with that of the severity of the *in vivo* phenotypes of the corresponding yeast mutants, suggesting that binding of the histone H3/H4 complex is crucial for the role of Asf1 in the DNA damage response, in thermoresistant growth, and in transcriptional silencing, although we cannot rule out the possibility that these mutations also affect its interaction with some other important partner. Further work should provide a mechanistic description of how the histone chaperone activity of Asf1 contributes to these different functional pathways, and the identification of mutants specifically defective in binding to the remaining Asf1 partners should allow an assessment of their respective roles in these pathways.

We thank Ariel Prunell for his generous gift of purified chicken histone H3/H4 complex and for his extensive advice on histone modifications and purification, Vaughn Jackson for discussions, Dan Gottschling for the gift of silencing reporter strains, Joël Couprie, Sophie Zinn-Justin, and Bernard Gilquin for constructive discussions and precious technical support, Hervé Desvaux and Patrick Berthault for their expert NMR assistance, Carine van Heijenort for valuable comments on the manuscript, and Geneviève Almouzni for her enthusiasm and encouragement. This work was supported by a Programme Incitatif et Coopératif of the Commissariat à l'Énergie Atomique/Institut Curie on Epigenetic parameters in DNA damage response and the cell cycle, funds for the Structural Radiobiology efforts of the Common NMR Laboratory of the Commissariat à l'Énergie Atomique/Saclay, and Association pour la Recherche sur le Cancer Grant 4470 (to C.M.). A.L. and B.A. are supported by a Direction Générale des Armées fellowship.

- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997) *Nature* **389**, 251–260.
- Loyola, A. & Almouzni, G. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1677**, 3–11.
- Verreault, A. (2000) *Genes Dev.* **14**, 1430–1438.
- Tyler, J. K., Adams, C. R., Chen, S. R., Kobayashi, R., Kamakaka, R. T. & Kadonaga, J. T. (1999) *Nature* **402**, 555–560.
- Mello, J. A., Sillje, H. H., Roche, D. M., Kirschner, D. B., Nigg, E. A. & Almouzni, G. (2002) *EMBO Rep.* **3**, 329–334.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. & Nakatani, Y. (2004) *Cell* **116**, 51–61.
- Adkins, M. W. & Tyler, J. K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 52069–52074.
- Munakata, T., Adachi, N., Yokoyama, N., Kuzuhara, T. & Horikoshi, M. (2000) *Genes Cells* **5**, 221–233.
- Sutton, A., Bucaria, J., Osley, M. A. & Sternglanz, R. (2001) *Genetics* **158**, 587–596.
- Sharp, J. A., Fouts, E. T., Krawitz, D. C. & Kaufman, P. D. (2001) *Curr. Biol.* **11**, 463–473.
- Tyler, J. K., Collins, K. A., Prasad-Sinha, J., Amiot, E., Bulger, M., Harte, P. J., Kobayashi, R. & Kadonaga, J. T. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6574–6584.
- Krawitz, D. C., Kama, T. & Kaufman, P. D. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 614–625.
- Hu, F., Alcasabas, A. A. & Elledge, S. J. (2001) *Genes Dev.* **15**, 1061–1066.
- Emili, A., Schieltz, D. M., Yates, J. R., 3rd, & Hartwell, L. H. (2001) *Mol. Cell* **7**, 13–20.
- Sillje, H. H. & Nigg, E. A. (2001) *Curr. Biol.* **11**, 1068–1073.
- Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Lam, W. M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A. A., Brill, S. J., Adams, P. D., Berger, J. M. & Kaufman, P. D. (2003) *Curr. Biol.* **13**, 2148–2158.
- Mousson, F., Couprie, J., Thuret, J. Y., Neumann, J. M., Mann, C. & Ochsenbein, F. (2004) *J. Biomol. NMR* **29**, 413–414.
- Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W. & Nilges, M. (2003) *Bioinformatics* **19**, 315–316.
- Nilges, M., Macias, M. J., O'Donoghue, S. I. & Oschkinat, H. (1997) *J. Mol. Biol.* **269**, 408–422.
- Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR* **13**, 289–302.
- Vuister, G. W. & Bax, A. (1994) *J. Biomol. NMR* **4**, 193–200.
- Farmer, B. T., 2nd, Constantine, K. L., Goldfarb, V., Friedrichs, M. S., Wittekind, M., Yanchunas, J., Jr., Robertson, J. G. & Mueller, L. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 995–997.
- Dubacq, C., Chevalier, A. & Mann, C. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2560–2572.
- Singer, M. S., Kahana, A., Wolf, A. J., Meisinger, L. L., Peterson, S. E., Goggin, C., Mahowald, M. & Gottschling, D. E. (1998) *Genetics* **150**, 613–632.
- Hamiche, A., Carot, V., Allat, M., De Lucia, F., O'Donoghue, M. F., Revet, B. & Prunell, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7588–7593.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. & Seraphin, B. (2001) *Methods* **24**, 218–229.
- Umehara, T., Chimura, T., Ichikawa, N. & Horikoshi, M. (2002) *Genes Cells* **7**, 59–73.
- Meijsing, S. H. & Ehrenhofer-Murray, A. E. (2001) *Genes Dev.* **15**, 3169–3182.
- Osada, S., Sutton, A., Muster, N., Brown, C. E., Yates, J. R., 3rd, Sternglanz, R. & Workman, J. L. (2001) *Genes Dev.* **15**, 3155–3168.
- Connelly, J. C. & Leach, D. R. (2004) *Mol. Cell* **13**, 307–316.
- Osborn, A. J., Elledge, S. J. & Zou, L. (2002) *Trends Cell Biol.* **12**, 509–516.
- Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L. & Rine, J. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 481–516.
- Akey, C. W. & Luger, K. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 6–14.
- Stein, A., Whitlock, J. P., Jr., & Bina, M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5000–5004.
- Arnan, C., Saperas, N., Prieto, C., Chiva, M. & Ausio, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 31319–31324.
- McBryant, S. J., Park, Y. J., Abernathy, S. M., Laybourn, P. J., Nyborg, J. K. & Luger, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 44574–44583.
- Moshkin, Y. M., Armstrong, J. A., Maeda, R. K., Tamkun, J. W., Verrijzer, P., Kennison, J. A. & Karch, F. (2002) *Genes Dev.* **16**, 2621–2626.
- Pupko, T., Bell, R. E., Mayrose, I., Glaser, F. & Ben-Tal, N. (2002) *Bioinformatics* **18**, S71–S77.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10037–10041.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D. & Richards, F. M. (1992) *Biochemistry* **31**, 1647–1651.

Bibliographie

- Adkins, M.W., and Tyler, J.K. (2004). The histone chaperone Asf1p mediates global chromatin disassembly in vivo. *J Biol Chem* 279, 52069-52074.
- Adkins, M.W., Williams, S.K., Linger, J., and Tyler, J.K. (2007). Chromatin disassembly from the PHO5 promoter is essential for the recruitment of the general transcription machinery and coactivators. *Mol Cell Biol* 27, 6372-6382.
- Agez, M., Chen, J., Guerois, R., Van Heijnoort, C., Thuret, J.Y., Mann, C., and Ochsenbein, F. (2007). Structure of the Histone Chaperone Asf1 bound to the histone C-Terminal Hélix and functional Insights. *Structure*.
- Akey, C.W., and Luger, K. (2003). Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol* 13, 6-14.
- Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongelard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S., and Bouvet, P. (2006). Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *Embo J* 25, 1669-1679.
- Annunziato, A.T. (2005). Split decision: what happens to nucleosomes during DNA replication? *J Biol Chem* 280, 12065-12068.
- Arkin, M. (2005). Protein-protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill. *Curr Opin Chem Biol* 9, 317-324.
- Banks, D.D., and Gloss, L.M. (2004). Folding mechanism of the (H3-H4)₂ histone tetramer of the core nucleosome. *Protein Sci* 13, 1304-1316.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V.A., Orphanides, G., Studitsky, V.M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 301, 1090-1093.
- Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. (2004). Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 14, 139-146.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
- Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J., and Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127, 1361-1373.
- Byeon, I.J., Li, H., Song, H., Gronenborn, A.M., and Tsai, M.D. (2005). Sequential phosphorylation and multisite interactions characterize specific target recognition by the FHA domain of Ki67. *Nat Struct Mol Biol* 12, 987-993.
- Camerini-Otero, R.D., and Felsenfeld, G. (1977). Histone H3 disulfide dimers and nucleosome structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5519-5523.
- Celic, I., Masumoto, H., Griffith, W.P., Meluh, P., Cotter, R.J., Boeke, J.D., and Verreault, A. (2006). The sirtuins hst3 and Hst4p preserve genome integrity by controlling histone h3 lysine 56 deacetylation. *Curr Biol* 16, 1280-1289.

- Chai, J., Charboneau, A.L., Betz, B.L., and Weissman, B.E. (2005). Loss of the hSNF5 gene concomitantly inactivates p21CIP/WAF1 and p16INK4a activity associated with replicative senescence in A204 rhabdoid tumor cells. *Cancer Res* 65, 10192-10198.
- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X.J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y., and Reinberg, D. (1998). A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* 18, 5355-5363.
- Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G., and Li, B.F. (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277, 1996-2000.
- 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.
- Conde e Silva, N., Black, B.E., Sivolob, A., Filipinski, J., Cleveland, D.W., and Prunell, A. (2007). CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization. *J Mol Biol* 370, 555-573.
- Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13, 289-302.
- Couture, J.F., Collazo, E., and Trievel, R.C. (2006). Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nat Struct Mol Biol* 13, 698-703.
- Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Lam, W.M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A.A., Brill, S.J., Adams, P.D., Berger, J.M., and Kaufman, P.D. (2003). Structure and function of the conserved core of histone deposition protein Asf1. *Curr Biol* 13, 2148-2158.
- De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E., and Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol* 14, 997-1007.
- DeSilva, H., Lee, K., and Osley, M.A. (1998). Functional dissection of yeast Hir1p, a WD repeat-containing transcriptional corepressor. *Genetics* 148, 657-667.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-496.
- Dilworth, S.M., Black, S.J., and Laskey, R.A. (1987). Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly in vitro: role of nucleoplasmin and N1 in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 51, 1009-1018.
- Dokmanovic, M., and Marks, P.A. (2005). Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J Cell Biochem* 96, 293-304.
- Edmondson, D.G., Smith, M.M., and Roth, S.Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev* 10, 1247-1259.
- Emili, A., Schieltz, D.M., Yates, J.R., 3rd, and Hartwell, L.H. (2001). Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1. *Mol Cell* 7, 13-20.
- English, C.M., Maluf, N.K., Tripet, B., Churchill, M.E., and Tyler, J.K. (2005). ASF1 binds to a heterodimer of histones H3 and H4: a two-step mechanism for the assembly of the H3-H4 heterotetramer on DNA. *Biochemistry* 44, 13673-13682.

- Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116-1122.
- Formosa, T. (2003). Changing the DNA landscape: putting a SPN on chromatin. *Curr Top Microbiol Immunol* 274, 171-201.
- Formosa, T., Ruone, S., Adams, M.D., Olsen, A.E., Eriksson, P., Yu, Y., Rhoades, A.R., Kaufman, P.D., and Stillman, D.J. (2002). Defects in SPT16 or POB3 (γ FACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics* 162, 1557-1571.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N.G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Cano, A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M.A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T., and Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37, 391-400.
- Franco, A.A., Lam, W.M., Burgers, P.M., and Kaufman, P.D. (2005). Histone deposition protein Asf1 maintains DNA replisome integrity and interacts with replication factor C. *Genes Dev* 19, 1365-1375.
- Frehlick, L.J., Eirin-Lopez, J.M., Jeffery, E.D., Hunt, D.F., and Ausio, J. (2006). The characterization of amphibian nucleoplasmins yields new insight into their role in sperm chromatin remodeling. *BMC Genomics* 7, 99.
- Fujii-Nakata, T., Ishimi, Y., Okuda, A., and Kikuchi, A. (1992). Functional analysis of nucleosome assembly protein, NAP-1. The negatively charged COOH-terminal region is not necessary for the intrinsic assembly activity. *J Biol Chem* 267, 20980-20986.
- Gangloff, Y.G., Werten, S., Romier, C., Carre, L., Poch, O., Moras, D., and Davidson, I. (2000). The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histone-like pairs. *Mol Cell Biol* 20, 340-351.
- Gemmecker, G., Olejniczak, E.T., and Fesik, S.W. (1992). An improved method for selectively observing protons attached to ^{13}C in the presence of ^1H - ^{13}C spin pairs. *J Magn Reson* 96, 199.
- Giaever, G.N., and Wang, J.C. (1988). Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* 55, 849-856.
- Goodfellow, H., Krejci, A., Moshkin, Y., Verrijzer, C.P., Karch, F., and Bray, S.J. (2007). Gene-specific targeting of the histone chaperone asf1 to mediate silencing. *Dev Cell* 13, 593-600.
- Gordon, F., Luger, K., and Hansen, J.C. (2005). The core histone N-terminal tail domains function independently and additively during salt-dependent oligomerization of nucleosomal arrays. *J Biol Chem* 280, 33701-33706.
- 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.
- Groth, A., Corpet, A., Cook, A.J., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J., and Almouzni, G. (2007). Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science* 318, 1928-1931.

- Groth, A., Lukas, J., Nigg, E.A., Sillje, H.H., Wernstedt, C., Bartek, J., and Hansen, K. (2003). Human Tousled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint. *Embo J* 22, 1676-1687.
- 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.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- 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.
- Hakimi, M.A., Bochar, D.A., Chenoweth, J., Lane, W.S., Mandel, G., and Shiekhhattar, R. (2002). A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7420-7425.
- Hamiche, A., Carot, V., Alilat, M., De Lucia, F., O'Donohue, M.F., Revet, B., and Prunell, A. (1996). Interaction of the histone (H3-H4)₂ tetramer of the nucleosome with positively supercoiled DNA minicircles: Potential flipping of the protein from a left- to a right-handed superhelical form. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7588-7593.
- Han, J., Zhou, H., Li, Z., Xu, R.M., and Zhang, Z. (2007). Acetylation of lysine 56 of histone H3 catalyzed by RTT109 and regulated by ASF1 is required for replisome integrity. *J Biol Chem* 282, 28587-28596.
- Han, Z., Guo, L., Wang, H., Shen, Y., Deng, X.W., and Chai, J. (2006). Structural basis for the specific recognition of methylated histone H3 lysine 4 by the WD-40 protein WDR5. *Mol Cell* 22, 137-144.
- Harp, J.M., Hanson, B.L., Timm, D.E., and Bunick, G.J. (2000). Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56, 1513-1534.
- Haynes, S.R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., and Dawid, I.B. (1992). The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 20, 2603.
- Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.H., and Peters, J.M. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* 438, 1176-1180.
- Hu, F., Alcasabas, A.A., and Elledge, S.J. (2001). Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly. *Genes Dev* 15, 1061-1066.
- Hughes, R.M., Wiggins, K.R., Khorasanizadeh, S., and Waters, M.L. (2007). Recognition of trimethyllysine by a chromodomain is not driven by the hydrophobic effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11184-11188.
- Ikura, M., Spera, S., Barbato, G., Kay, L.E., Krinks, M., and Bax, A. (1991). Secondary structure and side-chain ¹H and ¹³C resonance assignments of calmodulin in solution by heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* 30, 9216-9228.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S., and Pelicci, P.G. (2005). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 11, 71-76.

- Ishimi, Y., Hirosumi, J., Sato, W., Sugawara, 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.
- Jackson, V. (1988). Deposition of newly synthesized histones: hybrid nucleosomes are not tandemly arranged on daughter DNA strands. *Biochemistry* 27, 2109-2120.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S., and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288, 1422-1425.
- Jamai, A., Imoberdorf, R.M., and Strubin, M. (2007). Continuous histone H2B and transcription-dependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication. *Mol Cell* 25, 345-355.
- Jeanmougin, F., Wurtz, J.M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* 22, 151-153.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692.
- Kasten, M., Szerlong, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Werner, M., and Cairns, B.R. (2004). Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *Embo J* 23, 1348-1359.
- Kaufman, P.D., Cohen, J.L., and Osley, M.A. (1998). Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Mol Cell Biol* 18, 4793-4806.
- Kaufman, P.D., Kobayashi, R., Kessler, N., and Stillman, B. (1995). The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* 81, 1105-1114.
- Kim, H.J., Seol, J.H., Han, J.W., Youn, H.D., and Cho, E.J. (2007). Histone chaperones regulate histone exchange during transcription. *Embo J* 26, 4467-4474.
- Kireeva, M.L., Hancock, B., Cremona, G.H., Walter, W., Studitsky, V.M., and Kashlev, M. (2005). Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II. *Mol Cell* 18, 97-108.
- Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M., and Studitsky, V.M. (2002). Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol Cell* 9, 541-552.
- Kleinschmidt, J.A., Seiter, A., and Zentgraf, H. (1990). Nucleosome assembly in vitro: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Embo J* 9, 1309-1318.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.

- Krause, D.R., Jonnalagadda, J.C., Gatei, M.H., Sillje, H.H., Zhou, B.B., Nigg, E.A., and Khanna, K. (2003). Suppression of Tousled-like kinase activity after DNA damage or replication block requires ATM, NBS1 and Chk1. *Oncogene* 22, 5927-5937.
- Krawitz, D.C., Kama, T., and Kaufman, P.D. (2002). Chromatin assembly factor I mutants defective for PCNA binding require Asf1/Hir proteins for silencing. *Mol Cell Biol* 22, 614-625.
- Kristjuhan, A., and Svejstrup, J.Q. (2004). Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *Embo J* 23, 4243-4252.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A., and Greenblatt, J.F. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.
- 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., and Greenblatt, J.F. (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* 12, 1565-1576.
- Krude, T. (1995). Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) colocalizes with replication foci in HeLa cell nuclei. *Exp Cell Res* 220, 304-311.
- Kupce, E., and Freeman, R. (1995). Adiabatic Pulses for Wideband Inversion and Broadband Decoupling. *J Magn Reson* 115, 273-276.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R., 3rd, Abmayr, S.M., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* 306, 2084-2087.
- Lan, F., Collins, R.E., De Cegli, R., Alpatov, R., Horton, J.R., Shi, X., Gozani, O., Cheng, X., and Shi, Y. (2007). Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature* 448, 718-722.
- Le, S., Davis, C., Konopka, J.B., and Sternglanz, R. (1997). Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1029-1042.
- Levchenko, V., Jackson, B., and Jackson, V. (2005). Histone release during transcription: displacement of the two H2A-H2B dimers in the nucleosome is dependent on different levels of transcription-induced positive stress. *Biochemistry* 44, 5357-5372.
- Levchenko, V., and Jackson, V. (2004). Histone release during transcription: NAP1 forms a complex with H2A and H2B and facilitates a topologically dependent release of H3 and H4 from the nucleosome. *Biochemistry* 43, 2359-2372.
- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* 442, 91-95.

- Linge, J.P., Habeck, M., Rieping, W., and Nilges, M. (2003). ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* 19, 315-316.
- 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.
- Lorain, S., Quivy, J.P., Monier-Gavelle, F., Scamps, C., Lecluse, Y., Almouzni, G., and Lipinski, M. (1998). Core histones and HIRIP3, a novel histone-binding protein, directly interact with WD repeat protein HIRA. *Mol Cell Biol* 18, 5546-5556.
- 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 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Lusser, A., and Kadonaga, J.T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* 25, 1192-1200.
- Ma, J.C., and Dougherty, D.A. (1997). The Cation- π interaction. *Chem Rev* 97, 1303-1324.
- Maas, N.L., Miller, K.M., DeFazio, L.G., and Toczyski, D.P. (2006). Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol Cell* 23, 109-119.
- Macdonald, N., Welburn, J.P., Noble, M.E., Nguyen, A., Yaffe, M.B., Clynes, D., Moggs, J.G., Orphanides, G., Thomson, S., Edmunds, J.W., Clayton, A.L., Endicott, J.A., and Mahadevan, L.C. (2005). Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell* 20, 199-211.
- 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.
- Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R., and Verreault, A. (2005). A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* 436, 294-298.
- Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* 65, 499-560.
- 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.
- Meijsing, S.H., and Ehrenhofer-Murray, A.E. (2001). The silencing complex SAS-I links histone acetylation to the assembly of repressed chromatin by CAF-I and Asf1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 15, 3169-3182.
- Mello, J.A., Sillje, H.H., Roche, D.M., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2002). Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep* 3, 329-334.
- Milutinovic, S., Zhuang, Q., and Szyf, M. (2002). Proliferating cell nuclear antigen associates with histone deacetylase activity, integrating DNA replication and chromatin modification. *J Biol Chem* 277, 20974-20978.

- 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.
- Mosammamarast, N., Del Rosario, B.C., and Pemberton, L.F. (2005). Modulation of histone deposition by the karyopherin kap114. *Mol Cell Biol* 25, 1764-1778.
- Moss, T., Cary, P.D., Crane-Robinson, C., and Bradbury, E.M. (1976). Physical studies on the H3/H4 histone tetramer. *Biochemistry* 15, 2261-2267.
- Mousson, F., Lautrette, A., Thuret, J.Y., Agez, M., Courbeyrette, R., Amigues, B., Becker, E., Neumann, J.M., Guerois, R., Mann, C., and Ochsenbein, F. (2005). Structural basis for the interaction of Asf1 with histone H3 and its functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5975-5980.
- 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.
- Munemasa, Y., Suzuki, T., Aizawa, K., Miyamoto, S., Imai, Y., Matsumura, T., Horikoshi, M., and Nagai, R. (2007). Promoter region-specific histone incorporation by the novel histone chaperone ANP32B and DNA-binding factor KLF5. *Mol Cell Biol*.
- Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., and Horikoshi, M. (2007). Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4285-4290.
- Myung, K., Pennaneach, V., Kats, E.S., and Kolodner, R.D. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* chromatin-assembly factors that act during DNA replication function in the maintenance of genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6640-6645.
- Nakagawa, T., Bulger, M., Muramatsu, M., and Ito, T. (2001). Multistep chromatin assembly on supercoiled plasmid DNA by nucleosome assembly protein-1 and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *J Biol Chem* 276, 27384-27391.
- Namboodiri, V.M., Akey, I.V., Schmidt-Zachmann, M.S., Head, J.F., and Akey, C.W. (2004). The structure and function of *Xenopus* NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus. *Structure* 12, 2149-2160.
- Namboodiri, V.M., Dutta, S., Akey, I.V., Head, J.F., and Akey, C.W. (2003). The crystal structure of *Drosophila* NLP-core provides insight into pentamer formation and histone binding. *Structure* 11, 175-186.
- 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.
- Nebbio, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E.M., Ferrara, F., Bresciani, F., Weisz, A., de Lera, A.R., Gronemeyer, H., and Altucci, L. (2005). Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* 11, 77-84.
- Nilges, M. (1995). Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *J Mol Biol* 245, 645-660.

- Nilges, M. (1997). Ambiguous distance data in the calculation of NMR structures. *Fold Des* 2, S53-57.
- Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., and Nagata, K. (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* 506, 272-276.
- 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.
- Osada, S., Kurita, M., Nishikawa, J., and Nishihara, T. (2005). Chromatin assembly factor Asf1p-dependent occupancy of the SAS histone acetyltransferase complex at the silent mating-type locus HMLalpha. *Nucleic Acids Res* 33, 2742-2750.
- Owen, D.J., Ornaghi, P., Yang, J.C., Lowe, N., Evans, P.R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., and Travers, A.A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *Embo J* 19, 6141-6149.
- Park, Y.J., and Luger, K. (2006). Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem Cell Biol* 84, 549-558.
- Park, Y.J., and Luger, K. (2006). The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1248-1253.
- Philpott, A., Krude, T., and Laskey, R.A. (2000). Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol* 11, 7-14.
- Philpott, A., and Leno, G.H. (1992). Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 69, 759-767.
- Pina, B., Truss, M., Ohlenbusch, H., Postma, J., and Beato, M. (1990). DNA rotational positioning in a regulatory nucleosome is determined by base sequence. An algorithm to model the preferred superhelix. *Nucleic Acids Res* 18, 6981-6987.
- Polo, S.E., Roche, D., and Almouzni, G. (2006). New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells. *Cell* 127, 481-493.
- 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.
- Prado, F., Cortes-Ledesma, F., and Aguilera, A. (2004). The absence of the yeast chromatin assembly factor Asf1 increases genomic instability and sister chromatid exchange. *EMBO Rep* 5, 497-502.
- Prunell, A., Alilat, M., and De Lucia, F. (1999). Nucleosome structure and dynamics. The DNA minicircle approach. *Methods Mol Biol* 119, 79-101.
- 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.
- Ramey, C.J., Howar, S., Adkins, M., Linger, J., Spicer, J., and Tyler, J.K. (2004). Activation of the DNA damage checkpoint in yeast lacking the histone chaperone anti-silencing function 1. *Mol Cell Biol* 24, 10313-10327.

- Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Scamps, C., Martini, E.M., Lipinski, M., and Almouzni, G. (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell* 9, 1091-1100.
- Ray-Gallet, D., Quivy, J.P., Sillje, H.W., Nigg, E.A., and Almouzni, G. (2007). The histone chaperone Asf1 is dispensable for direct de novo histone deposition in *Xenopus* egg extracts. *Chromosoma* 116, 487-496.
- Recht, J., Tsubota, T., Tanny, J.C., Diaz, R.L., Berger, J.M., Zhang, X., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Burlingame, A.L., Hunt, D.F., Kaufman, P.D., and Allis, C.D. (2006). Histone chaperone Asf1 is required for histone H3 lysine 56 acetylation, a modification associated with S phase in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6988-6993.
- Reese, B.E., Bachman, K.E., Baylin, S.B., and Rountree, M.R. (2003). The methyl-CpG binding protein MBD1 interacts with the p150 subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol* 23, 3226-3236.
- Roberts, C.W., and Orkin, S.H. (2004). The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 133-142.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146, 905-916.
- Rufiange, A., Jacques, P.E., Bhat, W., Robert, F., and Nourani, A. (2007). Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Mol Cell* 27, 393-405.
- Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Wysocka, J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 25, 15-30.
- Ruthenburg, A.J., Wang, W., Graybosch, D.M., Li, H., Allis, C.D., Patel, D.J., and Verdine, G.L. (2006). Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat Struct Mol Biol* 13, 704-712.
- 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.
- Sarma, K., and Reinberg, D. (2005). Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 139-149.
- Sarraf, S.A., and Stancheva, I. (2004). Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell* 15, 595-605.
- Schneider, J., Bajwa, P., Johnson, F.C., Bhaumik, S.R., and Shilatifard, A. (2006). Rtt109 is required for proper H3K56 acetylation: a chromatin mark associated with the elongating RNA polymerase II. *J Biol Chem* 281, 37270-37274.
- Schuetz, A., Allali-Hassani, A., Martin, F., Loppnau, P., Vedadi, M., Bochkarev, A., Plotnikov, A.N., Arrowsmith, C.H., and Min, J. (2006). Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 by WDR5. *Embo J* 25, 4245-4252.
- Schulz, L.L., and Tyler, J.K. (2006). The histone chaperone ASF1 localizes to active DNA replication forks to mediate efficient DNA replication. *Faseb J* 20, 488-490.

- Schwabish, M.A., and Struhl, K. (2004). Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 24, 10111-10117.
- Schwabish, M.A., and Struhl, K. (2006). Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 22, 415-422.
- Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.M., and Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 473-483.
- Selth, L., and Svejstrup, J.Q. (2007). Vps75, a new yeast member of the NAP histone chaperone family. *J Biol Chem* 282, 12358-12362.
- Sharp, J.A., Fouts, E.T., Krawitz, D.C., and Kaufman, P.D. (2001). Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing. *Curr Biol* 11, 463-473.
- Sharp, J.A., Rizki, G., and Kaufman, P.D. (2005). Regulation of histone deposition proteins Asf1/Hir1 by multiple DNA damage checkpoint kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 171, 885-899.
- 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., and Casero, R.A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- 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.
- Sillje, H.H., and Nigg, E.A. (2001). Identification of human Asf1 chromatin assembly factors as substrates of Tousled-like kinases. *Curr Biol* 11, 1068-1073.
- Simpson, R.T., and Stafford, D.W. (1983). Structural features of a phased nucleosome core particle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 51-55.
- Singer, M.S., Kahana, A., Wolf, A.J., Meisinger, L.L., Peterson, S.E., Goggin, C., Mahowald, M., and Gottschling, D.E. (1998). Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 613-632.
- Sivolob, A., Lavelle, C., and Prunell, A. (2003). Sequence-dependent nucleosome structural and dynamic polymorphism. Potential involvement of histone H2B N-terminal tail proximal domain. *J Mol Biol* 326, 49-63.
- Smerdon, M.J. (1991). DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol* 3, 422-428.
- Smerdon, M.J., and Lieberman, M.W. (1978). Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA-repair synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4238-4241.
- Smith, S., and Stillman, B. (1989). Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* 58, 15-25.
- Souroujon, M.C., and Mochly-Rosen, D. (1998). Peptide modulators of protein-protein interactions in intracellular signaling. *Nat Biotechnol* 16, 919-924.

- Spector, M.S., Raff, A., DeSilva, H., Lee, K., and Osley, M.A. (1997). Hir1p and Hir2p function as transcriptional corepressors to regulate histone gene transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Mol Cell Biol* 17, 545-552.
- Stallcup, M.R. (2001). Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene* 20, 3014-3020.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Suka, N., Luo, K., and Grunstein, M. (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet* 32, 378-383.
- Sutton, A., Bucaria, J., Osley, M.A., and Sternglanz, R. (2001). Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription. *Genetics* 158, 587-596.
- Svejstrup, J.Q. (2003). Transcription. Histones face the FACT. *Science* 301, 1053-1055.
- 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.
- Tamburini, B.A., Carson, J.J., Adkins, M.W., and Tyler, J.K. (2005). Functional conservation and specialization among eukaryotic anti-silencing function 1 histone chaperones. *Eukaryot Cell* 4, 1583-1590.
- Tang, Y., Poustovoitov, M.V., Zhao, K., Garfinkel, M., Canutescu, A., Dunbrack, R., Adams, P.D., and Marmorstein, R. (2006). Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat Struct Mol Biol* 13, 921-929.
- Thastrom, A., Lowary, P.T., Widlund, H.R., Cao, H., Kubista, M., and Widom, J. (1999). Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J Mol Biol* 288, 213-229.
- Tyler, J.K., Adams, C.R., Chen, S.R., Kobayashi, R., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1999). The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* 402, 555-560.
- Tyler, J.K., Collins, K.A., Prasad-Sinha, J., Amriott, E., Bulger, M., Harte, P.J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J.T. (2001). Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol Cell Biol* 21, 6574-6584.
- Umehara, T., Chimura, T., Ichikawa, N., and Horikoshi, M. (2002). Polyanionic stretch-deleted histone chaperone cia1/Asf1p is functional both in vivo and in vitro. *Genes Cells* 7, 59-73.
- van Attikum, H., Fritsch, O., and Gasser, S.M. (2007). Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. *Embo J* 26, 4113-4125.
- 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.
- VanDemark, A.P., Kasten, M.M., Ferris, E., Heroux, A., Hill, C.P., and Cairns, B.R. (2007). Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation. *Mol Cell* 27, 817-828.

- Walfridsson, J., Khorosjutina, O., Matikainen, P., Gustafsson, C.M., and Ekwall, K. (2007). A genome-wide role for CHD remodelling factors and Nap1 in nucleosome disassembly. *Embo J* 26, 2868-2879.
- Williams, S.K., and Tyler, J.K. (2007). Transcriptional regulation by chromatin disassembly and reassembly. *Curr Opin Genet Dev* 17, 88-93.
- Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., and Young, R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.
- Wishart, D.S., Sykes, B.D., and Richards, F.M. (1991). Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J Mol Biol* 222, 311-333.
- Wishart, D.S., Sykes, B.D., and Richards, F.M. (1992). The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* 31, 1647-1651.
- Xu, F., Zhang, K., and Grunstein, M. (2005). Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* 121, 375-385.
- Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). 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. (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8, 19-30.
- Zheng, C., Lu, X., Hansen, J.C., and Hayes, J.J. (2005). Salt-dependent intra- and internucleosomal interactions of the H3 tail domain in a model oligonucleosomal array. *J Biol Chem* 280, 33552-33557.
- Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S.J.F., Greenblatt, J., Konrat, R., and Kay, L.E. (1997). Methods for Measurement of Intermolecular NOEs by Multinuclear NMR Spectroscopy: Application to a Bacteriophage α N-Peptide/*boxB* RNA Complex. *J Am Chem Soc* 119, 6711-6721.

Résumé

Au sein des cellules eucaryotes, l'ADN est compacté sous la forme de chromatine dont l'unité de base est le nucléosome. Cette structure protéique protège l'ADN des agressions oxydantes et a un rôle essentiel dans la régulation des processus nucléaires. Ce travail a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de remodelage de la chromatine. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'interaction entre les protéines du nucléosome que sont les histones H3 et H4 et le chaperon d'histones Asf1. Nous avons résolu par RMN la structure du complexe entre Asf1 et les histones. Ce travail a constitué une base pour, d'une part, analyser la fonction de cette interaction *in vivo* et, d'autre part, initier la conception de peptides inhibiteurs spécifiques de cette interaction et anti-tumoraux potentiels. Au cours de ce travail, nous avons également développé une méthode *in vitro* d'étude des mécanismes moléculaires d'assemblage et de désassemblage de nucléosomes par Asf1.

Abstract

Eukaryotic genomic DNA is packed into chromatin as nucleosomes. This packing is essential for the DNA to fit inside the nucleus and for protecting DNA against oxydative aggressions. Additionally, the chromatin structure tightly regulates processes occurring on the DNA template. This work is dedicated to understanding the molecular mechanism underlying chromatin remodeling. Here we focus on the histones H3 and H4, two of the four nucleosome core particles, and the histone chaperone Asf1. We solved by NMR the structure of Asf1 in complex with the histones. This result constitute an essential step firstly to study *in vivo* the function of this interaction and secondly to initiate the design of specific peptidic inhibitors of this interaction which are also potential anticancer agents. We also developped an *in vitro* method to study the molecular basis of nucleosome assembly and disassembly by Asf1.